



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Διερεύνηση της επίδρασης φαρμάκων στην φωσφατάση PTEN

Τριμελής επιτροπή:

κ. Λεονταρίτης Γεώργιος
(επιβλέπων)

κ. Παππά Περικλή (μέλος)

κα. Λέκκα Μαρία Ελένη (μέλος)

Συροπούλου Βασιλική

A.M. 272

Χημικός

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
Περίληψη	8
Abstract	10
1 Η φωσφατάση PTEN	12
1.1 Δομικά χαρακτηριστικά της φωσφατάσης PTEN.....	12
1.1.1 N τελικό άκρο	13
1.1.2 C2 περιοχή	14
1.1.3 PDZ-BD μοτίβο	15
1.1.4 PEST αλληλουχίες	15
1.2 Ρύθμιση της φωσφατάσης PTEN	16
1.3 Εντοπισμός της φωσφατάσης PTEN.....	19
1.3.1 Η πυρηνική φωσφατάση PTEN.....	19
1.3.2 Η φωσφατάση PTEN στην πλασματική μεμβράνη	20
1.3.3 Η κυτταροπλασματική φωσφατάση PTEN	21
1.4 Η φωσφατάση PTEN ως βιοσηματοδοτικό μόριο	23
1.4.1 Το μονοπάτι PI3K/AKT	23
1.4.2 Ο ρόλος της φωσφατάσης PTEN ως βιοσηματοδοτικό μόριο	26
1.5 Μεταλλάξεις του PTEN και ανθρώπινες ασθένειες.....	27
2 Φαρμακολογία της φωσφατάσης PTEN	30
2.1 Μικρά μόρια-τροποποιητές της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN	30
2.1.1 Μικρά μόρια-αναστολείς της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN.....	30
2.1.2 Μικρά μόρια-επαγωγείς της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN	35
2.2 Γενετική στόχευση της φωσφατάσης PTEN.	36
2.3 Πεπτίδια τροποποιητές της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN	37
2.4 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN	39
2.4.1 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN επιδράσει του ενδογενώς παραγόμενου H ₂ O ₂	39
2.4.2 Οξείδωση της φωσφατάσης PTEN από οργανικά υδροϋπεροξειδία.	42
2.4.3 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN μέσω μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέως.	43
2.4.4 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN μέσω S-νιτροζυλίωσης.....	43
2.5 Παράγωγα ελευρωπαΐνης ως τροποποιητές της δραστηριότητας της PTEN στον καρκίνο .	44
Στόχος	47
3 Πειραματική πορεία.....	48
3.1 In vitro πειράματα.....	48

3.1.1	Καλλιέργεια - Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιιεργειών	48
3.1.2	Παρασκευή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21.....	49
3.1.3	Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21 (transformation of chemically competent E.coli BL21)	51
3.1.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	53
3.1.5	Έκφραση ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN σε βακτηριακά κύτταρα BL21	56
3.1.6	Απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN.....	58
3.1.7	Green malachite assay	60
3.2	Πειράματα σε κυτταρικές σειρές.....	61
3.2.1	Κυτταροκαλλιέργεια ευκαριωτικών κυττάρων	61
3.2.2	Κρυοσυντήρηση.....	62
3.2.3	Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	63
3.2.4	Μέτρηση κυττάρων	64
3.2.5	Έλεγχος για μυκόπλασμα	65
3.2.6	Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφουροδαμίνης (SRB).....	66
3.2.7	Επίδραση ουσιών	68
3.2.8	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western	70
4	Αποτελέσματα	75
4.1	In vitro πειράματα.....	75
4.1.1	Έκφραση και απομόνωση GST-PTEN ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης σε E.coli BL21 κύτταρα 75	
4.1.2	Green Malachite assay	77
4.2	Πειράματα σε κυτταρικές σειρές.....	81
4.2.1	Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στην κυτταρική ανάπτυξη στις κυτταρικές σειρές, με χρώση SRB.....	81
4.2.2	Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K.....	92
5	Συμπεράσματα - Συζήτηση	99
5.1	In vitro πειράματα.....	99
5.1.1	Χαρακτηρισμός επαγωγής έκφρασης, απομόνωσης και ενεργότητας της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN	99
5.1.2	Χαρακτηρισμός της πιθανής ανασταλτικής δράσης των παράγωγων ελευρωπαΐνης. ...	99
5.2	Πειράματα σε κυτταρικές σειρές.....	100
5.2.1	Επίδραση αναστολέων στην κυτταρική ανάπτυξη	100
5.2.2	Επίδραση των αναστολέων στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.....	103
5.2.3	Μελλοντικά πειράματα	104
6	Βιβλιογραφία.....	105

Ευχαριστίες

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Λεονταρίτη Γεώργιο, που με επέλεξε ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας, για την εμπιστοσύνη και στήριξη που επέδειξε κατά την εκπαίδευσή μου στις διάφορες τεχνικές, αναθέτοντάς μου την παρούσα ερευνητική μεταπτυχιακή εργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την Ομότιμη Καθηγήτρια Δρ. Λέκκα Μαρία Ελένη και τον Καθηγητή Δρ. Παππά Γεώργιο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, και ειδικότερα την Δρ. Πολύζου Αλεξάνδρα, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθιά την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την στήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/Akt, συμμετέχει σε διαδικασίες επιβίωσης, μεταβολισμού και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η υπερενεργοποίηση του συγκεκριμένου βιοσηματοδοτικού μονοπατιού οδηγεί σε καρκινογένεση και ποιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι συνδέεται με την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, ο καρκίνος του προστάτη, χαρακτηρίζεται συχνά από επαναπρογραμματισμό στον μεταβολισμό λιπιδίων, και τα δύο παραπάνω αποτελούν φαρμακολογικούς στόχους. Η ελευρωπαΐνη, κύριο συστατικό του παρθένου ελαιόλαδου εμφανίζει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συνθετικά παράγωγα της ελευρωπαΐνης θεωρείται ότι στοχεύουν φαρμακολογικά στον επαναπρογραμματισμό του λιπιδικού μεταβολισμού. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας, μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων διαφόρων ισομορφών της PI3K καθώς και η συνδυαστική επίδραση αυτών με συνθετικά παράγωγα ελευρωπαΐνης, στην ανάπτυξη τριών καρκινικών σειρών με διαφορετικό προφίλ PTEN.

Abstract

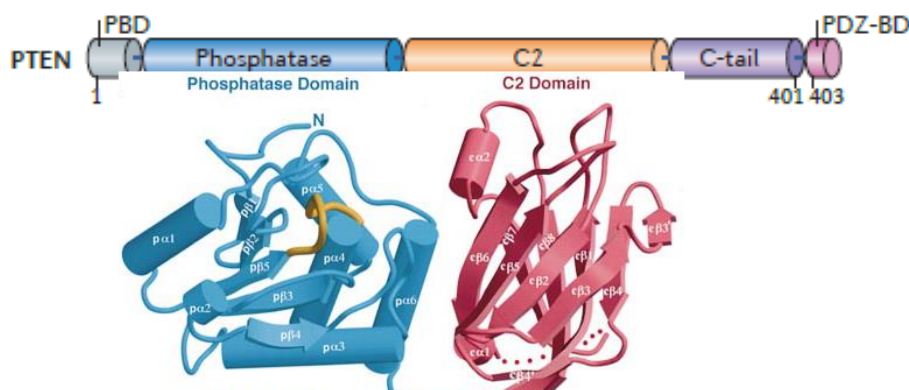
The PI3K/PTEN/Akt signalling pathway is involved in cell survival, metabolism and proliferation processes. Its overactivation leads to carcinogenesis and, more specifically, prostate cancer is characterized by overactivation of the PI3K/PTEN/Akt pathway. In addition, prostate cancer is often characterized by reprogramming in lipid metabolism, both of which are pharmacological targets. Oleuropein, a major component of extra virgin olive oil, displays significant anti-inflammatory and antioxidant properties and its synthetic derivatives are thought to pharmacologically target the reprogramming of lipid metabolism. In the context of this postgraduate thesis, «Investigation of PTEN-targeted drugs», the effect of inhibitors of different PI3K isoforms and their combined effect with synthetic oleuropein derivatives on the growth of four cancer lines with different PTEN profiles was studied.

1 Η φωσφατάση PTEN

Η φωσφατάση PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN), γνωστή και ως MMAC (Mutated In Multiple Advanced Cancers), ανακαλύφθηκε το 1997 από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες ως υποψήφιος ογκοκατασταλτικός παράγοντας. Δρα ανταγωνιστικά στη βιοσηματοδότηση της κινάσης PI3K, ρυθμίζοντας έτσι την ενδοκυττάρια ισορροπία μεταξύ των επιπέδων PIP3/PIP2. Η δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ενώ μεταλλάξεις στην αμινοξική της αλληλουχία οδηγούν σε εμφάνιση νεοπλασματικών αλλά και νευροαναπτυξιακών ασθενειών. Όλα τα παραπάνω, θα αναλυθούν περαιτέρω στην συνέχεια του κεφαλαίου της παρούσας διπλωματικής.

1.1 Δομικά χαρακτηριστικά της φωσφατάσης PTEN

Η φωσφατάση PTEN αποτελείται από τέσσερις (4) δομικές περιοχές, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.1.1: το N-τελικό άκρο το οποίο συνδέεται στο PIP2 (PBD: PIP2 Binding domain, ή PBM: PIP2 Binding Motif), την περιοχή με δραστηριότητα φωσφατάσης, την περιοχή C2 και το C-τελικό άκρο που περιέχει και μια περιοχή που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες τύπου PDZ.



Εικόνα 1.1.1 Σχηματική αναπαράσταση της δομής της φωσφατάσης PTEN (Song et al., 2012) (J. O. Lee et al., 1999)

1.1.1 N τελικό άκρο

Το N-τελικό άκρο περιέχει δύο περιοχές, την περιοχή που προσδένεται με το PI(4,5)P₂, η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως περιοχή PBD (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PI(4,5)P₂]-binding) και την καταλυτική περιοχή της φωσφατάσης (T. Liu et al., 2019).

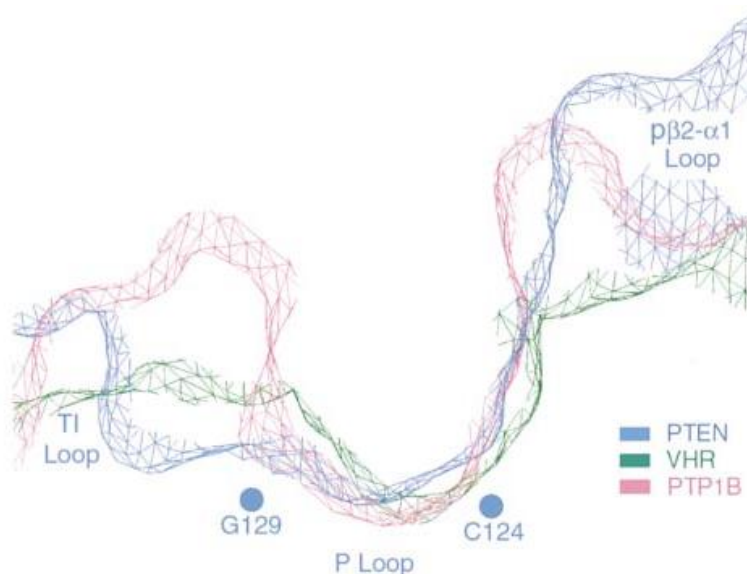
Η περιοχή PDB αποτελείται από 7 αμινοξέα και σε αυτή συνδέεται με τα PI(4,5)P₂ και PI(3,4,5)P₃. Περιέχει τρία βασικά αμινοξέα Lys13, Lys14 και Arg 15 τα οποία συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN, ενώ μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα είναι υπεύθυνες για πολλές μορφές καρκίνου. Επιπλέον, στην προαναφερθείσα αμινοξική περιοχή εντοπίζεται αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού. Πιο συγκεκριμένα, το αμινοξύ Lys13 υπόκειται σε ουβικιτίνωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή της φωσφατάσης PTEN εντός του πυρήνα (T. Liu et al., 2019).

Η καταλυτική περιοχή της φωσφατάσης αποτελείται από 170 αμινοξέα των οποίων η δευτεροταγής τους δομή είναι β-πτυχωτό φύλλο αποτελούμενο από 5 επιμέρους αλυσίδες-στελέχη και η αλληλουχία της εμφανίζει ομολογία με την τενσίνη και την auxilin. Επιπλέον, στην περιοχή αυτή εντοπίζεται και το χαρακτηριστικό αμινοξικό μοτίβο (123-130) για τις PTPases HCxxCxxR, στο οποίο οφείλεται η δραστηριότητά της ως φωσφατάση. Στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου στην περιοχή των αμινοξικών καταλοίπων 123-130, σχηματίζεται ένας βρόγχος P (P loop) (Kreis et al., 2014; Worby & Dixon, 2014). Ο βρόχος αυτός εμφανίζει ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία με άλλες πρωτεΐνες από την οικογένεια των PTPασών, όπως λόγου χάριν τις TPTEα (Transmembrane phosphatase with tensin homology), TPIPβ (TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase), ως προς τα αμινοξικά κατάλοιπα Cys-124, Arg-130, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταλυτική δραστηριότητα του ενεργού κέντρου, και τα His-123 και Gly-127 τα οποία είναι υπεύθυνα για την διαμόρφωση του P βρόγχου (J. O. Lee et al., 1999). Το καταλυτικό αμινοξύ Cys124 δρα ως πυρηνόφιλο και αντιδρά με το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα, οπότε δημιουργείται θειοφωσφορικός δεσμός και σχηματίζεται φωσφορυλιωμένο ενδιάμεσο προϊόν της φωσφατάσης PTEN, το οποίο γρήγορα αποφωσφορυλιώνεται (Xiao et al., 2007). Τέλος, στο ενεργό κέντρο της φωσφατάσης PTEN υπάρχουν επιπλέον τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα Lys125 και Lys 128, τα οποία καθιστούν υψηλότερη τη συγγένεια κατάλυσης υποστρωμάτων με εξαιρετικά όξινο χαρακτήρα, όπως τα φωσφοϊνοσιτίδια. (Worby & Dixon, 2014)

Επιπλέον του P βρόγχου, στην αμινοξική περιοχή 91-94 σχηματίζεται ο WPD βρόγχος και στην περιοχή 160-171 σχηματίζεται ο TI βρόχος. Στον WPD βρόγχο, εντοπίζεται το χαρακτηριστικό μοτίβο FED, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Phe90-Glu91-Asp92, και είναι ικανό να μετακινείται εντός του ενεργού κέντρου (Smith et al., 2021). Το κατάλοιπο Asp-92 της φωσφατάσης PTEN, πιο συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνο για την πρωτονίωση του οξυγόνου στον φαινολικό δακτύλιο της τυροσυλικής ομάδας, παρόμοια με το κατάλοιπο Asp-181 στην PTP1β (J. O. Lee et al., 1999). Ο

ΤΙ βρόχος, ο οποίος ονομάζεται έτσι λόγω των αμινοξικών καταλοίπων θρεονίνης και ισολευκίνης που περιέχει, εντοπίζεται στην αμινοξική περιοχή 160-171 και τα αμινοξικά κατάλοιπα 163-166 είναι υπεύθυνα για το αυξημένο πλάτος του ενεργού κέντρου της φωσφατάσης (T. Liu et al., 2019).

Η περιοχή που περιλαμβάνει το καταλυτικό κέντρο παρουσιάζει κυρίως δομική ομοιότητα με την πρωτεϊνική φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης (DUSP) VHR, ενώ δεν παρουσιάζει αμινοξική ομολογία με τις υπόλοιπες PTPασες. Πιο συγκεκριμένα η περιοχή του καταλυτικού κέντρου είναι αρκετά μεγαλύτερη και με μεγαλύτερο βάθος συγκριτικά με αυτή της VHR, η οποία καταλύει τόσο φωσφοθρεονίνη και φωσφοσερίνη όσο και φωσφοτυροσίνη, και της PTP1B η οποία καταλύει φωσφοτυροσίνη. Το μέγεθος της περιοχής του καταλυτικού κέντρου της φωσφατάσης PTEN, επιτρέπει την κατάλυση υποστρωμάτων όπως φωσφοτυροσίνη, φωσφοθρεονίνη, και φωσφοσερίνη αλλά και του ογκώδους μορίου PI(3,4,5)P3 (Smith et al., 2021). Τα παραπάνω, φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.1.1.1.



Εικόνα 1.1.1.1 Σύγκριση μεταξύ PTEN, VHR, PTP1B. (J. O. Lee et al., 1999)

1.1.2 C2 περιοχή

Η C2 περιοχή αποτελείται από τα υπόλοιπα 170 αμινοξικά κατάλοιπα και αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β πτυχωτά φύλλα, στις άκρες των οποίων υπάρχουν μικρής έκτασης α έλικες. Η περιοχή της φωσφατάσης συνδέεται με την περιοχή C2 με μια ισχυρά συντηρημένη αμινοξική περιοχή και μάλιστα μεταλλάξεις σε αυτήν την περιοχή οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου (J. O. Lee et al., 1999).

Εμφανίζει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με τις εξαρτώμενες από ιόντα Ca^{2+} φωσφολιπάσες όπως η Cd1, A2 και την πρωτεϊνική κινάση Cβ, ωστόσο υπολείπεται των κατάλληλων βρόχων για την πρόσδεση των ιόντων Ca^{2+} και συνεπώς αλληλεπιδρά με τρόπο ανεξάρτητο από Ca^{2+} με τις μεμβράνες. Τα δομικά χαρακτηριστικά του C2 τομέα που καθιστούν τη δράση της PTEN παρόμοια με τις εξαρτώμενες φωσφολιπάσες από ιόντα Ca^{2+} είναι τα εκτεθειμένα στον περιβάλλον του διαλύτη αμινοξικά κατάλοιπα Lys-260, Lys-263, Lys-266, Lys-269 και το ζεύγος His-259-Asp-268, που είναι μερικώς προστατευμένο από τα μόρια διαλύτη (partially buried), τα οποία συνολικά δημιουργούν φορτίο +5. Επιπλέον, στη C2 περιοχή, αναγνωρίζονται τα εκτεθειμένα στα μόρια διαλύτη υδρόφοβα αμινοξέα Met-264 και Leu-265, και τα επίσης εκτεθειμένα στα μόρια του διαλύτη αμινοξέα Lys-327, Lys-330, Lys-332 και Arg-335 (J. O. Lee et al., 1999). Συνεπώς η δομή της όπως διαμορφώνεται από τα προαναφερθέντα αμινοξικά κατάλοιπα, επιτρέπει στην φωσφατάση PTEN να αλληλεπιδρά εύκολα με τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα και να φωσφορυλιώνει τον ινοσιτολικό δακτύλιο του PIP3. Συμπερασματικά, η C2 περιοχή συμβάλλει στον σωστό προσανατολισμό της φωσφατάσης PTEN για την βέλτιστη αλληλεπίδρασή της καταλύοντας το υπόστρωμά της (Smith et al., 2021).

1.1.3 Μοτίβο PDZ-BD

Το μοτίβο PDZ-BD αντιστοιχεί στα τελευταία αμινοξικά κατάλοιπα του COOH-τελικού άκρου και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της φωσφατάσης με μόρια που περιέχουν την αλληλουχία PDZ. Το όνομα PDZ είναι ακρώνυμο των αρχικών πρωτεϊνών στις οποίες παρατηρήθηκε πρώτη φορά: Post-synaptic density protein 95 (PSD-95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) και Zona occludens 1 (ZO-1), και γενικότερα παρατηρείται σε πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην συναπτική μετάδοση. Η περιοχή PDZ-BD επιτρέπει την αλληλεπίδραση της φωσφατάσης PTEN με άλλες πρωτεΐνες, όπως λόγου χάριν με τις MAGI πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκου στη μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες MAGI (membrane-associated guanylate kinase inverted) βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα και χωρίζονται σε τρία είδη, τις MAGI1, MAGI2 και MAGI3 εκ των οποίων η φωσφατάση PTEN συμπλοκοποιείται με τις δύο τελευταίες μέσω περιοχών που αναγνωρίζονται από τις περιοχές PDZ-BD (Simpson & Parsons, 2001). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών MAGI και της φωσφατάσης PTEN και το σχηματιζόμενο μεταξύ τους σύμπλοκο, ενισχύει την σταθερότητα της τελευταίας και βελτιώνει την ενζυμική αποτελεσματικότητά της.

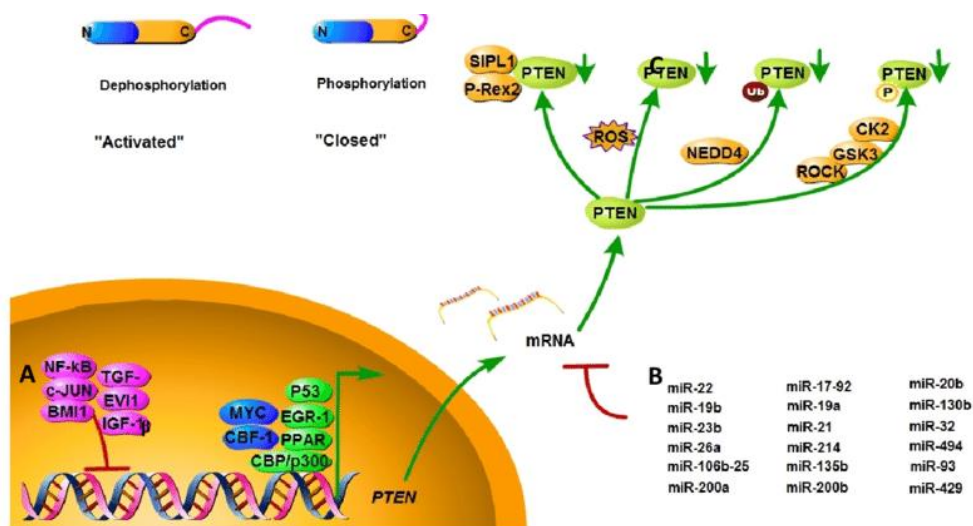
1.1.4 Αλληλουχίες PEST

Οι PEST αλληλουχίες εντοπίζονται στα αμινοξικά κατάλοιπα 350-375 και 379-396 στο C τελικό άκρο, και είναι πλούσιες σε ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη. Ο ρόλος των αλληλουχιών PEST στην φωσφατάση PTEN είναι η αύξηση της σταθερότητας του μορίου της φωσφατάσης, ενώ ταυτόχρονα είναι υπεύθυνες για την στόχευση πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, με σκοπό την πρωτεολυτική τους διάσπαση. Η απώλεια των αλληλουχιών PEST έχει ως συνέπεια την μείωση της έκφρασης της φωσφατάσης (T. Liu et al., 2019).

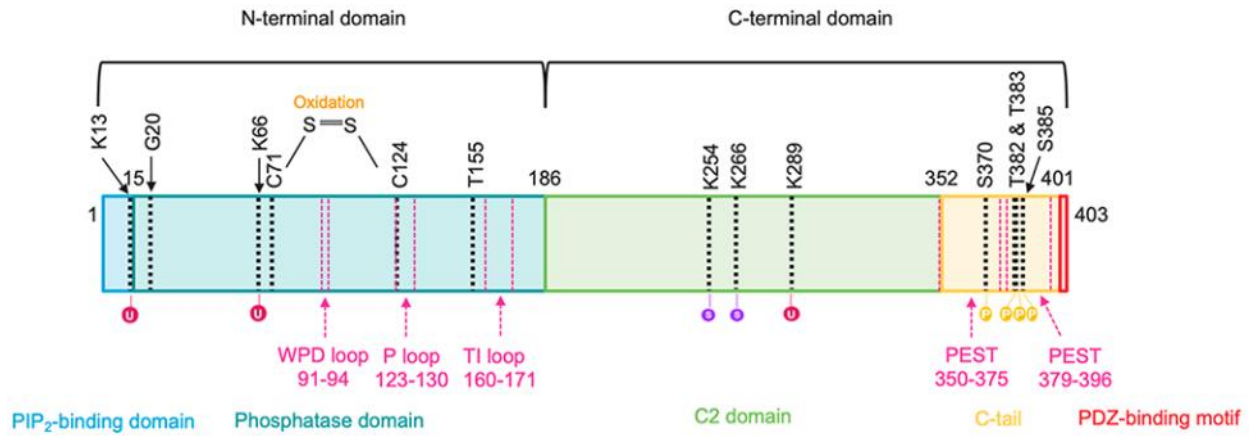
1.2 Ρύθμιση της φωσφατάσης PTEN

Η φωσφατάση PTEN υπόκειται σε ρυθμιστικές διαδικασίες τόσο σε επίπεδο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό, όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, οι οποίες έχουν σημαντικές συνέπειες. Σε μεταγραφικό επίπεδο, μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι EGR1 (Early Growth response protein 1),

PPAR- γ (Peroxisome proliferator activated receptor γ) και p53, συνδέονται απευθείας στην περιοχή του υποκινητή της φωσφατάσης PTEN επάγοντας την μεταγραφή του γονιδίου της. Αντιθέτως, η επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων όπως οι TGF- β (Transforming growth factor beta), NF- κ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells), IGF-1 και τα πρωτο-ογκογονίδια c-Jun και BMI1 (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1), καταστέλλουν την έκφραση της φωσφατάσης PTEN και ενεργοποιούν το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι της Akt. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, η φωσφατάση PTEN είναι ευαίσθητη σε τροποποιήσεις από ποικίλα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων του miRNA22, και άλλων τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.2.1. Τέλος, σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο η φωσφατάση PTEN ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης -μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες, οξείδωσης, σουμοϋλίωσης και ουβικιτίνωσης, οι οποίες επιδρούν τόσο στην δραστηριότητά της όσο και στον εντοπισμό της εντός του κυττάρου (X. Wang et al., 2015). Τα παραπάνω, παρουσιάζονται σχηματικά στις εικόνες 1.2.1, 1.2.2 και αναλύονται περαιτέρω, στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής.



Εικόνα 1.2.1 Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών ρύθμισης της φωσφατάσης PTEN (X. Wang et al., 2015).



Εικόνα 1.2.2 Σχηματική αναπαράσταση των βασικότερων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των αμινοξικών καταλοίπων της φωσφατάσης PTEN (T. Liu et al., 2019).

1.3 Εντοπισμός της φωσφατάσης PTEN

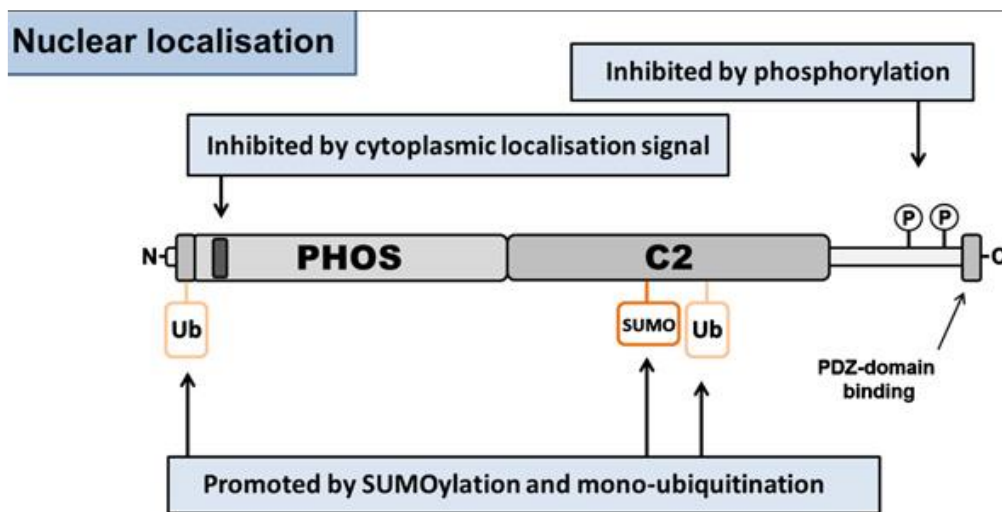
Η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Ο εντοπισμός της στα κυτταρικά διαμερίσματα, οφείλεται σε κύρια δομικά χαρακτηριστικά της αλλά και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδράσεις με πρωτεϊνικά μόρια.

1.3.1 Η πυρηνική φωσφατάση PTEN

Η φωσφατάση PTEN εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό εντός του πυρήνα των κυττάρων, μάλιστα βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εντός υγιών κυττάρων, ενώ σε καρκινικά κύτταρα όπου παρατηρείται απώλεια των επιπέδων φωσφατάσης PTEN διευκολύνεται ο πολλαπλασιασμός τους, γεγονός που αναδεικνύει την αντικαρκινική του δράση. Στα παραπάνω, συνυπολογίζεται και η προγνωστική ικανότητα των επιπέδων έκφρασης της πυρηνικής φωσφατάσης PTEN, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βιοδείκτης διάφορων νεοπλασματικών ασθενειών (T. Liu et al., 2019).

Η πυρηνική φωσφατάση PTEN ρυθμίζει την χρωμοσωμική σταθερότητα, την επιδιόρθωση του DNA, την γενωμική σταθερότητα και τον κυτταρικό κύκλο. Πιο συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN είναι ικανή να διατηρεί την χρωμοσωμική σταθερότητα, αποτρέποντας γενωμικές μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Ως φωσφατάση αλληλεπιδρά και αποφωσφορυλιώνει την PLK1 (polo-like kinase 1), οπότε αποτρέπονται φαινόμενα πολυπλοειδίας. Ο ρόλος της φωσφατάσης PTEN στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναδεικνύεται από την αλληλεπίδρασή της με την κυκλίνη D1 (CDK1) και το σύμπλοκο κυκλίνης B1-CDK1, και συνεπώς αναστέλλοντας την μετάβαση G1-S και διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο κατά την μετάφαση. Επίσης επιδρά στον κυτταρικό κύκλο αναστέλλοντας την μετάβαση G2-M (T. Liu et al., 2019).

Ο εντοπισμός της φωσφατάσης PTEN στον πυρήνα των κυττάρων οφείλεται στην αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού του N-τελικού άκρου και στα αμινοξικά κατάλοιπα 370-383 στο C-τελικό άκρο και η είσοδός της εντός του πυρήνα συμβαίνει μέσω παθητικής διάχυσης. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου της φωσφατάσης PTEN, όπως σουμοϋλίωση και ουβικιτίνωση επιδρούν εξίσου στον εντοπισμό της φωσφατάσης εντός του πυρήνα. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην ουβικιτίνωση είναι οι E3 λιγάσες NEDD4-1 και XIAP οι οποίες επιδρώντας στα αμινοξικά κατάλοιπα Lys13 και Lys254 προωθούν την μετατόπιση της φωσφατάσης στον πυρήνα. Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.3.1.1.. Η έξοδος της φωσφατάσης από τον πυρήνα συμβαίνει μέσω απο-ουβικιτίνωσης, με τη δράση του ενζύμου HAUSP.



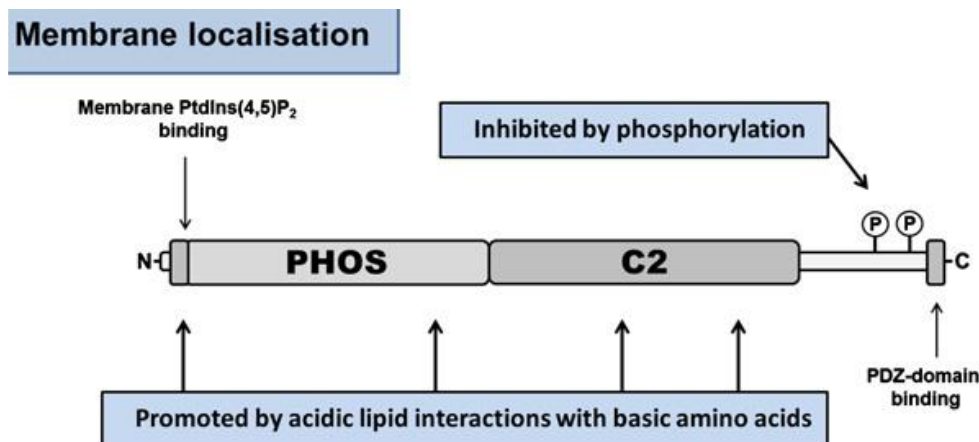
Εικόνα 1.3.1.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του παράγοντα PTEN που ρυθμίζουν την ύπαρξη του στον πυρήνα των κυττάρων. (Leslie et al., 2016)

Η ισορροπία των επιπέδων της φωσφατάσης PTEN μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, ρυθμίζεται και μέσω αλληλεπιδράσεων της με άλλες πρωτεΐνες (protein-protein interactions). Οι παράγοντες που συμβάλλουν στον εντοπισμό της φωσφατάσης εντός του πυρήνα είναι: Importin-11, Ndfip1, Grb2, ATM, PERK, SDHD, Rab5/Ndfip1, PNUTS, LKB-1 και Ran αλλά και το οξειδωτικό στρες (T. Liu et al., 2019).

1.3.2 Η φωσφατάση PTEN στην πλασματική μεμβράνη

Η φωσφατάση PTEN αλληλεπιδρά δυναμικά με την λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών μέσω των προαναφερθέντων και στην ενότητα 1.1 βασικών αμινοξικών καταλοίπων της C2 περιοχής, που αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ το C-τελικό άκρο απωθείται από την μεμβράνη (Lee et al., 1999). Η σύνδεση της φωσφατάσης PTEN με την κυτταροπλασματική μεμβράνη καθορίζεται επίσης από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Επί παραδείγματι, η μονο-σουμοϋλίωση του αμινοξικού κατάλοιπου Lys-266 ενισχύει την συγγένεια της φωσφατάσης με την μεμβράνη και είναι απαραίτητη για την ογκοκατασταλτική της δράση (Huang et al., 2005). Η φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου της φωσφατάσης αποτρέπει την πρόσδεσή της στην μεμβράνη, μιας και αλληλεπιδρά ενδομοριακά με την C2 περιοχή, μεταβάλλοντας την διαμόρφωσή της στο χώρο σε κλειστή μορφή (Bolduc et al., 2013; Bononi & Pinton, 2015; Leslie et al., 2016). Επιπλέον, η φωσφατάση PTEN υπόκειται σε φωσφορυλίωση της C2-περιοχής της υπό την επίδραση της κινάσης ROCK (RhoA-

associated kinase), στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser229, Thr232, Thr319 και Thr 321, η οποία επάγει την πρόσδεση της φωσφατάσης στην πλασματική μεμβράνη (Zhong Li et al., 2005). Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.3.1.2..



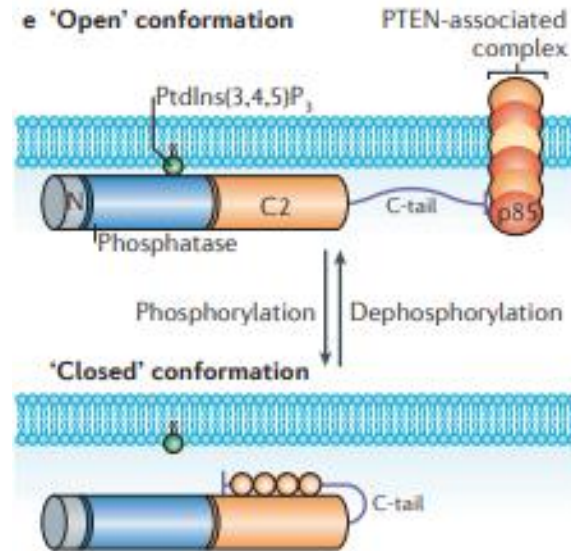
Εικόνα 1.3.1.2. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της φωσφατάσης PTEN που ρυθμίζουν την ύπαρξη του στον πυρήνα των κυττάρων. (Leslie et al., 2016) (Leslie et al., 2016)

1.3.3 Η

κυτταροπλασματική φωσφατάση PTEN

Η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται επίσης εντός του κυτταροπλάσματος είτε σε ενδοσώματα, είτε συγκεκριμένα σε επιμέρους οργανίδια, όπως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρινίσκο (T. Liu et al., 2019). Η κυτταροπλασματική φωσφατάση PTEN συμμετέχει στην απόπτωση, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της κινάσης Akt και συνεπώς προωθώντας την επαγωγή των προ-αποπτωτικών γονιδίων GSK-3β, και κασπάσης-9.

Ο εντοπισμός της εκεί οφείλεται στο κυτταροπλασματικό σήμα εντοπισμού του N-τελικού άκρου αλλά και σε φωσφορυλίωση αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. (Leslie et al., 2016) Οι φωσφορυλιώσεις των αμινοξικών καταλοίπων, έχουν ως συνέπεια την αλληλεπίδραση μεταξύ του C-τελικού άκρου και την περιοχή C2, οπότε καλύπτεται η περιοχή PDZ, συνεπώς η φωσφατάση αποκτά κλειστή-ανενεργή διαμόρφωση (Kreis et al., 2014) οπότε εξέρχεται του πυρήνα, δεν αλληλεπιδρά με μεμβρανικές πρωτεΐνες και παραμένει διαλυτή εντός του κυτταροπλάσματος (Bolduc et al., 2013; Das et al., 2003; Rahdar et al., 2009). Η μεταβολή της διαμόρφωσης της φωσφατάσης PTEN ως συνέπεια της φωσφορυλίωσης φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 1.3.3.1.



Εικόνα 1.3.3.1 Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής της διαμόρφωσης της φωσφατάσης PTEN, λόγω της φωσφορυλίωσης στο C-τελικό άκρο. (Song et al., 2012)

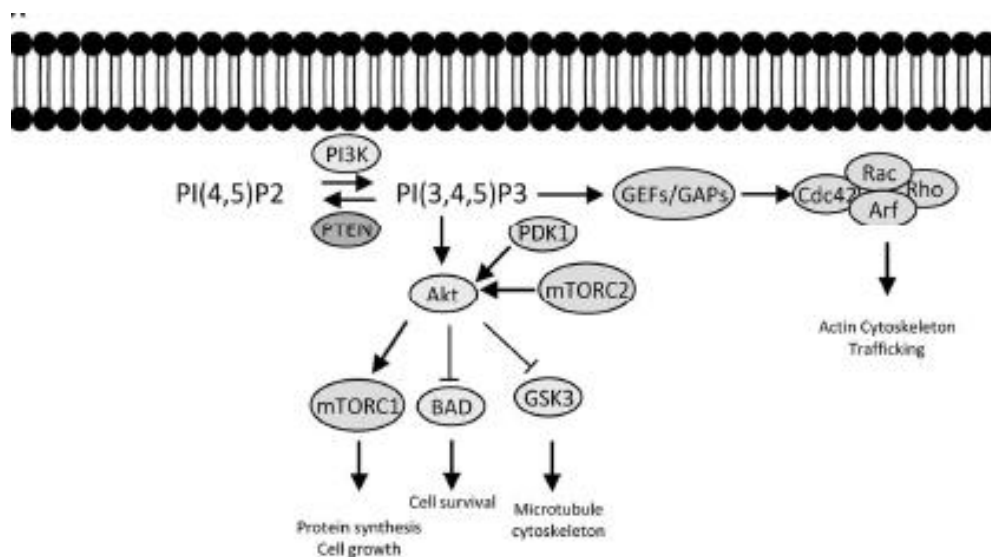
Η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται επίσης στον πυρηνίσκο των κυττάρων, ωστόσο βρίσκεται ως ισομορφή της με επιπλέον 146 αμινοξικά κατάλοιπα στο N-τελικό άκρο της (PTEN β). Η PTEN β ρυθμίζει την ομοιόσταση και την μορφολογία του πυρηνίσκου. Ο εντοπισμός της στον πυρηνίσκο, συνδέεται με την αντικαρκινική ικανότητά της, μιας και μειωμένα επίπεδά της οδηγούν στην αυξημένη βιογένεση των ριβοσωμάτων, η οποία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

1.4 Η φωσφατάση PTEN ως βιοσηματοδοτικό μόριο

1.4.1 Το μονοπάτι PI3K/AKT

Το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt είναι μια ενδοκυτταρική οδός μεταγωγής σήματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση, ανάπτυξη, την αγγειογένεση και την νευρογένεση.

Συνέπεια της ενεργοποίησης της κινάσης PI3K I, είναι η σύνθεση PI(3,4,5)P3 από PI(4,5)P2, οπότε ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση Akt η οποία μεταφέρεται από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη. Εκεί, συνδέεται με το PIP3 και επιδράσει της PDK1 (phosphoinoside dependent kinase 1) και της mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2), φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση σερίνης-θρεονίνης GSK3. Το PIP3 επιπλέον, σηματοδοτεί την προσέλκυση στην μεμβράνη και την ενεργοποίηση των GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) και των GAPs (GTPase Activating Proteins), και κατ'επέκταση ρυθμίζει τη δραστηριότητα πολλών μικρών GTPασών της ομάδας Rac/Rho/Cdc42 και Arf. Η φωσφατάση PTEN δρα αποφωσφορυλιώνοντας το PIP3 προς PIP2 και συνεπώς αναστέλλει την βιοσηματοδότηση που επάγεται από την δράση της κινάσης PI3K (Kreis et al., 2014). Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 1.4.1.1.



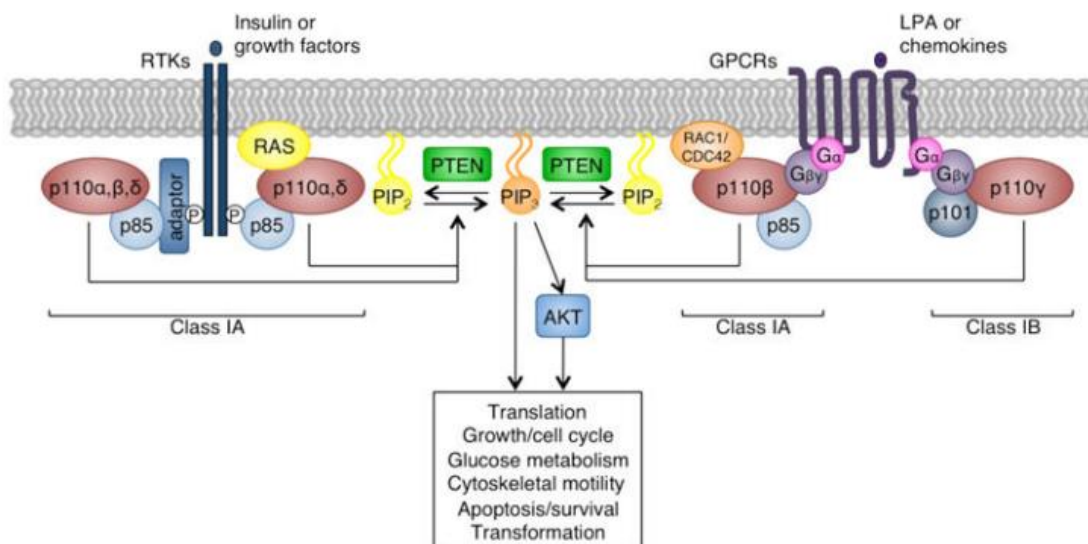
Εικόνα 1.4.1.1 Το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/PTEN (Kreis et al, 2014)

Τα βιοσηματοδοτικά μόρια-κλειδιά του μονοπατιού PI3K/AKT είναι οι 3-κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων PI3K, τα φωσφοϊνοσιτίδια PI(3,4,5)P₃ και PI(4,5)P₂ και οι πρωτεϊνικές κινάσες B (PKB ή Akt).

Η PI3K είναι υπεύθυνη για της σύνθεση PIP₃ από PIP₂, φωσφορυλιώνοντας την υδροξυλομάδα της θέσης 3 του δακτυλίου της ινοσιτόλης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης PIP₂, που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης των θηλαστικών κυττάρων. (Hawkins et al., 2006)

Η οικογένεια των 3-κινάσων των φωσφοϊνοσιτιδίων, PI3K, διαχωρίζονται σε τρεις (3) τάξεις, την I, II και την III. Εκ των τριών τάξεων οι PI3K I, αυτές είναι που συμμετέχουν στο μονοπάτι PI3K/Akt/PTEN. Οι τάξης I PI3K, διαχωρίζονται σε δύο είδη τις IA και IB, οι οποίες διαφέρουν τόσο ως προς τα υποστρώματά τους όσο και ως προς τους ρυθμιστικούς τους παράγοντες, ωστόσο στο σύνολό τους παράγουν κυρίως PI(3,4,5)P (Carracedo & Pandolfi, 2008). Πιο συγκεκριμένα, η τάξη IA αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα p110 (p110α, p110β και p110δ) και την ρυθμιστική υπομονάδα p85, ενώ η τάξη IB αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα p110γ και την ρυθμιστική υπομονάδα p101 όπως φαίνεται και στην εικόνα (Song et al., 2012).

Για την ενεργοποίηση των PI3K τάξης IA, απαιτείται διμερισμός του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης και φωσφορυλίωση των κυτοπλασματικών περιοχών τους σε αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης, επαγόμενος από την πρόσδεση σε αυτόν ενός αυξητικού παράγοντα. Τα φωσφορυλιωμένα τυροσινικά κατάλοιπα, αποτελούν θέσεις πρόσδεσης βιοσηματοδοτικών πρωτεϊνών, μέσω των SH2-περιοχών τους. Επιπλέον, αποτελούν σημεία αλληλεπίδρασης με την ρυθμιστική υπομονάδα p85. (Hawkins et al., 2006)



Οι κινάσες PI3K IB ενεργοποιούνται μέσω τριμερών G-πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η καταλυτική υπομονάδα p101 αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες $G_{\beta\gamma}$ και στη συνέχεια η ρυθμιστική υπομονάδα p110 αλληλεπιδρά με Ras-GTP (Hawkins et al., 2006).

Η κινάση Akt, γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B, είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης, που ανήκει στην οικογένεια των AGC κινασών και Υπάρχουν τρεις (3) ισομορφές. Στη δομή τους περιέχουν μια περιοχή (domain) PH, η οποία συνδέεται με τα PIP2 και PIP3 με υψηλό βαθμό συγγένειας και μια ρυθμιστική περιοχή, η οποία αλληλεπιδρώντας με την mTORC2, ενεργοποιείται. (Song et al., 2012)

1.4.1.1 Η PI3K ως φαρμακολογικός στόχος

Περισσότερο από το 50% των καρκινογενέσεων, χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση του μονοπατιού των PI3Ks, και για το λόγο αυτό οι PI3Ks, θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους. Η υπερενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη υποενότητα, συνδέεται άμεσα από την πρόοδο του καρκινικού όγκου, την ενισχυμένη χημειοταξία και τη δυνατότητα διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων. Οι αναστολείς της PI3K, χωρίζονται σε αναστολείς όλων των ισομορφών της τάξης I (Pan-PI3K inhibitors), σε ισομορφοεκλεκτικούς αναστολείς (isoform-specific inhibitors) και σε αναστολείς διπλής φύσης PI3K/mTOR (dual PI3K/mTOR inhibitors) (D.M. Kotzampasi, K. Premeti, A. Papafotika et al, 2022). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, θα γίνει εκτεταμένη αναφορά στην κατηγορία των αναστολέων όλων των ισομορφών της τάξης PI3K και των ισομορφοεκλεκτικών αναστολέων.

Οι pan-PI3K αναστολείς, δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς του ATP, κατά τρόπο μη εκλεκτικό, εμφανίζοντας έτσι αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα pan-PI3K αναστολέα, αποτελεί το Copanlisib, εγκεκριμένο από τον FDA για ενήλικους ασθενείς που πάσχουν από οξείες λέμφωμα (W. J. Scott, et al, 2016). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, μελετάται η επίδραση του Pictilisib (GDC-0941), pan-PI3K αναστολέα από στόματος χορηγούμενο

που παρουσιάζει αντι-ογκογόνο δράση έναντι ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων όγκων σε μοντέλα μυών και εμφανίζει IC50 ενάντια των ισομορφών PI3Kα, PI3Kβ, PI3Kδ και γ, 3, 33, 3 και 75nM, αντίστοιχα.

Ο σχεδιασμός των αναστολέων της ισομορφής PI3Kα, βασίζεται σε συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες, μη συντηρημένες μεταξύ των ισομορφών των PI3K, ωστόσο, ο τρόπος δράσης τους είναι παρόμοιος με τους rap-αναστολείς, δρώντας ανταγωνιστικά ως προς την πρόσδεση του ATP στο ενεργό κέντρο της PI3Kα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα PI3Kα αναστολέα, εγκεκριμένο από τον FDA, είναι το Alpelisib (Zhang, et al, 2020). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, μελετάται η επίδραση του A66, η εκλεκτικότητα του οποίου οφείλεται στον σχηματισμό δεσμού με την Val851, μέσω του N της θειαζόλης και της αμινο-ομάδας της ουρίας, και της αλληλεπίδρασης της Gln859, στην είσοδο της θέσης του ATP της PI3Kα. Το A66, το οποίο είναι αναστολέας της PI3Kα, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι έχει IC50 32nM ως προς την PI3Kα, μεγαλύτερη από 1,25μM ως προς την PI3Kδ, μεγαλύτερη από 12,5μM ως προς την PI3Kβ και 3,38mM ως προς την PI3Kγ.

Η PI3Kβ, ρυθμίζει τον μεταβολισμό της ινσουλίνης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μάλιστα, καρκινικοί όγκοι που χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια PTEN, επιβιώνουν εξαιτίας της σηματοδότησης της PI3Kβ. Ειδικά στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, η PI3Kβ, αποτελεί πολλά υποσχόμενο φαρμακολογικό στόχο (Yu M, et al., 2023). Το TGX-221, αποτελεί αναστολέα εκλεκτικό της PI3Kβ, αποτρέποντας τη σύνδεση του ATP στην PI3Kβ, και , έχει αναφερθεί ότι έχει IC50 5nM ως προς την PI3Kβ, 0,1μM ως προς την PI3Kδ.

1.4.2 Ο ρόλος της φωσφατάσης PTEN ως βιοσηματοδοτικό μόριο

Η φωσφατάση PTEN, στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα όπου εντοπίζεται, όπως αναλύθηκε και σε προηγούμενη ενότητα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι υπεύθυνη για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Στην συγκεκριμένη υποενότητα θα αναφερθούμε στις σημαντικότερες λειτουργίες της φωσφατάσης PTEN ως βιοσηματοδοτικό μόριο.

Η φωσφατάση PTEN εμπλέκεται στην πολικότητα και τη μετανάστευση, την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό, και την μορφολογία των κυττάρων. Η απώλεια της δραστηριότητας της φωσφατάσης έχει ως συνέπεια την αύξηση των επιπέδων PIP3, τον πολυμερισμό της F-ακτίνης, αυξημένο αριθμό ψευδοπόδιων και αυξημένη χημειοταξία. Επιπλέον, επιδρά στην επιθηλιακή μορφογένεση, δρώντας ανταγωνιστικά της ενεργοποίησης PI3K/AKT. (Worby & Dixon, 2014)

Η πυρηνική PTEN, ρυθμίζει τις σχάσεις του DNA (DSBs, double strand breaks), τον κυτταρικό κύκλο (Brito et al., 2015; Lindsay et al., 2006; Shen et al., 2007), ενώ συνδέεται με την πρωτεΐνη CENP επιτυγχάνοντας έτσι χρωμοσωμική σταθερότητα. (Karreth et al., 2011) Μάλιστα στις φάσεις G₀-G₁ τα ποσοστά της πυρηνικής φωσφατάσης είναι υψηλότερα από ότι στη φάση S. Η φωσφατάση PTEN ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, προκαλώντας στάση της G₁ φάσης και κυτταρικό θάνατο, με τρόπο ανεξάρτητο της δραστηριότητάς της ως φωσφατάση. (Massagué, 2004; Worby & Dixon, 2014)

Η φωσφατάση PTEN επίσης ενέχει σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση. Πιο συγκεκριμένα η φωσφατάση PTEN επιδρά στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, διαίρεσης, επιβίωσης και διαφοροποίησης των νευρώνων, καθώς επίσης και στο σχηματισμό συνάψεων και των αυξητικών κώνων. Η πρόσδεση της φωσφατάσης στην κυτταρική μεμβράνη και η συνεπαγόμενη βαθμίδωση στη συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων PIP2 και PIP3 συμβάλλουν στον σχηματισμό των αυξητικών κώνων και των δενδριτών. Η φωσφατάση εντοπίζεται κατά την ανάπτυξη των νευρώνων και στους άξονες και τους δενδρίτες σε ώριμους νευρώνες. Στους αυξητικούς κώνους, πιο συγκεκριμένα, η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται κυρίως στον κεντρικό τους τομέα σε μικροσωληνίσκους, και όχι στην περιφέρεια των αυξητικών πόρων που είναι πλούσια σε ακτίνη (Chadborn et al., 2006; Kreis et al., 2013). Συνεπώς, η στρατολόγηση της φωσφατάσης στην κυτταρική μεμβράνη των αυξητικών κώνων που συμβαίνει μόνο υπό ορισμένες συνθήκες, έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των συγκεντρώσεων PIP3 και στην αύξηση και στατολόγηση μέσω χημειοταξίας και χημειοαπόπτωσης.

Η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται στα νευρικά κύτταρα επομένως τόσο στον πυρήνα, όσο και στους δενδρίτες και τους αυξητικούς κώνους, και σε κάθε περιοχή επιτελεί διαφορετικές λειτουργίες. Αναλυτικότερα, η πυρηνική φωσφατάση PTEN είναι υπεύθυνη για την επιβίωση του κυττάρου και την επαγωγή αποπτωτικών μηχανισμών. Η φωσφατάση PTEN στους δενδρίτες ώριμων νευρικών κυττάρων, είναι υπεύθυνη για τη μορφολογία των δενδριτικών ακάνθων και την ανάπτυξη και λειτουργία των συνάψεων. Επιπλέον, η φωσφατάση PTEN εντοπίζεται και στους άξονες και τους αυξητικούς κώνους, όπου ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη γένεση αξονικών κλάδων. Ο μηχανισμός με τον οποίο επεμβαίνει η φωσφατάση PTEN στη λειτουργία των νευρικών κυττάρων έγκειται στη ενίσχυση ή ευαισθητοποίηση εκ νέου του βιοσηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K. Η σύνθεσή PIP3 είναι υπεύθυνη για την δημιουργία φιλοπόδιων -με τον σχηματισμό τοπικών συσσωματωμάτων F-ακτίνης (ινώδης ακτίνη) (Ketschek & Gallo, 2010; Kreis et al., 2014), τον σχηματισμό αυξητικών κώνων (Kakumoto & Nakata, 2013; Kreis et al., 2014) αλλά και τη μετατροπή τους ως προς το μέγεθός τους και την επιμήκυνση των αξόνων. Η φωσφατάση PTEN επεμβαίνει συνεπώς ρυθμίζοντας τον τρόπο που προάγεται ή να αναστέλλεται η αξονική ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων. (Kreis et al., 2014)

1.5 Μεταλλάξεις του PTEN και ανθρώπινες ασθένειες

Η απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K/Akt/PTEN οδηγεί στην εμφάνιση τόσο νεοπλασματικών όσο και νευροαναπτυξιακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Η φωσφατάση PTEN εμπλέκεται σε πληθώρα διαδικασιών στα κυτταρικά κύτταρα, όπως στο μεταβολισμό, την ομοιόστασή τους κ.ά., και δρα ως φρένο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, οπότε αποτελεί σημαντικό παράγοντα που ευθύνεται για την κακρινογένεση. Στον Πίνακα 1.5.1 στη

συνέχεια φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης καρκινογένεσης ως προς την απενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων της.(Song et al., 2012)

Πίνακας 1.5.1 Συχνότητα εμφάνισης καρκίνου εξαιτίας σε απενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN. (Chalhoub & Baker, 2009)

Τύπος καρκίνου	Ποσοστό % εμφάνισης καρκίνου
Ενδομητρίου	38
ΚΝΣ	20
Δέρματος	17
Προστάτη	14
Πνευμόνων	8
Ωοθηκών	8
Στήθους	6
Θυρεοειδή	5
Στομάχου	5
Ήπατος	5
Οισοφάγου	1
Παγκρέατος	1

Στις νευροαναπτυξιακές διαταραχές περιλαμβάνονται τα σύνδρομα Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), Proteus (PS) καθώς και το Proteus-like (PLS), που χαρακτηρίζονται από επιληπτικά επεισόδια και αναπτυξιακή καθυστέρηση τα οποία οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις της φωσφατάσης PTEN. Πιο συγκεκριμένα, στο CS παρατηρείται υψηλός κίνδυνος θρομβώσεων, το BRRS συνδέεται με μακροκεφαλία, ενώ το PS συνδέεται με δυσπλασίες.

Τα προαναφερθέντα σύνδρομα οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις στη φωσφατάση PTEN στην καταλυτική περιοχή της φωσφατάσης και στην C2 περιοχή, μερικές εκ των οποίων είναι οι G129E, F241S, P246L, K289E, R335L, V343E, L345V, F347L, και οδηγούν σε μερική ή ολική απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας της και της συγγενείας της ως προς την κυτταρική μεμβράνη.

Επιπλέον, η φωσφατάση PTEN σύμφωνα με τους Zhou et al. αποτελεί σημαντικό παράγοντα εμφάνισης διαταραχών του φάσματος του αυτισμού (ASD). Μάλιστα, μεταλλάξεις της φωσφατάσης PTEN οφείλονται για το 10% των περιπτώσεων εμφάνισης αυτισμού, καθώς επηρεάζουν την ωρίμανση των δενδριτικών ακάνθων των νευρώνων, ως προς τη μορφολογία και τη λειτουργικότητά, όπως επίσης και την συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων. Οι συχνότερες μάλιστα μεταλλάξεις, αφορούν σε αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων στην καταλυτική περιοχή της φωσφατάσης και στην περιοχή του C2 τομέα, με χαρακτηριστικότερη αυτών την μετάλλαξη H93R (Zhou et al, 2019).

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την απορρύθμιση της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN και του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/PTEN, περιλαμβάνουν την νόσο Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) και τη νόσο Parkinson (Parkinson's Disease, PD).

Η AD οφείλεται σε συσσώρευση tau πρωτεϊνών και β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, που οδηγούν στο εκφυλισμό των νευρώνων. Η υπερ-φωσφορυλίωση των tau πρωτεϊνών είναι συνέπεια της δραστηριότητας της GSK-3 κινάσης, η οποία όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο υποκεφάλαιο ρυθμίζεται από τη φωσφατάση PTEN. Παρατηρείται επίσης υπερ-δραστηριότητα του βιοσηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/PTEN, έχει ως συνέπεια την αυξημένη δραστηριότητα της Akt κινάσης και την απώλεια της φωσφατάσης PTEN καθώς και την μετακίνησή του σε διαφορετικά κυτταρικών διαμερισμάτων. Τέλος, η φωσφατάση PTEN ρυθμίζει την μεταφορά των ιόντων Ca^{2+} , η οποία φαίνεται πως είναι διαταραγμένη σε ασθενείς με AD. (Kreis et al., 2014)

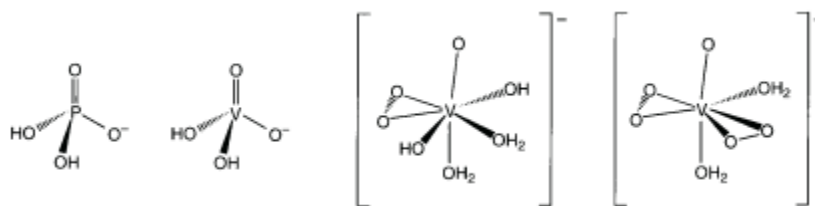
2 Φαρμακολογία της φωσφατάσης PTEN

2.1 Μικρά μόρια-τροποποιητές της δραστικότητας της φωσφατάσης PTEN

Η φωσφατάση PTEN, όπως αναλύθηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο συμμετέχει και ρυθμίζει το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt/PTEN/mTOR. Η έκφραση και δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN εμπλέκεται στην καρκινογένεση, σε νευροαναπτυξιακές και νευροεκφυλιστικές διεργασίες, την διαταραχή της αντίστασης στην ινσουλίνη, στην προστασία και αναγέννηση ιστών μετά από βλάβη. Συνεπώς, εγείρεται ολόένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την πιθανή θεραπευτική δράση που ενέχει η τροποποίηση της φωσφατάσης PTEN, από μικρά μόρια-αναστολείς τα οποία στοχεύουν τόσο στην καταλυτική δραστικότητά της όσο και στην ανασύσταση της έκφρασής της. Ωστόσο, είναι επιθυμητή η μη απευθείας επίδρασή τους στο καταλυτικό ενεργό κέντρο της φωσφατάσης λόγω των πολλαπλών συνεπειών για τον οργανισμό ενώ παράλληλα ανεπιθύμητη είναι και η ολική αποσιώπηση της φωσφατάσης PTEN. Επιπλέον, στόχος των ερευνητών είναι η ανάδειξη αναστολέων της φωσφατάσης PTEN είτε ως προς την λιπιδική είτε ως προς την πρωτεϊνική της δραστικότητα, οι οποίοι δρουν σε συγκεκριμένους ιστούς (Pulido, 2018). Εκτός από την αναστολή της δραστικότητας της φωσφατάσης PTEN, η ερευνητική κοινότητα στρέφουν επίσης το ενδιαφέρον της σε μόρια τα οποία είναι ικανά να αυξήσουν ή να διορθώσουν τη δραστικότητα της φωσφατάσης, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε θεραπευτικά αντικαρκινικά σχήματα και για συγκεκριμένες ασθένειες όπως το σύνδρομο Cowden, και το σύνδρομο του Πρωτέα. (McLoughlin et al., 2018)

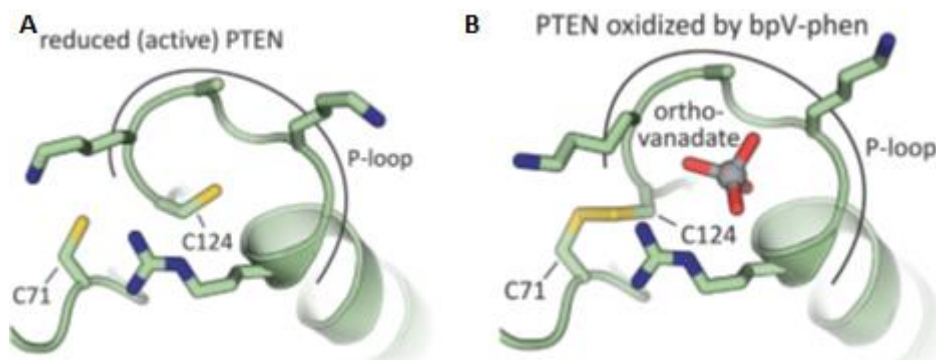
2.1.1 Μικρά μόρια-αναστολείς της δραστικότητας της φωσφατάσης PTEN

Τα σύμπλοκα οξο-βαναδίου και υπερ-οξο-βαναδίου χρησιμοποιούνται γενικά ως αναστολείς των ΡΤΡασών (Pulido, 2018). Το ερευνητικό ενδιαφέρον, έχει στραφεί στα σύμπλοκα βαναδίου επειδή -όπως φαίνεται και στην εικόνα, το βανάδιο σε οξειδωτική κατάσταση +5 εμφανίζει τετραεδρική διαμόρφωση, παρόμοια με της φωσφορικής ομάδας και πιστεύεται ότι συνδέεται με τα υποστρώματά του, τα οποία μεταφέρουν φωσφορική ομάδα, μεταβάλλοντας τη δομή τους σε δομή τριγωνικής διπυραμίδα, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1.1.1 Τα σύμπλοκα υπερ-οξο-βαναδίου περιέχουν επιπλέον του οξο- και του υπερόξο- υποκαταστάτη, έναν ή περισσότερους χηλικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι τα καθιστούν εξαιρετικά σταθερά σύμπλοκα. (Huyer et al., 1997)



Εικόνα 2.1.1.1. Δομές του φωσφορικού ιόντος και των συμπλόκων βαναδίου: παρατηρείται παρόμοια διάταξη στο χώρο που υποδεικνύει παρόμοιο τρόπο αλληλεπίδρασής τους με τα υπορτώματά τους (Huyer et al., 1997).

ΜΜηχανιστικά, η επίδραση των συμπλόκων brV διαφέρει από των συμπλόκων VO. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα brV επιδρούν στη φωσφατάση PTEN προκαλώντας οξείδωση του καταλυτικού κέντρου και συγκεκριμένα οξείδωση του αμινοξικού κατάλοιπου Cys124 και κατ' επέκταση την αναστολή της φωσφατάσης. Αυτό έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας, μεταξύ του οξειδωμένου κατάλοιπου Cys124 και τους Cys71, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1.1.2 (C.-U. Lee et al., 2015). Η οξείδωση που περιγράφηκε παραπάνω είναι αντιστρεπτή και από την αλληλεπίδρασή τους, το βασικό προϊόν που προκύπτει είναι το ορθοβαναδικό ιόν, το οποίο με τη σειρά του αναστέλλει τη δραστηριότητα και άλλων ενζύμων (Pessoa et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, τα σύμπλοκα τύπου VO αναστέλλουν την δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN κατά τρόπο αντιστρεπτό, που όμως ο μηχανισμός τους δεν προκαλεί την οξείδωσή της (Collins et al., 2016).



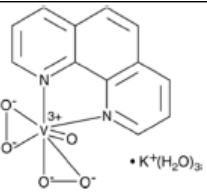
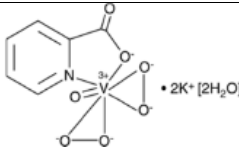
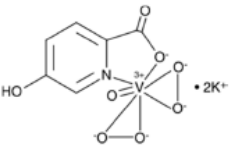
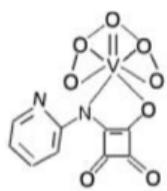
Εικόνα 2.1.1.2 A: Ανηγμένη μορφή-ενεργή της φωσφατάσης PTEN B: οξειδωμένη μορφή της φωσφατάσης PTEN επιδράσει brV συμπλόκων. Παρατηρείται η χαρακτηριστική δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Cys στο ενεργό κέντρο της φωσφατάσης PTEN (C.-U. Lee et al., 2015)

Εξαιτίας της ομοιότητας των τελευταίων με την φωσφατάση PTEN ως προς τα δομικά τους χαρακτηριστικά -όπως έχει αναφερθεί και στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα προαναφερθέντα σύμπλοκα μελετώνται ως αντιστρεπτοί αναστολείς της φωσφατάσης PTEN και εμφανίζουν σχετική εξειδίκευση. Μεταξύ των συμπλόκων υπερ-οξο-βαναδίου, εκείνα που έχουν πολικούς υποκαταστάτες, όπως το brV(pic) και το brV(HOpic) εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια με την φωσφατάση PTEN, ενώ εκείνα που έχουν ουδέτερους υποκαταστάτες, όπως λ.χ. το brV(phen) έχουν μικρότερη εξειδίκευση και μπορούν να αλληλεπιδράσουν τόσο με την φωσφατάση PTEN όσο και με άλλες φωσφατάσες της

οικογένειας των PTPασών. Η χορήγηση των συμπλόκων υπερ-οξο-βαναδίου, ως αναστολείς της φωσφατάσης PTEN έχουν ως συνέπεια την φωσφορυλίωση της Akt -και συνεπώς την ενεργοποίησή της και την αύξηση των επιπέδων PIP3. Επιπλέον, ως αναστολείς χρησιμοποιούνται παράγωγα της φαινανθρενεδιόλης, όπως το SF1670. (Borges et al., 2020; Pulido, 2018)

Η φαρμακολογική δράση των συμπλόκων του βαναδίου ως πιθανοί αναστολείς της φωσφατάσης PTEN σχετίζεται με την δραστηριότητά της ως λιπιδική φωσφατάση και βρίσκει πληθώρα εφαρμογών (Pulido, 2018). Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα μεγάλες κλινικές μελέτες για την χρήση τους ως θεραπευτικά εργαλεία, εξαιτίας των ανησυχιών που εγείρονται από την πιθανή τοξικότητα, ως συνέπεια της συσσώρευσης βαναδίου στον οργανισμό (Borges et al., 2020). Συνοπτικά, αναφέρονται τα μικρά μόρια που χρησιμοποιούνται ως αναστολείς της φωσφατάσης PTEN στον Πίνακα 2.1.1.1.

Πίνακας 2.1.1.1 Μικρά μόρια-σύμπλοκα ως άμεσοι τροποποιητές της φωσφατάσης PTEN (Pulido, 2018).

Μόριο	Ονομασία	Χημική δομή	IC ₅₀	Δράση
bpV(phen)	Bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline		38nM	Αναστολή
bpV(pic)	Bisperoxovanadium 5-hydroxypyridine		31 nM	Αναστολή
bpV(HOpic)	Bisperoxovanadium 5-hydroxypyridine-2carboxylic acid		14 nM	Αναστολή
bpV(pis)	Bisperoxovanadium pyridine-2-squaramide		39 nM	Αναστολή

VO-HOpic	Hydroxyl(oxo)vanadium 3-hydroxypyridine- 2carboxylic acid		35 nM	Αναστολή
SF1670	N-(9,10-dioxo-9,10- dihydrophenanthren-2-yl) pivalamide		2 nM	Αναστολή

2.1.1.1 *bpV(pic)*

Το *bpV(pic)* χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει περιπτώσεις τραυματισμού του ΚΝΣ και προκαλεί βελτιωμένη επιδιόρθωση των κινητικών νευρώνων (Walker et al., 2015). Επιπλέον, έχει μελετηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y και φάνηκε ότι αναστέλλει την φωσφορυλίωση των tau πρωτεϊνών, η οποία επάγεται επιδράσει του οκαδαϊκού οξέος, ενώ παράλληλα προστατεύει τον οργανισμό από φαινόμενα τοξικότητας που οφείλονται στην συσσώρευση Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου (Chen et al., 2012; X.-Y. Liu et al., 2017). Η χορήγηση του *bpV(pic)*, έχει ως συνέπεια επίσης την επαγωγή της ανάπτυξης του άξονα των νευρώνων (Walker et al., 2015) και διαταραχές στη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Mao et al., 2013). Έχει επίσης μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας και δείχνει ότι είναι ικανό να επαναφέρει στα φυσιολογικά τα επίπεδα p-Akt (Sury et al., 2011). Μελέτες αναδεικνύουν τη χρήση του σε ανθρώπινο ωοθηκικό ιστό για την αύξηση της γονιμότητας in vitro (Novella-Maestre et al., 2015). Γενικότερα, σύμφωνα με τη συγκριτική μελέτη των Borges et al. ο αναστολέας *bpV(pic)* είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος σε μελέτες in vivo (Borges et al., 2020).

Ωστόσο, ο *bpV(pic)* αναστολέας φαίνεται να χάνει την δραστικότητά του έναντι της φωσφατάσης PTEN σε οξειδωτικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα στα πειράματα που διεξήχθησαν παρουσία γλουταθειόνης, σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές εντός του κυττάρου, καταστέλλεται η ανασταλτική δράση του *bpV(pic)*. Επιπλέον, ο αναστολέας φαίνεται πως αλληλεπιδρά και με άλλες PTPάσες και μάλιστα με μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με τη φωσφατάση PTEN. Συνεπώς, σύμφωνα με τους Spinelli et al. ο *bpV(pic)* δεν αποτελεί εξειδικευμένο αναστολέα της κυτταρικής φωσφατάσης PTEN (Spinelli et al., 2015).

2.1.1.2 *bpV(HOpic)*

Θετική είναι επίδραση του αναστολέα *bpV(HOpic)* στην αύξηση in vitro της γονιμότητας σε ανθρώπινα ωοθηλακικά κύτταρα (Kawamura et al., 2013), στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 (D. Wang et al., 2015) και στην αντιμετώπιση του χρόνιου πόνου (Shiwarski et al., 2017). Επιδράσει του

bpV(HOpic) επιτυγχάνεται προστασία από ισχαιμικά επεισόδια με συνέπεια την μείωση του τραυματισμού του καρδιακού ιστού και τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Pulido, 2018). Ωστόσο, ο αναστολέας bpV(HOpic) φαίνεται πως δεν είναι εκλεκτικός ως προς την κυτταρική φωσφατάση PTEN, μιας και επιδρά εξίσου και με άλλες PTPάσες, όπως η SHP1 (Spinelli et al., 2015).

2.1.1.3 *bpV(phen)*

Η αναστολή της φωσφατάσης PTEN από το μόριο bpV(phen) οφείλεται στην οξείδωση των αμινοξικών καταλοίπων Cys124-Cys71, που έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας και κατ' επέκταση την αναστολή της (Pulido, 2018). Κατά παρόμοιο τρόπο, το μόριο bpV(phen) είναι ικανό να προκαλέσει αναστολή και σε άλλες φωσφατάσες της οικογένειας των PTPασών, όπως λ.χ. της PTP-β και PTP-1B, και συνεπώς δεν είναι εκλεκτικός ως προς τη φωσφατάση PTEN (Schmid et al., 2004). Από τη συγκριτική μελέτη των Borges et al. ο bpV(phen) αναστολέας χρησιμοποιείται ευρέως στις in vivo μελέτες. (Borges et al., 2020)

Ο αναστολέας bpV(phen) έχει εφαρμοστεί σε συνδυασμό με τον αυξητικό παράγοντα IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και φαίνεται ότι προωθεί την μυελίνωση και συνεπώς είναι πιθανό θεραπευτικό σχήμα για τους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) (De Paula et al., 2014). Επιπλέον, επιδράσει του bpV(phen) αυξάνει η μακροπρόθεσμη μνήμη σε ζωικά μοντέλα που έχουν υποστεί επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αναισθητικά (Y.-L. Wang et al., 2015). Τέλος, σε μελέτες in-vitro σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές, αναδείχθηκε η ικανότητά του να προκαλεί επούλωση τραυμάτων των ιστών, η οποία όμως δεν είναι συνέπεια αυξημένου πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά απορρέει από την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων στην τραυματισμένη περιοχή (Mihai et al., 2012).

2.1.1.4 *VO-HOpic*

Το μόριο VO-HOpic, φέρει δύο υποκαταστάτες HOpic και ένα οξο-υποκαταστάτη, οι οποίοι οφείλονται για τα στερικά φαινόμενα που εμφανίζει όταν προσδένεται με το υπόστρωμά του, στην προκειμένη περίπτωση τη φωσφατάση PTEN. Είναι ο πιο ικανός αναστολέας της φωσφατάσης PTEN και η ικανότητά του οφείλεται στην αναστολή της δραστηριότητάς της ως λιπιδική φωσφατάση (Mak et al., 2010; Rosivatz et al., 2006).

Ο αναστολέας VO-HOpic έχει μελετηθεί in vivo σε ζωικά μοντέλα AD και φαίνεται πως είναι ικανός να προστατεύσει από την μείωση της συναπτικής επικοινωνίας η οποία είναι συνέπεια της συσσώρευσης Αβ αμυλοειδούς πεπτιδίου (Pulido, 2018).

2.1.1.5 *SF1670*

Το μόριο SF1670 είναι παράγωγο φαιναθρενεδιόνης ανακαλύφθηκε το 2007 από τους Garlich et al. και φάνηκε ότι είχε ανασταλτική επίδραση στην φωσφατάση PTEN. Η ανασταλτική δράση του SF1670 δεν επηρεάζει άλλες φωσφατάσες, ενώ αυξάνεται η δραστηριότητά του σε αναγωγικό

περιβάλλον (Y. Li et al., 2011; Spinelli et al., 2015). Ο αναστολέας SF1670 χορηγούμενος σε ζωικά μοντέλα διαβήτη τύπου 2, φαίνεται πως έχει την ικανότητα να αναγεννά το ισχιακό νεύρο που έχει υποστεί βλάβες (Pulido, 2018). Το βασικό μειονέκτημα του SF1670 είναι ότι πρόκειται για μη αντιστρεπτό εκλεκτικό αναστολέα της φωσφατάσης PTEN (Spinelli et al., 2015).

2.1.2 Μικρά μόρια-επαγωγείς της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN

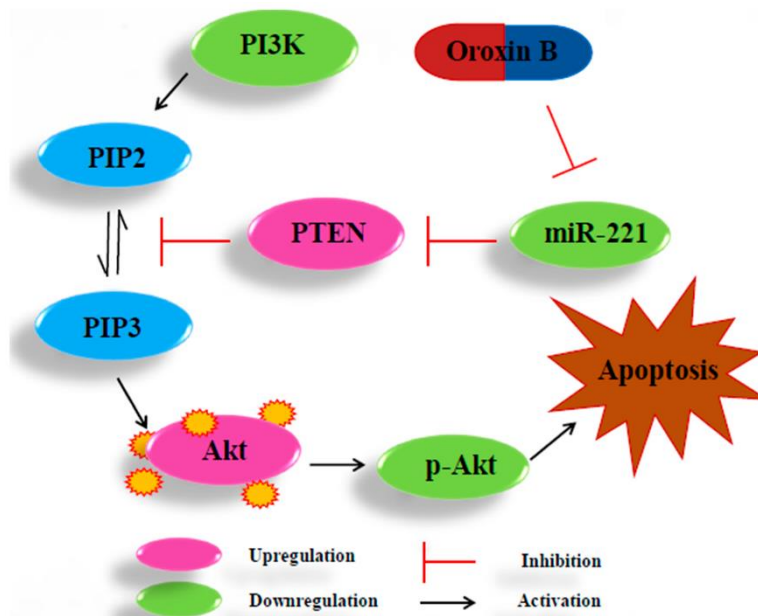
Η χρήση μορίων που εμφανίζουν φαρμακολογική δράση στη φωσφατάση PTEN, επάγοντας την δραστηριότητά της είναι σε πολλές περιπτώσεις στόχος της ερευνητικής κοινότητας. Μέχρι σήμερα, χρησιμοποιούνται φάρμακα τα οποία εμφανίζουν αυτήν την ικανότητα επαγωγής της δραστηριότητας ή της έκφρασης της φωσφατάσης, χωρίς ωστόσο αυτή η δράση τους να είναι η κύρια, ενώ ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρούν στην φωσφατάση παραμένει αδιευκρίνιστος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα αντικαρκινικά φάρμακα Ublituximab, Trastuzumab, Pertuzumab, Rituximab, Sunitimib, τα οποία επιδρούν σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ανστέλλοντάς τους με συνέπεια την επαγωγή ή την ενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN. Άλλα φάρμακα όπως το DMAT και το CT99021, επιδρούν στην CK2 και την GSK3 αντίστοιχα, οι οποίες είναι κινάσες που φωσφορυλιώνουν την φωσφατάση PTEN, αναστέλλοντάς τις. Επιπλέον, φυσικά προϊόντα έχουν ανακαλυφθεί τα οποία επιδρούν στην φωσφατάση PTEN, ως επαγωγείς. (Boosani & Agrawal, 2013).

Το ginkgolic acid C17:1 είναι φυσικό προϊόν που έχει απομονωθεί από το φυτό *Ginkgo biloba*L. Εμφανίζει αντικαρκινική ικανότητα σε ζωικά μοντέλα πολλαπλούν μυελώματος, μέσω της επαγωγής της φωσφατάσης PTEN, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης, κατ' επέκταση προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγή αποπτωτικών φαινομένων. Το ginkgolic acid C17:1 αλληλεπιδρά επίσης και με άλλες φωσφατάσες της οικογένειας των PTPασών, όπως λ.χ. την SHP-1, και συνεπώς είναι μη εκλεκτικός ενεργοποιητής της φωσφατάσης PTEN (Baek et al., 2017).

Το indole-3-carbinol (I3C) είναι φυσικό προϊόν που έχει απομονωθεί από τα σταυρανθή λαχανικά, στα οποία παράγεται ως μεταβολίτης από τη διάσπαση της γλυκοσινολικής γλυκοβρασικίνης. Σύμφωνα με την μελέτη των Lee et al. το I3C αναγνωρίστηκε ως αναστολέας της δραστηριότητας της E3 λιγάσης WWP1, η οποία προκαλεί την πόλυ-ουβικυτινίωση της φωσφατάσης PTEN στο αμινοξικό κατάλοιπο Lys27. Συνέπεια της πόλυ-ουβικυτινίωση είναι η αναστολή του διμερισμού της φωσφατάσης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η συγκέντρωσή της στο εσωτερικό της μεμβράνης και άρα να επάγεται η δραστηριότητα της Akt κινάσης. Το I3C θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό εργαλείο σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου (Y.-R. Lee et al., 2019; Parsons, 2019).

Η Oroxin B είναι φυσικό φλαβονοειδές που έχει απομονωθεί από το φυτό *Oroxylum indicum*. Εμφανίζει αντι-νεοπλασματική ικανότητα σε ζωικά μοντέλα για τον καρκίνο του ήπατος και πιο συγκεκριμένα επάγει κυτταρική απόπτωση μέσω της επαγωγής της δραστηριότητας της φωσφατάσης

PTEN και της καταστολής της δραστηριότητας των PI3K και p-Akt, όπως φαίνεται και σχηματικά στην εικόνα 2.1.2.1. Μάλιστα, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, γίνεται κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο (N.-N. Li et al., 2018)



Εικόνα 2.1.2.1 Σχηματικά, ο μηχανισμός δράσης της Oroxin B στην έκφραση της φωσφατάσης PTEN (N.-N. Li et al., 2018).

2.2 Γενετική στόχευση της φωσφατάσης PTEN.

Η έμμεση αναστολή της δράσης της φωσφατάσης PTEN μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χρησιμοποιώντας ASOs (antisense oligonucleotides) και LNA (locked nucleic acid analogs) στοχεύοντας στη στόχευση και αποσιώπηση της μεταγραφής και της μετάφρασης του γονιδίου της φωσφατάσης PTEN. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται τα ASOs τα οποία στοχεύουν το mRNA της φωσφατάσης, λόγω της συμπληρωματικότητάς τους κατά Watson-Crick και έτσι αποτρέπουν την μετάφρασή τους ή επάγουν την αποδόμησή του (Zhonghan Li & Rana, 2014) και μάλιστα σε *in vivo* πειράματα φαίνεται ότι η δράση τους είναι ικανή να μειώσει την έκφραση της φωσφατάσης PTEN έως και 90% (Butler et al., 2002). Κατά παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιούνται και τα LNAs, τα οποία μάλιστα έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αλλά η χρήση τους εμφανίζει φαινόμενα τοξικότητας (Swayze et al., 2007). Επιπλέον, οι ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην εφαρμογή siRNA και shRNA, τα οποία τα μεν μεταφέρονται μέσω λιποπρωτεϊνικών νανοδομών και κατευθύνονται σε ηπατοκύτταρα στόχους και μειώνουν την έκφραση της φωσφατάσης σε αυτά στοχευμένα, ενώ τα τελευταία μεταφέρονται μέσω αδενοϊών φορέων (tyrosine mutated AAV vectors) και έτσι επάγουν την αναγέννηση των νευραξόνων των οπτικών νεύρων σε αρουραίους, μέσω της επαγωγής του m-TOR. (K. Liu et al., 2010; McLoughlin et al., 2018).

Η αύξηση ή η διόρθωση της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN , όπως προαναφέρθηκε και στην αρχή του συγκεκριμένου κεφαλαίου αποτελεί έναν τρόπο αντιμετώπισης συγκεκριμένων ασθενειών και μπορεί να πραγματοποιείται μέσω της μεταφοράς της ίδιας φωσφατάσης εντός των κυττάρων, της αναστολής πρώιμων miRNAs, όπως το miR-21 αλλά και της εισαγωγής ολόκληρου του γονιδίου της φωσφατάσης PTEN (Altinoğlu et al., 2016).

Μία εναλλακτική μέθοδος με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN είναι η αναστολή του miR-21. Η αναστολή του μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα με χρήση LNA μορίων τα οποία στοχεύουν στη seed region του miR-21, οπότε μπλοκάρουν τη δράση τους και δεν αναγνωρίζουν το mRNA της φωσφατάσης PTEN, ή με χρήση ολιγονουκλεοτιδίων καταλυτικά ενεργών σε σχήμα σφυριού, τα οποία μειώνουν τα επίπεδα miR-21 και συνεπώς αυξάνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφατάσης (Belter et al., 2016; Obad et al., 2011).

Τέλος, μέσω της εισαγωγής της ίδιας της φωσφατάσης PTEN εξωγενώς, μέσω λιποειδών νανοσωματιδίων κατιονικής φύσεως, επάγεται η διαδικασία της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, όπου η φωσφατάση δεν ήταν λειτουργική (PTEN-null cells). Επιπλέον, η εισαγωγή ολόκληρου του γονιδίου της φωσφατάσης PTEN σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές, μέσω αδενοϊού που λειτουργεί ως φορέας, έχει ως συνέπεια την αναστολή της βιοσηματοδότησης του Akt μονοπατιού και την μείωση των καρκινικών όγκων, στην περίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως και του παχέως εντέρου. Επιπροσθέτως, επαγωγή της έκφρασης της φωσφατάσης PTEN-L, μετά από στοχευμένη ιϊκή προσβολή των καρκινικών κυττάρων έχει ως συνέπεια την λύση τους. Αξίζει να σημειωθεί μάλιστα, ότι η εισαγωγή του γονιδίου ακόμα και σε υγιή κύτταρα δεν επιφέρει αρνητικές συνέπειες στα κύτταρα αυτά (Boosani et al., 2019; McLoughlin et al., 2018; M Tanaka & Grossman, 2003; Motoyoshi Tanaka et al., 2000).

2.3 Πεπτίδια τροποποιητές της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN

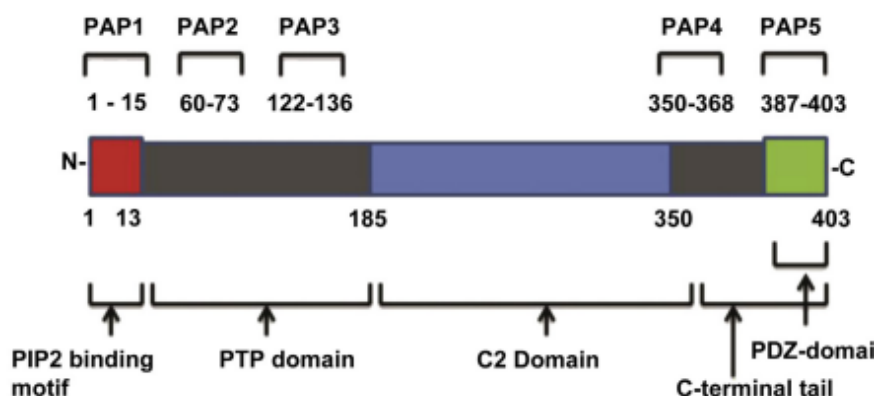
Η χημεία πεπτιδίων είναι ένας πολλά υποσχόμενος κλάδος, μιας και τα συνθετικά πεπτίδια σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μιμούνται την πρωτεΐνη-στόχο, αναστέλλοντας τη βιολογική δραστηριότητά της και συνεπώς είναι ικανά να εμφανίζουν θεραπευτική δράση. Τα συνθετικά πεπτίδια εισάγονται εντός των κυττάρων λόγω της αλληλουχίας της TAT πρωτεΐνης (Trans-Activator of Transcription) που περιέχουν στο C-τελικό τους άκρο, μιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης, η οποία ωστόσο δεν επηρεάζει την βιολογική τους δραστηριότητα. Έως σήμερα έχουν πατενταριστεί πεπτιδικά μόρια που εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση ειδικά ως προς τη φωσφατάση PTEN. Πιο συγκεκριμένα, έχουν

συντεθεί μια σειρά πεπτιδικών αλληλουχιών, τα PAP1 έως PAP5, τα TGN1 έως TGN3 και έχουν ανακαλυφθεί πεπτίδια που περιέχουν αλληλουχία πρόσδεσης σε PDZ πρωτεΐνες επεμβαίνονοντας έτσι στην αλληλεπίδραση της φωσφατάσης με τις πρωτεΐνες αυτές (Boosani et al., 2019; Knafo et al., 2016; Ohtake et al., 2014; Terrien et al., 2012).

Τα PAP1-3 είναι πεπτιδικές αλληλουχίες που εμφανίζουν ειδικότητα ως προς την N-αμινοτελική περιοχή της φωσφατάσης PTEN, ενώ τα PAP4 και PAP5 εμφανίζουν ειδικότητα ως προς την C-αμινοξική περιοχή της. Λόγω της θεωρητικής ειδικότητας που εμφανίζουν στις περιοχές αυτές της φωσφατάσης PTEN, θεωρείται ότι δρουν ανταγωνιστικά ως προς αυτή. Τα συνθετικά πεπτίδια αυτά σε *in vivo* μελέτες προκαλούν ενισχυμένη επιμήκυνση των νευραξόνων, μέτρια ανάπτυξη της περιοχής του φλοιού-σπονδυλικής στήλης σε περιπτώσεις τραυματισμού του νωτιαίου μυελού (Ohtake et al., 2014). Τα βασικά χαρακτηριστικά καθώς και ένα σχηματικό διάγραμμα των περιοχών-στόχων των πεπτιδίων PAP1-5 στο μόριο της φωσφατάσης PTEN, φαίνονται στον πίνακα 2.3.1 και στην εικόνα 2.3.1, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.3.1 Τα βασικά χαρακτηριστικά των σύνθετων πεπτιδίων PAP (Ohtake et al., 2014).

Όνομα	Αριθμός αμινοξέων	MW
PAP1	26	3297
PAP2	25	3243
PAP3	26	3056
PAP4	30	3416
PAP5	28	3824



Εικόνα 2.3.1 Σχηματικό διάγραμμα των περιοχών-στόχων των πεπτιδίων PAP1-5 στο μόριο της φωσφατάσης PTEN (Ohtake et al., 2014).

Τα πεπτίδια TGN1, TGN2, και TGN3 μιμούνται το C-τελικό άκρο της φωσφατάσης PTEN, έτσι αναστέλλουν εκλεκτικά τη δράση της και επάγουν το PI3K βιοσηματοδοτικό μονοπάτι και έτσι σε

in vivo μελέτες προκαλεί ανανέωση των νευρώνων μετά από τραυματισμούς του ΚΝΣ (Boosani et al., 2019). Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους ακόμα είναι μερικώς αδιευκρίνιστος.

Σύμφωνα με τους Terrien et al. η γλυκοπρωτεΐνη (G protein) του RNA ιού Rhabdoviridae, και πιο συγκεκριμένα στο C-τελικό άκρο της, περιέχεται αλληλουχία πρόσδεσης στην PDZ, η οποία εμφανίζει παρόμοια δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με αυτά της φωσφατάσης PTEN. Συνεπώς έχει την ικανότητα να επεμβαίνει στην αλληλεπίδραση μεταξύ MAST2-PDZ, στο σημείο πρόσδεσης (binding site-BS), λειτουργώντας ανταγωνιστικά έναντι της φωσφατάσης PTEN ως προς την πρόσδεσή της με την MAST2. Συνεπώς, η μόλυνση νευρικών κυττάρων in vivo με την ιικής προέλευσης G πρωτεΐνη, έχει ως συνέπεια την πρόσδεση αυτής στην MAST2-PDZ-BS και στην συνέχεια τον εντοπισμό της φωσφατάσης PTEN εκτός του πυρήνα (Terrien et al., 2012).

Τέλος, οι Knafo et al. συνέθεσαν ένα πεπτίδιο το οποίο περιέχει την αμινοξική αλληλουχία του PTEN, η οποία αντιστοιχεί στην αλληλουχία PDZ-BS του C-τελικού άκρου, το N-myristoyl-QHSQITKV, το οποίο φαίνεται πως έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες PDZ με τις οποίες αλληλεπιδρά η φωσφατάση. Συνεπώς, το συγκεκριμένο PTEN πεπτίδιο δρα ανταγωνιστικά ως προς την σύνδεση της φωσφατάσης PTEN με πρωτεΐνες PDZ (Knafo et al., 2016).

Ωστόσο, η εφαρμογή πεπτιδίων στα θεραπευτικά σχήματα αν και που είναι σημαντικά υποσχόμενη, εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς, όπως ότι η δραστηριότητά τους έχει πολύ μικρό χρόνο διάρκειας καθώς υπόκεινται στη δράση ενδογενών πεπτιδασών, παρόλο που χημικές τροποποιήσεις τους όπως γλυκοζυλιώσεις έχουν αυξήσει το χρόνο ημιζωής τους (Boosani et al., 2019). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους και ο μηχανισμός μέσω του οποίου αναστέλλουν ή ανταγωνίζονται τη δραστηριότητα της PTEN.

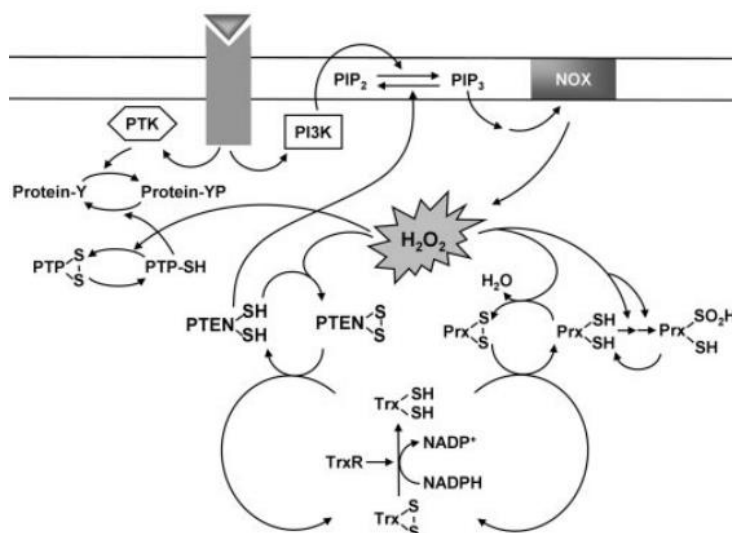
2.4 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN

2.4.1 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN μέσω του ενδογενώς παραγόμενου H_2O_2

Η καταλυτική δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN αναστέλλεται αντιστρεπτά από την επίδραση του ενδογενώς παραγόμενου H_2O_2 . Πιο συγκεκριμένα, το H_2O_2 προκαλεί οξείδωση του αμινοξικού καταλοίπου Cys-124 στο ενεργό κέντρο της φωσφατάσης PTEN, το οποίο σχηματίζει ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό με το αμινοξικό κατάλοιπο Cys-71. Η οξείδωση της φωσφατάσης, είναι αντιστρεπτή διαδικασία και ρυθμίζεται από την επίδραση της θειορεδοξίνης (Trx) και της υπεροξυρεδοξίνης (Prx).

Σύμφωνα με τους Kwon et al. η ενδοκυττάρια παραγωγή H_2O_2 ως απάντηση στην διέγερση από αυξητικούς παράγοντες πεπτιδικής φύσεως, όπως η ινσουλίνη, ο επιδερμικός αυξητικός

παράγοντας (EGF) και ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), προκαλεί αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και είναι συχνό φαινόμενο των καρκινικών κυττάρων (Burdon, 1995; Kwon et al., 2004; Rhee et al., 2000; Szatrowski & Nathan, 1991). Υπό την επίδραση των προαναφερθέντων αυξητικών παραγόντων, ενεργοποιείται η δραστηριότητα της PI3K, οπότε συσσωρεύεται η PIP3 στην κυτταρική μεμβράνη, που επάγει τη δραστηριότητα της Akt. Ταυτόχρονα αναστέλλεται η δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN, μέσω οξείδωσης του αμινοξικού καταλοίπου Cys-124 στο καταλυτικό της κέντρο, που έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας με το αμινοξικό κατάλοιπο Cys-71. Τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα H_2O_2 οδηγούν στην οξειδωτική αναστολή επίσης της υπεροξειρεδοξίνης (PrxI), μέσω δύο βημάτων, στην οποία η σουλφυδριλομάδα της Cys (-SH) του ενεργού καταλυτικού κέντρου της μετατρέπεται αντιστρεπτά σε σουλφινικό οξύ (Cys (-SO₂H)) και έτσι ενώ η ίδια απενεργοποιείται μειώνονται τα επίπεδα H_2O_2 . Τα μειωμένα επίπεδα H_2O_2 έχουν ως συνέπεια την επανενργοποίηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης PTEN ενώ παράλληλα υπό την επίδραση της αναγωγάσης της Trx, η επανέρχεται και η δραστηριότητα της Prx (Huu et al., 2021; Kwon et al., 2004). Τα παραπάνω παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 2.4.1.1.



Εικόνα 2.4.1.1 Μοντέλο παραγωγής, σηματοδοτικού ρόλου και απομάκρυνσης του ενδογενώς παραγόμενου H_2O_2 σε κύτταρα υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων (Kwon et al., 2004).

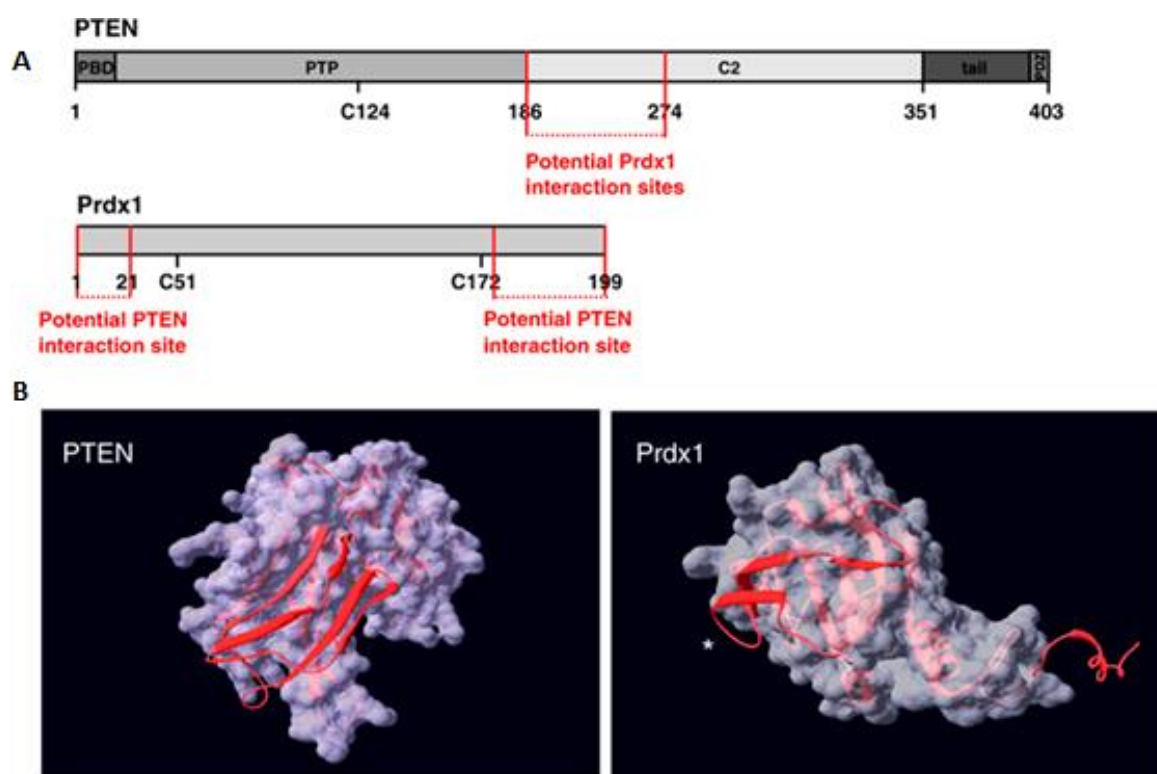
Ο

Οι υπεροξειρεδοξίνες (Prx) είναι ανήκουν στην οικογένεια των υπεροξειδασών και αποτελούνται από έξι (6) ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον εντοπισμό τους εντός του κυττάρου και τα υποστρώματα στα οποία εμφανίζουν εξειδίκευση. Οι Prx που συμμετέχουν στην ρύθμιση της ισορροπίας H_2O_2 εντός του κυττάρου -τόσο στο κυτοσόλιο όσο και στα μιτοχόνδρια, είναι οι PrxI - PrxIV, με την πρώτη να είναι υπεύθυνη για την προστασία της φωσφατάσης PTEN από

ήπιο οξειδωτικό stress, ενώ η PrxII την προστατεύει σε ισχυρότερες ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (Huu et al., 2021).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της φωσφατάσης PTEN και της Prx I είναι αναλογίας 1:1 και πιο αναλυτικά, η Prx I αλληλεπιδρά με την C2-περιοχή της φωσφατάσης PTEN, στην περιοχή των 186-274 αμινοξικών καταλοίπων, ενώ η φωσφατάση PTEN αλληλεπιδρά πιθανώς με το N-τελικό άκρο της Prx1 στην περιοχή των αμινοξικών καταλοίπων 1-21 και με το C-τελικό άκρο στην περιοχή των 183-199 καταλοίπων (Cao et al., 2009; Huu et al., 2021). Η αλληλεπίδραση αυτή, φαίνεται στην εικόνα 2.4.4.2.

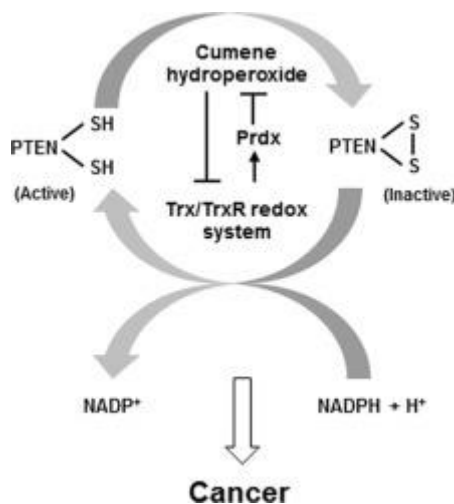
Όπως φαίνεται και στο μοντέλο παραγωγής και απομάκρυνσης του ενδογενούς παραγόμενου H_2O_2 , υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων σπουδαίος είναι και ο ρόλος της θειορεδοξίνης (Trx). Η Trx είναι μέρος ενός σημαντικού συστήματος για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης εντός του κυττάρου, το οποίο αποτελείται επίσης από το συνένζυμο NAD(P)H και την αναγωγή θειορεδοξίνης (TrxR). Σύμφωνα με τους Zhang et al. η Trx υπόκειται σε διμερισμό, συνέπεια του οποίου είναι η παρεμπόδιση της δράσης της TrxR, η απενεργοποίηση του συστήματος Trx και κατ' επέκταση η μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση της φωσφατάσης PTEN (Zhang et al., 2020).



Εικόνα 2.4.4.2 A: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της PrxI και της φωσφατάσης PTEN (Cao et al., 2009), B: Αναγνώριση δυναμικών αλληλεπίδρασης μεταξύ της PrxI και της φωσφατάσης PTEN χρησιμοποιώντας υπολογιστικά μοντέλα (Guex & Peitsch, 1997).

2.4.2 Οξείδωση της φωσφατάσης PTEN από οργανικά υδροϋπεροξειδία.

Η δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN αναστέλλεται όπως το CuHP (Cumene hydroperoxide) και το t-BHT (tert-Butyl hydroperoxide), επειδή είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) και οργανικών υπεροξειδίων. Πιο συγκεκριμένα, το CuHP αλληλεπιδρά παρουσία μετάλλων μετάπτωσης με τις παράπλευρες αλυσίδες των λιπαρών οξέων, και από την αλληλεπίδρασή τους αυτή παράγονται οργανικά υδροϋπεροξείδια τα οποία με τη σειρά τους είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ελεύθερων ριζών, προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή και υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων. Κατά αντιστοιχία, το t-BHP μεταβολίζεται εκτενώς και τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού αυτού είναι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν αποπτωτικά φαινόμενα, υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων και καθιστούν την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων διαπερατή. Τα προϊόντα μεταβολισμού τόσο του CuHP όσο και του t-BHP προκαλούν οξείδωση της φωσφατάσης PTEN, κατά παρόμοιο μηχανισμό με το H_2O_2 σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των καταλοίπων Cys124 και Cys71, η οποία είναι μη αντιστρεπτή επειδή ταυτόχρονα απενεργοποιείται το σύστημα της Trx, λόγω του διμερισμού της (Gogvadze & Zhukova, 1991; Han et al., 2017; Zhang et al., 2017). Ωστόσο, οι Prx σύμφωνα με τα πειράματα που διεξήγαγαν οι Han et al. προστατεύουν την οξείδωση της φωσφατάσης PTEN από τα οργανικά υδροϋπεροξείδια (Han et al., 2017). Τα παραπάνω, φαίνονται σχηματικά στην εικόνα 2.4.2.1.



Εικόνα 2.4.2.1. Σχηματική περιγραφή του μοντέλου οξειδωκαναγωγικής ρύθμισης της φωσφατάσης PTEN επιδράση του CuHP. (Han et al., 2017)

2.4.3 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN μέσω μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέως.

Σε συνθήκες φλεγμονής ή αυξημένου οξειδωτικού στρες, ενδοκυτταρικά αυξάνονται τα επίπεδα αραχιδονικού (AA) και λινολεϊκού οξέως (LA), και επάγεται η δραστηριότητα των λιποξυγενασών (LOX) και ειδικότερα των 15-LOX. Οι 15-LOX είναι ένζυμα που καταλύουν τον σχηματισμό υδροϋπεροξυ-εικοσιτετραενικού οξέος HpETE, , το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς τον σχηματισμό εικοσαοειδών, οι οποίοι εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο (2) ισομορφές της ανθρώπινης 15-LOX, η 15-LOX-1 και η 15-LOX-2. Η 15-LOX-1 και καταλύει τον σχηματισμό 15s-HpETE, κυρίως και 12s-HpETE δευτερευόντως, από το αραχιδονικό οξύ. Τα προϊόντα αυτά, επάγουν την αντιστρεπτή οξείδωση της φωσφατάσης PTEN, κατά παρόμοιο τρόπο με το H₂O₂. Σημαντικός είναι ο ρόλος της PrxIII, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και αναστέλλει την επίδραση των 15s-HpETE και 12s-HpETE, ενεργοποιώντας το σύστημα της Trx. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο προστατεύει την φωσφατάση PTEN από φαινόμενα οξείδωσης είναι ακόμα αδιευκρίνιστος (Huu et al., 2021; Zhang et al., 2017).

2.4.4 Οξειδωτική αναστολή της φωσφατάσης PTEN μέσω S-νιτροζυλίωσης

Η S-νιτροζυλίωση είναι αντιστρεπτή οξειδωτική αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα μεταξύ του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της θειολικής ομάδας της κυστεΐνης (Cys), παρουσία ενός ατόμου δέκτη ηλεκτρονίων, όπως το O₂ ή ένα μέταλλο μετάπτωσης, ή μπορεί να πραγματοποιείται και τρανσ-νιτροζυλίωση από μια S-νιτροσοθειολική ομάδα (SNO) στη θειολική ομάδα ενός κατάλοιπου Cys (Foster et al., 2009). Πρόκειται για ρυθμιστικό μηχανισμό που επηρεάζει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN και συνεπώς λειτουργεί ρυθμιστικά και για το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.

Η S-νιτροζυλίωση λαμβάνει χώρα στο μόριο της φωσφατάσης PTEN επιδρώντας στη θειολική ομάδα του αμινοξικού καταλοίπου Cys-83, οπότε προκύπτει το παράγωγο μόριο SNO-PTEN (Foster et al., 2009). Η S-νιτροζυλίωση συμβαίνει στο συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο εξαιτίας των συνθηκών που δημιουργούνται από το περιβάλλον του, μιας και λαμβάνοντας υπ' όψιν την τρισδιάστατη δομή της φωσφατάσης, αυτό βρίσκεται κοντά στα αμινοξικά κατάλοιπα Asp-77 και Glu-114, που δημιουργούν ευνοϊκό περιβάλλον (Stamler et al., 1997). Μάλιστα, είναι δυνατή η S-τρανσ-νιτροζυλίωση μεταξύ της SNO-Akt και της φωσφατάσης PTEN, επειδή η φωσφατάση λειτουργεί ως καλύτερος δέκτης NO (Numajiri et al., 2011). Καταλύεται είτε άμεσα από την επίδραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) εξαιτίας των ενδοκυττάρων οξειδοαναγωγικών συνθηκών, είτε έμμεσα σε συνθήκες ανεπάρκειας της λιγάσης PARK2.

Το NO που παράγεται σε φυσιολογικές συνθήκες υπό τη δράση της eNOS, επιδρά στη φωσφατάση PTEN και προκύπτει το παράγωγο μόριο SNO-PTEN, το οποίο αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN και επάγει άμεσα το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι PIP3/Akt (Numajiri et al., 2011).

Η δεύτερη συνθήκη στην οποία παρατηρείται S-νιτροζυλίωση της φωσφατάσης PTEN είναι όταν το γονίδιο της λιγάσης PARK2 υπολείπεται, χαρακτηριστικό γνώρισμα στην ασθένεια του Parkinson. Η PARK2 είναι μια E3 λιγάση ουβικιτίνης η οποία εμφανίζει κρίσιμο ρόλο στην ουβικιτινίωση και την αποικοδόμηση των μορίων σε πρωτεασώματα. Λειτουργεί ως ρυθμιστής του βιοσηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt μέσω της φωσφατάσης PTEN (Gupta, Anjomani-Virmouni, Koundouros, & Poulogiannis, 2017; Gupta, Anjomani-Virmouni, Koundouros, Dimitriadi, et al., 2017). Η ρύθμιση του μονοπατιού μπορεί να γίνεται με δύο πιθανούς μηχανισμούς: είτε μέσω αλληλεπίδρασης της PARK2 με το υπόστρωμα υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 15 (Eps15) (Fallon et al., 2006), είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της AMPK με τον EGFR αυξητικό παράγοντα, προάγοντας έτσι την ουβικιτιλίωσή του (Lin et al., 2015). Η απώλεια της PARK2 έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα και μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την έκφρασή της (Gupta, Anjomani-Virmouni, Koundouros, Dimitriadi, et al., 2017). Επίσης, μειώνεται η μιτοχondριακή δραστηριότητα και συνεπώς τα επίπεδα ATP, οπότε ενεργοποιείται η κινάση AMPK (AMP-activated protein kinase- 5' ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση) ενώ ταυτόχρονα, αυξάνονται τα παραγόμενα ROS. Συνέπεια της ενεργοποίησης της AMPK είναι η επαγωγή μέσω φωσφορυλίωσης της eNOS που τελικά οδηγεί σε S-νιτροζυλίωση του μορίου της φωσφατάσης PTEN (Gupta, Anjomani-Virmouni, Koundouros, Dimitriadi, et al., 2017).

2.5 Παράγωγα ελευρωπαΐνης ως τροποποιητές της δραστηριότητας της PTEN στον καρκίνο

Το εξτρα παρθένο ελαιόλαδο περιέχει βιοδραστικές φαινόλες, όπως η (υδροξυ)τυροσόλη, η ελευρωπαΐνη, η ολεοκανθάλη, κ.ά., οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική νευροπροστατευτική και αντιπολλαπλασιαστική δράση ως προς τον καρκίνο στήθους, ωοθηκών, ήπατος και προστάτη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά επιτυγχάνονται σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως 200μM -1000μM και δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα πλήρως το προφίλ ασφαλείας τους. Τα παραπάνω οδήγησαν στην σύνθεση παραγώγων φαινολών, οι οποίες να εμφανίζουν πιο ισχυρές θεραπευτικές ιδιότητες με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες από μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Μεταξύ των διαφόρων παραγώγων, τα μόρια GS27 και GS28, είναι συνθετικά παράγωγα της ελευρωπαΐνης και εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και

υψηλή αντικαρκινική δράση έναντι καρκινικών σειρών παγκρέατος, ήπατος, τραχήλου της μήτρας, στήθους. Το GS28 αποτελείται από δύο τυροσυλομάδες, ενώ το GS27, που έχει μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό αποτελείται από δύο ομάδες, μια παλμιτική και μια υδροξυτυροσόλης. Το GS27, έχει προταθεί ότι αναστέλλει την σύνθεση των λιπαρών οξέων στοχεύοντας στο ένζυμο ACLY (ATP-citrate lyase, ACLY), που συνδέει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, ο οποίος παράγει κιτρικό ως ενδιάμεσο προϊόν, με τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, η οποία καταναλώνει ακετυλο-CoA.

Εν αντιθέσει με τα υγιή επιθηλιακά κύτταρα, που εξαρτώνται ενεργειακά από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα ωστόσο, προκειμένου να καλύψουν τις εξαιρετικά υψηλές τους ενεργειακές τους ανάγκες στρέφονται φυσιολογικά στην αερόβια γλυκόλυση και εξαρτώνται σε μικρότερο βαθμό από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Τα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των προστατικών καρκινικών κυττάρων προτιμούν εξ ολοκλήρου την πορεία της αερόβιας γλυκόλυσης ώστε να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες (Warburg effect) (Wu X., et al, 2014, Hatzivassiliou, G., et al, 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα προστατικά καρκινικά κύτταρα αρχικά καλύπτουν τις μεταβολικές τους ανάγκες στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στα προχωρημένα στάδια, ακολουθείται το Warburg effect (Ahmad et al, 2021). Η μεταβολή προς αερόβια γλυκόλυση διευκολύνει την διηθητική και την μεταστατική ικανότητα (invasion) των καρκινικών κυττάρων ενώ η συνεπαγόμενη αύξηση του pH του μικροπεριβάλλοντος γύρω από αυτά, συμβάλλει στην επικράτηση τους επί των υγιών κυττάρων, αφού τα τελευταία δεν έχουν μηχανισμούς επιβίωσης στο υπάρχον όξινο περιβάλλον (Gatenby, R., et al, 2004)

Ο καρκίνος προστάτη συχνά προκαλούμενος λόγω απώλειας έκφρασης του PTEN, σηματοδοτικά μπορεί να προκληθεί κατά τρόπο εξαρτώμενο της Akt, μέσω του μονοπατιού της PI3K/Akt ή μέσω αλληλεπίδρασής του με το p53. Μπορεί ωστόσο να προκληθεί και κατά τρόπο μη εξαρτώμενο της Akt, μέσω της ενεργοποίησης του c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) μονοπατιού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο PTEN δρα ως λιπιδική φωσφατάση αναστέλλοντας την FAS. Στα προστατικά καρκινικά κύτταρα ως συνέπεια της απώλειας PTEN και/ή του p53 παρατηρούνται αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων (metabolic reprogramming), με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της συνθετάσης λιπαρών οξέων (fatty acid synthase, FAS) μεταβάλλοντας έτσι τη de novo βιοσύνθεση λιπιδίων, και καθιστώντας έτσι τα προστατικά κύτταρα εξαιρετικά επιθετικά (Ahmad et al, 2021). Αυτό ακολουθείται και από αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της κιτρικής συνθάσης ATP (ATP-citrate lyase, ACLY), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποίησης της Akt, αυξάνοντας τα επίπεδα της pSer473Akt. Επιπλέον, σε καρκινικά δείγματα από βιοψίες ιστών, παρατηρείται ότι η αυξημένη έκφραση του ενζύμου ACLY, οδηγεί σε μετατόπιση της pAkt (translocation) στον πυρήνα των κυττάρων (Wu X., et al, 2014). Στο κυτταρόπλασμα των προστατικών καρκινικών κυττάρων, η χοληστερόλη εντοπίζεται αποθηκευμένη στο κυτταρόπλασμα, ως εστέρας χοληστερόλης σε μορφή σταγονιδίων (droplets).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα προαναφερθέντα, η αναστολή του επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού λιπιδίων (lipid reprogramming), θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για την πρόληψη και την θεραπεία του καρκίνου του προστάτη (Zhou X., et al, 2019).

Στόχος

Ο στόχος της παρούσας ερευνητικής μεταπτυχιακής εργασίας, είναι η μελέτη της επίδρασης συνθετικών παραγώγων ελευρωπαΐνης, *in vitro* στην ενζυμική δραστηριότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN. Επιπλέον, η μελέτη των αναστολέων της κινάσης PI3K σε τέσσερις διαφορετικές καρκινικές σειρές, τρεις προστατικές καρκινικές σειρές και μια προερχόμενη από καρκίνο του στήθους, με διαφορετικό προφίλ έκφρασης της φωσφατάσης PTEN καθώς και της συνεπίδρασης αυτών με τα προαναφερθέντα συνθετικά παράγωγα της ελευρωπαΐνης, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το βιοσηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/PTEN/Akt.

3 Πειραματική πορεία

3.1 Πειράματα *In vitro*

3.1.1 Καλλιέργεια - Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών

Το τεχνητό περιβάλλον και οι συνθήκες ανάπτυξης μιας καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων διαφέρουν ανάλογα με το είδος του υπό καλλιέργεια βακτηρίου. Οι καλλιέργειες των βακτηριακών κυττάρων γίνεται είτε σε υγρό είτε σε στερεό είτε σε ημιστερεό (υγρό-στερεό) θρεπτικό υλικό, το οποίο παρέχει την απαραίτητη πηγή ενέργειας, άνθρακα και αζώτου, ανόργανων αλάτων και πιθανώς βιταμινών και άλλων θρεπτικών συστατικών για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων. Οι στερεές και οι ημιστερεές καλλιέργειες περιέχουν άγαρ, έναν πολυσακχαρίτη με μηδενική θρεπτική αξία που προέρχεται από το *Rhodophyceae* και ο οποίος στερεοποιεί το θρεπτικό υλικό

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται στα πειράματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι το Luria-Bertani (LB) broth, το οποίο περιέχει 10g Tryptone, 5g εκχύλισμα ζύμης και 10g NaCl.

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται είναι το *Escherichia coli* BL21 DE3. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος επειδή περιέχει τον DE3 λυσογόνο φάγο, ο οποίος περιέχει το γονίδιο της T7 πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του επαγωγίμου εκκινητή lacUV5, καταστολέα του lacIq.. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που επιθυμούμε να υπερεκφράσουμε ελέγχεται από το οπερόνιο λακτόζης. Έτσι, καθίσταται δυνατή η έκφραση της T7 πολυμεράσης μετά από επαγωγή με το IPTG (ισοπροπυλο β,D-θειογαλακτοζιδάση, isopropyl b-D thigalatosidase). Το IPTG (ισοπροπυλο-β,D-θειογαλακτοζιδάση) είναι το δομικό ανάλογο της αλλολακτόζης, που αδρανοποιεί τον καταστολέα lac (lacI) του πλασμιδιακού φορέα, επομένως επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών που μεταγράφονται υπό τον έλεγχο του χειριστή του οπερονίου. Επομένως, το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας της έκφρασης του οπερονίου της λακτόζης και μιμείται το φυσικό επαγωγέα του οπερονίου, την αλλολακτόζη.

Η διαδικασία που ακολουθείται για στερεές καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλία 100cm είναι η εξής.

Υλικά-Συσκευές:

- Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια (10mL)
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων (Ø 100cm)
- Κλίβανος
- Φίλτρο 0,2µm sterile ()
- P10, P100

- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022). Για θρεπτικό υλικό όγκου 1lt, ζυγίζονται και διαλύονται 20g LB broth σε 1lt ddH₂O αποστειρωμένο. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο για 20min.
- Θρεπτικό υλικό: LB broth with agar (Sigma, L2897). Για θρεπτικό υλικό LB με agar όγκου 1lt διαλύονται 20g LB broth with agar και διαλυτοποιούνται σε 1lt ddH₂O αποστειρωμένο. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο για 20min. Μετά την αποστείρωση αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία περίπου 55° C και προστίθεται το αντίστοιχο αντιβιοτικό.
- ddH₂O αποστειρωμένο
- Ampicillin sodium salt (#)
Διάλυμα αρχικό(??) (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αμπικιλίνης και διαλυτοποιείται σε αποστειρωμένο ddH₂O και στην συγκεκριμένα φιλτράρεται και αποστειρώνεται με φίλτρο. Στην βακτηριακή καλλιέργεια η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιείται (working concentration) είναι 50μg/mL.

Πειραματική πορεία:

1. Παρασκευή τρυβλίων LB agar με Amp: Μοιράζονται περίπου 10mL θρεπτικού υλικού LB agar με Amp υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματοειδούς ροής, και τα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθούν. Στη συνέχεια φυλάσσονται ανεστραμμένα στους 4° C.
2. Τοποθετείται το τρυβλίο με το LB agar στους 37° C στον επωαστικό θάλαμο, ούτως ώστε να στεγνώσει.
3. Δουλεύοντας κοντά στην φλόγα, σε Eppendorf μεταφέρονται 100μL LB broth και χρησιμοποιώντας την P100 παραλαμβάνεται βακτηριακός πληθυσμός από το Stock γλυκερόλης και διαλυτοποιείται στον όγκο του θρεπτικού υλικού.
4. Με την P100 μεταφέρω το θρεπτικό υλικό με τα βακτήρια στην επιφάνεια του LB agar και απλώνω με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.
5. Το τρυβλίο επωάζεται overnight στους 37° C και την επόμενη ημέρα αφού έχουν σχηματιστεί μονήρεις βακτηριακές αποικίες κλείνεται περιμετρικά με parafilm και φυλάσσεται στους 4° C.

3.1.2 Παρασκευή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21.

Για την επιτυχημένη έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN σε βακτηριακά κύτταρα BL21 DE3, αρχικά είναι αναγκαίο τα κύτταρα αυτά να καταστούν (επι)δεκτικά (competent) στην εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA. Η «επιδεκτικότητα» αυτή των βακτηριακών κυττάρων έγκειται στο ότι η μεμβράνη τους καθίσταται διαπερατή στο πλασμιδιακό DNA, το οποίο φέρει και το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης και έτσι γίνεται ο μετασχηματισμός τους (Transformation). Τα competent βακτηριακά κύτταρα μπορεί να παρασκευαστούν είτε με χημικά μέσα, χρησιμοποιώντας CaCl_2 είτε με φυσικά μέσα, μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας, τα BL21 κατέστησαν competent μέσω της μεθόδου χημικής κατεργασίας. Η αρχή στην οποία βασίζεται η τεχνική είναι ότι τα ιόντα ασβεστίου λειτουργούν ως κατιονικές γέφυρες μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης κυτταρικής λιπιδικής στοιβάδας και της θετικά φορτισμένης φωσφορικής αλυσίδας του DNA, διευκολύνοντας έτσι την σύνδεση του πλασμιδιακού DNA στην κυτταρική επιφάνεια. Στην συνέχεια, το DNA εισέρχεται στο κύτταρο μετά από θερμικό σοκ και τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναγνωρίζονται μέσω της αντοχής τους στο εκάστοτε αντιβιοτικό.

Υλικά-Συσκευές:

- Falcon (15mL, 50mL) αποστειρωμένα
- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφόνια (10mL, 15mL)
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων ($\varnothing$ 100cm)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Φίλτρο 0,2 μm sterile
- Λύχνος
- Επωαστήρας ανάδευσης
- Φασματοφωτόμετρο
- Αποστειρωμένη κωνική φιάλη 250mL
- Πάγος
- P100

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022)
- ddH₂O αποστειρωμένο
- Ampicillin sodium salt
Διάλυμα αρχικό (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Συγκέντρωση εργασίας (working concentration) 50 $\mu\text{g/mL}$.
- 0,1M CaCl_2 : ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα CaCl_2 διαλυτοποιείται σε ddH₂O αποστειρωμένο και στη συνέχεια φιλτράρεται με φίλτρο 0,2 μm .

- 50% γλυκερόλη: διαλυτοποιείται ο αντίστοιχος όγκος γλυκερόλης σε ddH₂O αποστειρωμένο και στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται στον κλίβανο.
- 0,1M CaCl₂ 15% γλυκερόλη: ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα CaCl₂ διαλυτοποιείται σε διάλυμα 15% γλυκερόλης-ddH₂O αποστειρωμένο.
- Τρυβλία LB άγαρ

Πειραματική πορεία:

1. Εμβολιάζονται 5mL θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό με μία μονήρη αποικία E. Coli από το τρυβλίο και επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm).
2. Επιμολύνονται 50mL θρεπτικού υλικού LB σε κωνική φιάλη 250mL με 1mL από την κορεσμένη (ο/ν) βακτηριακή καλλιέργεια και επωάζονται εκ νέου στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm), για περίπου 3hrs έως να φτάσει η οπτική πυκνότητα του θρεπτικού στα 600nm (OD₆₀₀) να φτάσει περίπου την τιμή 0,4.
3. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένο falcon υπό ασηπτικές συνθήκες και φυγοκεντρείται στα 3000rpm για 20mins στους 0° C και στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται.
4. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 25mL αποστειρωμένο παγωμένο 0,1M CaCl₂. Στο συγκεκριμένο στάδιο, η επαναδιαλυτοποίηση δεν γίνεται με vortex αλλά με χρήση P1000 με ήπιους χειρισμούς.
5. Το αιώρημα βακτηριακών κυττάρων επωάζεται σε πάγο για 15mins και στην συνέχεια φυγοκεντρείται στα 3000rpm για 20mins στους 0° C και στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται.
6. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 3,3mL αποστειρωμένο παγωμένο 0,1M CaCl₂ 15% γλυκερόλη. Στο συγκεκριμένο στάδιο, η επαναδιαλυτοποίηση δεν γίνεται με vortex αλλά κατά παρόμοιο τρόπο με το στάδιο 5.
7. Το αιώρημα των δεκτικών πλέον βακτηριακών κυττάρων BL21 επωάζεται για 4hrs και στην συνέχεια αλικοκυττάρεται σε 100μL Eppendorf και φυλάσσεται στους -80° C.

3.1.3 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli BL21 (transformation of chemically competent E.coli BL21)

Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων έγκειται στην διαδικασία κατά την οποία τα βακτηριακά κύτταρα λαμβάνουν ξένο πλασμιδιακό DNA, με σκοπό να εκφράσουν το γονίδιο της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης-στόχου. Με την εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA, τα βακτήρια γίνονται ανθεκτικά στο αντιβιοτικό της αμικικιλίνης και επομένως είναι δυνατή η επιλογή τους έναντι αυτών που δεν έχουν μετασχηματιστεί με επιτυχία. Αυτό επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ, διαδικασία η οποία

αποτελείται από τρία στάδια: πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA στην κυτταρική μεμβράνη των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, εισαγωγή του πλασμιδιακού DNA εντός των κυττάρων μέσω των μεμβρανών τους λόγω της αποδιάταξής τους ως συνέπεια του θερμικού σοκ και τελικά ανάνηψη των κυττάρων (Rahimzadeh M et al, 2016).

Υλικά-Συσκευές:

- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Falcon (15mL) αποστειρωμένα
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων με αμπικιλίνη (Ø 100cm)
- Λύχνος
- Επωαστήρας ανάδευσης
- Υδατόλουτρο
- P1000, P10
- Πάγος
- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022)
- Ampicillin sodium salt
Διάλυμα αρχικό (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Συγκέντρωση εργασίας (working concentration) 50μg/mL.
- Τρυβλία LB άγαρ με αμπικιλίνη
- pGEX-6p-1- GST-PTEN

Πειραματική πορεία:

1. Ένα Eppendorf με δεκτικά κύτταρα BL21 αφήνεται να ξεπαγώσει σταδιακά στον πάγο για περίπου 30mins.
2. Προστίθενται 2μl πλασμιδιακού DNA pGEX-6p-1 GST-PTEN WT και αναδεύονται πολύ απαλά.
3. Τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για 30mins, προκειμένου το πλασμίδιο να προσκολληθεί στις μεμβράνες των κττάρων.
4. Τα κύτταρα επωάζονται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 42° C για χρόνο ακριβώς 30sec.
5. Τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για ακριβώς 2mins.
6. Προστίθεται 1mL LB μέσου με αμπικιλίνη και το αιώρημα επωάζεται στους 37° C στον επωαστήρα ανάδευσης στους 250rpm για 1hr.

7. Το αιώρημα των βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρείται στην μικροφυγόκεντρο για 1min σε RT και απορρίπτονται περίπου 600μl, ενώ στον υπολειπόμενο όγκο υπερκειμένου επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα των κυττάρων, υπό ασηπτικές συνθήκες.
8. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο με LB agar με αμπικιλίνη και το τρυβλίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει και στην συνέχεια επωάζεται ανεστραμμένο στους 37° C overnight.
9. Την επόμενη ημέρα η καλλιέργεια φυλάσσεται στους 4° C. Τα κύτταρα που σχηματίζει αποικίες είναι εκείνα τα οποία έχουν προσλάβει επιτυχώς το πλασμιδιακό DNA.

3.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με εφαρμογή τριών πρωτοκόλλων: homemade mini-prep με χρήση μεθόδου boiling και με χρήση της μεθόδου Birnboim/Dolly.

3.1.4.1 *Boiling method mini-prep απομόνωση πλασμιδιακού DNA*

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται με τη μέθοδο βρασμού, παρουσία παραγόντων που αποδυναμώνουν το κυτταρικό βακτηριακό τοίχωμα, το γονιδιωματικό DNA και οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και το πλασμιδιακό DNA τελικά παραλαμβάνεται με την επίδραση ισοπροπανόλης.

Υλικά-Συσκευές:

- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Falcon (15mL) αποστειρωμένα
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφόνια (5mL)
- Λύχνος
- Επωαστήρας ανάδευσης
- Μικροφυγόκεντρος (ψυχόμενη)
- Heatblocker
- Nanodrop
- Πάγος
- P1000, P10
- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022)
- Ampicillin sodium salt
Διάλυμα αρχικό (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Συγκέντρωση εργασίας (working concentration) 50μg/mL.
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN με αμικικιλίνη (Ø 100cm)
- EtOH absolut
- 1M Tris pH 8: ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα Tris-HCl, διαλυτοποιείται σε ddH₂O και ρυθμίζεται το pH στην επιθυμητή τιμή με NaOH pH 4.
- 0,5M EDTA
- 10% Triton X-100
- TE buffer
- STET buffer: 8% σουκρόζη, 0,5% Triton X-100, 50mM Tris-HCL pH 8, 50mM EDTA

Πειραματική πορεία:

1. Εμβολιάζονται 3mL θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό με μία μονήρη αποικία E. Coli BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN από το τρυβλίο και επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm) overnight.
2. Δουλεύοντας δίπλα σε φλόγα, μεταφέρονται 1,5mL overnight καλλιέργειας στην μικροφυγόκεντρο για 3mins σε RT, το υπερκείμενο απορρίπτεται αναστρέφοντας το Eppendorf.
3. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 200μl STET buffer κάνοντας δυνατό vortex
4. Το αιώρημα θερμαίνεται στο heatblocker στους 100° C για 1min.
5. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 13000rpm για 6mins σε RT και το ίζημα απορρίπτεται με χρήση P1000.
6. Στο υπερκείμενο προστίθενται 500μl EtOH absolut και επωάζεται στους -80° C για 5 mins.
7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 13000rpm για 15mins στους 4° C και απορρίπτεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα αφήνεται σε θερμοκρασία RT για 5-10mins.
8. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε TE buffer. Από το διάλυμα λαμβάνονται 1μL και το αραιώνονται σε 99 μL dH₂O και μετριέται η απορρόφηση του δείγματος στο nanodrop. Μέσω της απορρόφησης του δείγματος στο Nanodrop μετράται η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA. Τέλος, ελέγχεται το παραγόμενο πλασμιδιακό DNA μέσω ηλεκτροφόρησης gel agarose.

3.1.4.2 Birnboim/Dolly mini-prep απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Υλικά-Συσκευές:

- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Falcon (15mL) αποστειρωμένα
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφόνια (5mL)
- Λύχνος
- Επωαστήρας ανάδευσης
- Μικροφυγόκεντρος (ψυχόμενη)
- Heatblocker
- Nanodrop
- Πάγος
- P1000, P100, P10
- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022)
- Ampicillin sodium salt
Διάλυμα αρχικό (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Συγκέντρωση εργασίας (working concentration) 50μg/mL.
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN με αμπικιλίνη (Ø 100cm)
- 1M Tris pH 8: ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα Tris-HCl, διαλυτοποιείται σε ddH₂O και ρυθμίζεται το pH στην επιθυμητή τιμή με NaOH pH 4.
- 0,5M EDTA
- KOAc
- NaOH
- Οξικό οξύ
- EtOH 70%
- Isopropanol
- 10% SDS: ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα SDS και διαλυτοποιείται σε ddH₂O.
- Resuspension buffer: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA
- Lysis buffer: 200mM NaOH, 1% SDS
- Neutralization buffer: 3M KOAc, για την παρασκευή του ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα, διαλυτοποιείται σε ddH₂O και ρυθμίζεται το pH Στην τιμή 5 με οξικό οξύ.
- TE buffer

Πειραματική πορεία:

1. Εμβολιάζονται 5mL θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό με μία μονήρη αποικία E. Coli BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN από το τρυβλίο και επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm) overnight.
2. Δουλεύοντας δίπλα σε φλόγα, μεταφέρονται 1,5mL overnight καλλιέργειας στην μικροφυγόκεντρο για 3mins σε RT, το υπερκείμενο απορρίπτεται αναστρέφοντας το Eppendorf. Η πορεία επαναλαμβάνεται μέχρι να παραληφθεί όλη η ποσότητα της overnight culture.
3. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250μl Resuspension buffer.
4. Στο αιώρημα προστίθενται 250μl Lysis buffer και το διάλυμα ομογενοποιείται αντιστρέφοντας το Eppendorf οκτώ φορές.
5. Στο αιώρημα προστίθενται 300μl Neutralization buffer και το διάλυμα ομογενοποιείται αντιστρέφοντας το Eppendorf οκτώ φορές.
6. Το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 15000rpm για 15mins στους 20° C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf.
7. Στο υπερκείμενο προστίθενται 560μl isopropanol.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 15000rpm για 30mins στους 20° C και απορρίπτεται το υπερκείμενο, ενώ στο ίζημα προστίθενται 200μL 70% EtOH.
9. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 15000rpm για 30mins στους 20° C και απορρίπτεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5-10mins.
10. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε TE buffer. Από το διάλυμα λαμβάνονται 1μL και το αραιώνονται σε 99 μL ddH₂O και μετριέται η απορρόφηση του δείγματος στο nanodrop. Τέλος, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA ελέγχεται με απορρόφηση τους δείγματος στο Nanodrop και με agarose ηλεκτροφόρηση.

3.1.5 Έκφραση ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN σε βακτηριακά κύτταρα BL21

Η έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα BL21 με το πλασμίδιο pGEX-6p-1-GST-PTEN

Υλικά-Συσκευές:

- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Falcon (15mL, 50mL) αποστειρωμένα
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια (5mL, 10mL)
- Λύχνος
- Επωαστήρας ανάδευσης

- Φυγόκετρος ψυχόμενη
- Heatblocker
- Φίλτρο 0,22μm
- Κωνικές φιάλες αποστειρωμένες (250mL, 500mL, 1000mL)
- Πάγος
- P1000, P100, P10
- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό υλικό: LB broth (Sigma, L3022)
- Ampicillin sodium salt
Διάλυμα αρχικό (stock solution) 100mg/mL ampicillin. Συγκέντρωση εργασίας (working concentration) 50μg/mL.
- Τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN με αμπικιλίνη (Ø 100cm)
- 1M IPTG: ζυγίζεται η αντίστοιχη ποσότητα IPTG και διαλυτοποιείται ddH₂O αποστειρωμένο και αποστειρώνεται με φίλτρο 0,2μm. Working concentration: 100μM

Πειραματική πορεία:

1. Εμβολιάζονται 22mL θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη (50μg/mL) με μία μονήρη αποικία E. Coli BL21-pGEX-6p1-GST-PTEN από το τρυβλίο και επωάζονται στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm) overnight.
2. Επιμολύνονται 1000mL θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη (50μg/mL) σε κωνική φιάλη από την κορεσμένη (ο/ν) βακτηριακή καλλιέργεια σε αραιώση 1:50 και επωάζονται εκ νέου στους 37° C υπό ανάδευση (250rpm), για περίπου 3hrs έως να φτάσει η οπτική πυκνότητα του θρεπτικού στα 600nm (OD₆₀₀) να φτάσει περίπου την τιμή 0,6.
3. Μόλις φτάσει η οπτική πυκνότητα του θρεπτικού στα 600nm (OD₆₀₀) περίπου την τιμή 0,6 παραλαμβάνονται 1mL καλλιέργειας και φυγοκεντρώνται για 3min, οπότε το ίζημα διαλυτοποιείται σε LB1x και φυλάσσεται το δείγμα στους -80° C. Στον υπόλοιπο όγκο της καλλιέργειας, προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 100μM και αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 20μg/mL.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 20° C overnight και υπό ανάδευση στα 250rpm.
5. Παραλαμβάνονται 1 mL καλλιέργειας overnight και φυγοκεντρώνται για 3min, οπότε το ίζημα διαλυτοποιείται σε LB1x +β-merc και φυλάσσεται το δείγμα στους -80° C.
6. Ο συνολικός όγκος της Overnight καλλιέργειας χωρίζεται σε falcon των 50mL αποστειρωμένα και φυγοκεντρώνται στα 5500rpm στους 4° C για 20mins και το ίζημα φυλάσσεται στους -80° C.

7. Τα δυο δείγματα που έχουν παραληφθεί και προετοιμαστεί ελέγχονται ως προς την έκφραση της GST-PTEN με SDS ηλεκτροφόρηση.

3.1.6 Απομόνωση και καθαρισμός ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN

Υλικά-Συσκευές:

- Eppendorf 1,5mL αποστειρωμένα
- Falcon (15mL) αποστειρωμένα
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια (5mL, 10mL)
- Φυγόκετρος ψυχόμενη
- Heatblocker
- Πάγος
- P1000, P100, P10
- Αποστειρωμένα tips

Αντιδραστήρια:

- Tris-HCl pH 7,4
- 1M NaCl
- 400mM EGTA
- 10% Triton X-100
- Protease inhibitors (Sigma P3840)
- 0,1 M PMSF: ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα και διαλυτοποιείται σε EtOH
- 10mg/mL Lysozyme :ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα και διαλυτοποιείται σε 10mM Tris-HCl pH 8.
- 0,2M Benzamidine: ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα και διαλυτοποιείται σε ddH₂O αποστειρωμένο.
- 5mg/mL Leupeptine (Sigma, L2884): διαλυτοποιείται η κατάλληλη ποσότητα σε ddH₂O αποστειρωμένο και το διάλυμα ομογενοποιείται με έντονο vortex.
- B-Mercaptoethanol
- 1M DTT: ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα και διαλυτοποιείται σε ddH₂O αποστειρωμένο.
- Glutathione Affinity resin (Sigma, G3907)
- Διαλύματα εργασίας:

Lysis Buffer (55mL)	Wash buffer (200mL)	Elution buffer (0,5mL)
50mM tris pH 7,4	50mM tris pH 7,4	50mM tris pH 7,4

150mM NaCl	150mM NaCl	150mM NaCl
0.5mM EGTA	0.5mM EGTA	0.5mM EGTA
1% Triton X-100	0,1% beta-mercaptoethanol	2mM DTT
0,1% beta-mercaptoethanol	Protease inhibitors 1:500	20mM glutathione readjusted to pH 7,5 at 4° C
Protease inhibitors 1:500	0,2mM PMSF	
0,2mM PMSF	1mM benzamidine	
1mg/mL lysozyme	50μg/mL leupeptine	
1mM benzamidine		
50μg/mL leupeptine		

Πειραματική πορεία:

- 1) Πέντε falcon με pellets βακτηριακής καλλιέργεια συνολικού όγκου 250mL αφήνονται να ξεπαγώσουν σταδιακά στον πάγο.
- 2) Σε κάθε falcon προστίθενται 1-10mL Lysis buffer και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα, κάνοντας δυνατό vortex και χρησιμοποιώντας 20g σύριγγα, τα pellets αναδιασπείρονται και συλλέγονται τελικά σε ένα falcon.
- 3) Τα αιωρήματα υπόκεινται σε υπέρηχους 8X15sec bursts (60% amplitude), ενώ βρίσκονται στον πάγο, έως ότου το χρώμα τους αλλάξει από κρεμώδες σε υποκίτρινο (Light brown)
- 4) Το αιώρημα επωάζεται για 40mins στους 4° C στην σούβλα.
- 5) Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 6000rpm, για 40mins στους 4° C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon (50mL). Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (Lysate) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x.
- 6) Η Glutathione Affinity στήλη ομογενοποιείται με αντιστροφή της με ήπιες κινήσεις. Παραλαμβάνονται 0,5mL στήλης και μεταφέρονται σε falcon 15mL, σε αυτά προστίθενται 3mL Lysis buffer, οπότε φυγοκεντρούνται στα 500rpm για 2min στους 4° C και απορρίπτεται προσεκτικά το υπερκείμενο.
- 7) Επαναλαμβάνεται το στάδιο 6 δύο φορές και τελικά στο ίζημα (στήλη) προστίθεται 1mL Lysis buffer, οπότε μεταφέρεται στο υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του σταδίου 5.
- 8) Το αιώρημα επωάζεται για 2hrs στους 4° C, και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (Load flowthrough) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- 9) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100mL Wash buffer και το αιώρημα επωάζεται στους 4° C για 15mins. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το

υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (#1 wash) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.

- 10) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 50mL Wash buffer και το αιώρημα επωάζεται στους 4° C για 15mins. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (#2 wash) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- 11) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100mL Wash buffer και το αιώρημα επωάζεται στους 4° C για 15mins. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (#3 wash) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- 12) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 50mL Wash buffer και το αιώρημα επωάζεται στους 4° C για 15mins. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (#4 wash) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- 13) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100mL Wash buffer και το αιώρημα επωάζεται στους 4° C για 15mins. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 100μL (#5 wash) και προστίθεται LB6x όγκος ώστε να γίνει LB1x και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- 14) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5mL Elution buffer και φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Συλλέγεται το υπερκείμενο (E1 elution) και φυλάσσεται στους -80° C.
- 15) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5mL Elution buffer και φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Συλλέγεται το υπερκείμενο (E2 elution) και φυλάσσεται στους -80° C.
- 16) Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 0,5mL Elution buffer και φυγοκεντρείται στις 1000rpm στους 4° C για 3mins. Συλλέγεται το υπερκείμενο (E3 elution) και φυλάσσεται στους -80° C.

Τα δείγματα υπόκεινται σε Western Blot με αντίσωμα PTEN και ποσοτικοποιούνται με πρότυπη καμπύλη BSA, το gel στο οποίο πραγματοποιείται βάφεται με Coomassie Blue.

3.1.7 Green malachite assay

Η δοκιμή Green malachite είναι μια χρωματομετρική μέθοδος με την οποία μετρούνται τα ελεύθερα ορθοφωσφορικά ιόντα τα οποία απελευθερώνονται από την αντίδραση μεταξύ της λιπιδικής φωσφατάσης PTEN με το λιπιδικό υπόστρωμα PIP3. Πιο συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο Green malachite περιέχει μολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο αντιδρώντας με τα ελεύθερα ορθοφωσφορικά ιόντα που απελευθερώνονται από την δράτικότητα της λιπιδικής φωσφατάσης PTEN, σχηματίζει σύμπλοκο πράσινου χρώματος, το οποίο φωτομετρείται στα 620nm.

Υλικά- Συσκευές:

- 96well plate
- Φασματοφωτόμετρο
- 1,5mL eppendorf
- P10, P200

Αντιδραστήρια:

- Green Malachite (Enzo, CAT. NO: BML-AK 111-0250)
- diC8 PIP3: διαλυτοποιημένο σε ddH₂O σε τελική συγκέντρωση 1mM (stock concentration).
- GST-PTEN απομονωμένη όπως αναφέρεται σε προηγούμενη υποενότητα. Η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος της απομονωμένης GST-PTEN ποικίλλει ανάλογα με το batch.
- Assay buffer 5x: 250mM Tris-HCl pH8, 10mM DTT.

Πειραματική πορεία:

Η δοκιμασία Green Malachite, πραγματοποιείται σε τελικό όγκο ενζυμικής αντίδρασης 50μL. Στην αντίδραση συμμετέχουν 3-6μg/μL GST-PTEN, 60μM diC8 PIP3, η προς μελέτη ένωση-παράγωγο ελευρωπαΐνης, 5x Assay buffer και συμπληρώνεται ο υπολειπόμενος όγκος με ddH₂O. Η ενζυμική αντίδραση επώάζεται στους 37° C, υπό ανάδευση για 30min και τελικά σταματά με την προσθήκη 150μL Green Malachite αντιδραστηρίου. Το μείγμα επώάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20min και μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 620nm.

3.2 Πειράματα σε κυτταρικές σειρές

3.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια ευκαριωτικών κυττάρων

Το θρεπτικό μέσον που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων είναι το RPMI 1640, το οποίο περιέχει L-Glutathione, βιοτίνη, βιταμίνη B12, παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και ψηλές συγκεντρώσεις ινοσιτόλης και χολίνης. Το σύστημα διττανθρακικού νατρίου () που χρησιμοποιεί απαιτεί περιβάλλον 5% CO₂ για τη διατήρηση του φυσιολογικού για την ανάπτυξη την κυτταροκαλλιέργειών pH. Στο θρεπτικό μέσον προστίθεται επιπλέον απενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοός (FBS) σε ποσοστό 10% (v/v) , ο οποίος παρέχει στα κύτταρα αυξητικούς παράγοντες και

παράγοντες προσκόλλησης, πρωτεΐνες, λιπίδια και ορμόνες σε σύνθεση που διαφέρει από παρτίδα σε παρτίδα. Επιπλέον, προστατεύει τα κύτταρα από ακραίες μετατοπίσεις του pH και από τοξικούς παράγοντες.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

DU-145: κυτταρική σειρά με επιθηλιακή μορφολογία που αναπτύσσονται ως προσκολλημένα κύτταρα, με χρόνο αναδιπλασιασμού τις 34-40hrs. Απομονώθηκε από τον εγκέφαλο ενός λευκού άνδρα 69 ετών, ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη. Τα DU-145 κύτταρα δεν εκκρίνουν το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), δεν εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων, ενώ εκφράζουν φυσιολογικά την PTEN.

PC3: κυτταρική σειρά που αναπτύσσεται ως προσκολλημένα κύτταρα, με χρόνο αναδιπλασιασμού τις 35-40hrs. Απομονώθηκε από τα οστά ενός λευκού άνδρα 62 ετών, ασθενή με προστατικό αδενοκαρκίνωμα. Τα PC3 δεν εκκρίνουν το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), δεν εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων, ενώ δεν εκφράζουν φυσιολογικά την PTEN (PTEN null).

MCF-7: καρκινική σειρά που αναπτύσσεται συνήθως ως προσκολλημένα κύτταρα με χρόνο αναδιπλασιασμού 24hrs. Απομονώθηκε από λευκή γυναίκα 69 ετών, ασθενή με αδενοκαρκίνωμα του μαστού τύπου 1. Τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων και φυσιολογικά την PTEN.

3.2.2 Κρυοσυντήρηση

Η κρυοσυντήρηση είναι διαδικασία με την οποία δίνεται η δυνατότητα να φυλάσσονται κύτταρα, ιστοί ή όργανα σε ατμούς υγρού αζώτου, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μεταγενέστερη χρονική περίοδο.

Η διαδικασία της κρυοσυντήρησης των κυτταρικών σειρών λαμβάνει χώρα όταν το ταπήτιο του τρυβλίου στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα καλύπτεται σε ποσοστό 80-90%. Στην κατάσταση αυτή, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης (freezing medium) που περιέχει το εκάστοτε πλήρες θρεπτικό μέσον σε ποσοστό 90% (v/v) και διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε ποσοστό 10%(v/v). Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό μέσον και συμβάλλει στην αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων νερού στο θρεπτικού υλικό κατάψυξης, οι οποίοι καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη και έτσι μειώνεται η βιοσημότητα των κυττάρων μετά την απόψυξη, καθώς επίσης αυξάνει και την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών επιτρέποντας έτσι στο νερό να διαχέεται πιο ελεύθερα μεταξύ των μεμβρανών (Whaley D, et al, 2021).

Σημαντικός παράγοντας για την βιοσημότητα των κυττάρων μετά την απόψυξη είναι και ο ρυθμός κατάψυξης και απόψυξης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα κύτταρα προς κρυοσυντήρηση αρχικά τοποθετούνται overnight στους -80° C σε ειδικό δοχείο το οποίο περιέχει ισοπροπρυλική αλκοόλη και επιτρέπει στα κύτταρα να παγώνουν με ρυθμό ενός βαθμού το λεπτό. Κατά

αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού. Στη συνέχεια τα φιαλίδια φυλάσσονται σε ατμούς υγρού αζώτου. Για την απόψυξη των κυττάρων, τα φιαλίδια μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C και επωάζονται για 3-5 λεπτά, οπότε και μεταφέρονται σε τρυβλίο με πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρούνται στις 2500rpm για 5 min, ώστε να απομακρυνθεί το DMSO και στρώνονται σε τρυβλίο με πλήρες θρεπτικό υλικό.

3.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων (splitting) συμβαίνει ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς και τον χρόνο αναδιπλασιασμού της, ώστε να εξασφαλίζεται η ομαλή ανάπτυξή τους. Λαμβάνει χώρα όταν το ταπήτιο του τρυβλίου καλύπτεται από κύτταρα σε ποσοστό 80-90%.

Η διαδικασία που ακολουθείται για ένα τρυβλίο 100cm είναι η εξής:

Υλικά- Συσκευές:

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- Επωαστικός θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (37° C), 5% CO₂.
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- Σύστημα αυτόματης αναρρόφησης υγρών
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια (5mL, 10mL)
- Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (Ø 100cm)
- P1000

Αντιδραστήρια

- Θρεπτικό υλικό: RPMI
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum,FBS)
- L-glutamine, 200mM
- Penicillin-Streptomycin Solution 100x
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS-saline, pH7,4
- Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (1x)
- Διάλυμα εργασίας: πλήρες θρεπτικό μέσον που περιέχει 10%v/v FBS, 1% Penicillin-Streptomycin Solution 100x, 1% L-glutamine, 200mM. Όλα τα επιμέρους συστατικά του πλήρους θρεπτικού μέσου καθώς και το ίδιο, όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37° C, ενώ φυλάσσονται στους 4° C.

Πειραματική πορεία:

1. Παρατήρηση της καλλιέργειας των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και εξέτασή της ως προς τη μορφολογία των κυττάρων και εάν έχει σχηματιστεί πλήρες ταπήτιο (80% ταπήτιο).
2. Αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα και πλύση τους με 4mL αποστειρωμένου διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS 1x (Phosphate Buffered Saline 1x), οπότε απομακρύνονται υπολείμματα ορού FBS ο οποίος είναι συστατικό του θρεπτικού μέσου και αδρανοποιεί τη θρυψίνη. Κατά την έκπλυση του τρυβλίου, είναι σημαντικό να παραμένει το πιάτο υπό κλίση.
3. Προσθήκη 1mL θρυψίνης 1x και επώαση στον incubator (37° C) μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα.
4. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα κύτταρα πιπετάρονται έντονα με σκοπό να γίνουν μονήρη και να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια προστίθενται 4 mL πλήρους θρεπτικού μέσου, ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και τα κύτταρα μεταφέρονται με αποστειρωμένο σιφόνιο σε 15mL falcon.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 2500rpm για 5min στους 25° C και το υπερκείμενο αναρροφάται προσεκτικά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 1mL θρεπτικού μέσου και μεταφέρεται τελικά η επιθυμητή ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος σε νέο τρυβλίο το οποίο περιέχει 10mL πλήρους θρεπτικού μέσου ή σε multiwell πιάτα με αντίστοιχο όγκο πλήρους θρεπτικού μέσου.

3.2.4 Μέτρηση κυττάρων

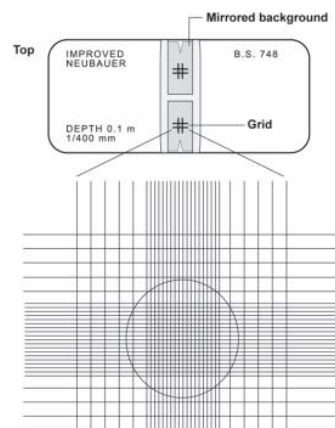
Το αιματοκυττόμετρο Neubauer είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Κάθε πλέγμα υποδιαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά μήκους 1mm. Τα μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα των οποίων η κάθε πλευρά έχει μήκος 0,25mm. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά τετράγωνα με μήκος πλευρά 0,20mm το καθένα. Κάθε ένα από τα 25 προαναφερθέντα τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα και συνεπώς το κεντρικό τετράγωνο αποτελείται από 400 πολύ μικρά τετράγωνα με πλευρά μήκους 0,05mm το καθένα. Το επίπεδο πλέγματος είναι 0,1 mm χαμηλότερο από το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας και σε αυτό το χώρο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων, όπως θα περιγραφεί και παρακάτω. Συνεπώς ο όγκος των τεσσάρων 16άδων είναι 10^{-4} mL.

Υλικά- Συσκευές:

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- P20
- Αιματοκυττόμετρο Neubauer

Πειραματική πορεία

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer. Ακολουθείται η πειραματική πορεία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων και το ίζημα των κυττάρων τελικά επαναιωρείται σε 10mL πλήρους θρεπτικού μέσου. Τοποθετούνται από 10μL του εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε πλευρά του αιματοκυτταρομέτρου και μετρούνται τα κύτταρα, οπότε υπολογίζεται ο μέσος όρος τους. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του εναιωρήματος των κυττάρων γίνεται πολλαπλασιάζοντας το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν επί το 10^4 . (Μέτρηση κυτ/κου πληθυσμού)



3.2.5 Έλεγχος για μυκόπλασμα

Οι κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, ελέγχθηκαν για μυκόπλασμα με χρώση DAPI. Το μυκόπλασμα, αποτελεί συχνή πηγή μόλυνσης στις κυτταροκαλλιέργειες και η κυριότερη πηγή επιμόλυνσης είναι οι κακές πρακτικές κυτταροκαλλιέργειας. Η χρήση των συνηθισμένων αντιβιοτικών, δηλαδή του συνδυασμού πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης δεν είναι αρκετή για την αποφυγή ανάπτυξης μυκοπλάσματος, μιας και το μυκόπλασμα δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα.

Η επιμόλυνση με μυκόπλασμα, μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμικές μεταβολές, διαταραχή στη σύνθεση νουκλειικού οξέος, αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μεταβολισμού, μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, μειωμένη απόδοση transfection και κυτταρικό θάνατο. (<https://www.atcc.org/the-science/authentication/mycoplasma-contamination>)

Για τον έλεγχο των κυτταροκαλλιεργειών ως προς την ύπαρξη επιμόλυνσης μυκοπλάσματος, ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στη συνέχεια.

Υλικά- Συσκευές:

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- P20, P1000
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI
- MeOH, παγωμένα
- DAPI
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS-saline, pH7,4

- 12well plate
- 18mm καλυπτρίδες

Πειραματική πορεία:

1. Επιστρώνονται 30.000 κύτταρα σε 12well plate, στις καλυπτρίδες, και επωάζονται στον επωαστικό θάλαμο, στους 37° C, για τρεις ημέρες.
2. Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS.
3. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται, με πρόσθεση παγωμένης MeOH και επώασή τους στους 37° C, για 15min, στη συνέχεια απομακρύνεται η MeOH και ξεπλένεται δις με PBS
4. Προστίθεται DAPI και οι καλυπτρίδες επωάζονται εκ νέου στους 37° C, για 15min.
5. Ξεπλένονται οι καλυπτρίδες με PBS και γίνονται mounted σε αντικειμενοφόρες πλάκες.
6. Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού, στα 405nm.

Οι κυτταροκαλλιέργειες που είναι θετικές ως προς την ανάπτυξη μυκοπλάσματος, καλλιεργούνται παρουσία 25μg/μL Plasmocin (Invivogen, Cat. Code: #ant-mpt-1)

3.2.6 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφουροδαμίνης (SRB)

Η μέθοδος ελέγχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση σουλφουροδαμίνης (SRB), περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Skehan. Πρόκειται για μια γρήγορη, ευαίσθητη και οικονομική τεχνική αποτίμησης της κυτταροτοξικότητας πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων σε κυτταρικές καλλιέργειες προσκόλλησης αλλά και suspension (Skehan et al., 1990). Εν αντιθέσει με άλλες μεθόδους αποτίμησης της κυτταροτοξικότητας ενός πιθανού αντικαρκινικού φαρμάκου, η δοκιμασία με χρώση SRB είναι και αρκετά πιο απλοποιημένη, μιας και δεν μετράει την μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, όπως λ.χ. η μέθοδος MTT, αλλά πρωτεϊνικό περιεχόμενο ζωντανών και νεκρών κυττάρων, χωρίς ωστόσο το τελευταίο να επηρεάζει την διακριτική ικανότητά της (Orellana & Kasinski, 2016; Vichai & Kirtikara, 2006). Επιπλέον, αποτελεί μία εξαιρετικής ευαισθησίας τεχνική σε σύγκριση με άλλες χρώσεις πρωτεϊνών, καθώς χαρακτηρίζεται από όριο ανίχνευσης 1.000-2.000 κυττάρων ανά πηγαδάκι σε 96well plate, παρόμοιο με εκείνο των μεθόδων φθορίζουσας χρώσης (Vichai & Kirtikara, 2006). Παρά τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα της τεχνικής, το βασικό μειονέκτημά της είναι ότι δεν είναι δυνατή η αυτοματοποίησή της ή έστω η σε κάποιο βαθμό αυτοματοποίηση της εξαιτίας των πολλών βημάτων πλύσεων-(ξηράνσεων) που απαιτούνται.

Η σουλφουροδαμίνη είναι μια ροζ χρώματος βαφή αμινοξανθάνης η οποία προσδένεται ηλεκτροστατικά στα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα των ζωντανών κυττάρων, τα οποία έχουν

μονιμοποιηθεί επιδράσει τριχλωροοξικού οξέος (TCA). Το σήμα της απορρόφησης χρώματος της βαφής είναι ανάλογο του αριθμού μάζας των κυττάρων, καθώς η πρόσδεση της SRB με τις πρωτεΐνες είναι στοιχειομετρική. Η πρόσδεση της βαφής εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος, το οποίο μετά την προσθήκη TCA καθίσταται ελαφρώς όξινο και τα κύτταρα μονιμοποιούνται. Έπειτα, μετά από διαλυτοποίηση της χρώσης με διάλυμα Tris-Base pH 10,5, εκχυλίζεται η χρωστική και μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) των εκχυλισμάτων στα 492nm (Shakil et al., 2022). Η μονιμοποίηση των κυττάρων γίνεται με TCA και όχι με οργανικούς διαλύτες καθώς γίνεται ταχέως και δεν παρατηρούνται μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα (Skehan et al., 1990).

Η χρώση των κυττάρων με SRB πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας αρχικά για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης των εξεταζόμενων κυτταρικών σειρών και την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης (growth curves) και στη συνέχεια για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των προς μελέτη ουσιών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές(). Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για την χρώση των κυττάρων με SRB στην συγκεκριμένη εργασία, παρουσιάζεται στη συνέχεια:

Υλικά- Εξοπλισμός

- 96well plate
- Πλήρες θρεπτικό μέσο RPMI
- 50% (wt/vol) TCA
- 1% (v/v) CH₃COOH
- 0,4% (wt/vol) SRB, δλυμένη σε 1% (v/v) CH₃COOH
- 10mM Tris-base (pH 10,5)

Πειραματική πορεία:

- 1) Σε κάθε πηγαδάκι επιστρώνεται 250μL κυτταρικού εναιωρήματος στο οποίο εμπεριέχονται 10⁴ κύτταρα για κάθε κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα επωάζονται overnight στους 37° C και 5%CO₂.
- 2) Προσθήκη των προς εξέταση ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ως δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιείται καλλιέργεια στην οποία έχει προστεθεί ο διαλύτης στο οποίο είναι διαλυμένες οι προς εξέταση ουσίες.
- 3) Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος επώασης των κυττάρων, απορρίπτεται το θρεπτικό μέσον και προστίθενται 50μL 50% (wt/vol) TCA σε κάθε πηγαδάκι και τα κύτταρα επωάζονται στους 4° C για 1hr.
- 4) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πραγματοποιούνται 5 πλύσεις με ddH₂O.
- 5) Τα πιάτα αφήνονται να στεγνώσουν overnight σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Προσθήκη 100μL 0,4% (wt/vol) SRB .
- 7) Επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.

- 8) Πλύσεις με 200μL 1% (v/v) CH₃COOH σε κάθε πηγαδάκι, δύο φορές, με σκοπό την απομάκρυνση της πλεονάζουσας χρωστικής.
- 9) Τα πιάτα αφήνονται να στεγνώσουν για 1hr τουλάχιστον σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10) Προσθήκη 200μL 10mM Tris-base (pH 10,5) και επώαση για 30min με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11) Μέτρηση της απορρόφησης σε φαρματοφωτόμετρο ELISA στα 492nm.

Για την κατασκευή των growth curves ακολουθείται το άνωθεν πρωτόκολλο χωρίς την προσθήκη των εξεταζόμενων ουσιών και στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προστίθεται το διάλυμα 50% (wt/vol) TCA.

3.2.7 Επίδραση ουσιών

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα των κυτταρικών σειρών DU-145 και PC3. Και για τις δυο κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκαν οι εξής σειρές πειραμάτων:

- 1) 96well plate με χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων των υπο εξέταση ουσιών για 72hrs με 10⁴ κύτταρα/well, ώστε να εξεταστεί η κυτταροτοξική τους δράση και να επιλεγθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις τους, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια στις επόμενες δοκιμασίες.
- 2) 96well plate με χορήγηση και συγχορήγηση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων των υπό εξέταση ουσιών για 72hrs με 10⁴ κύτταρα/well, ώστε να εξεταστεί τυχόν συνεργαστική δράση των εξεταζόμενων ουσιών.
- 3) 24well plate με χορήγηση και συγχορήγηση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων των υπό εξέταση ουσιών για 24hrs με 150x10³ κύτταρα/well, ώστε να εξεταστούν οι μεταβολές σε επίπεδο πρωτεϊνών.

Υλικά-εξοπλισμός:

- RPMI πλήρες θρεπτικό υλικό
- P10, P200, P1000
- DMSO
- 96well plates, 12well plates, 12well plates
- Pictilicib : το στερεό διαλυτοποιείται σε DMSO ώστε η τελική συγκέντρωση του stock να είναι 10mM. Στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 παρασκευάζονται stocks συγκεντρώσεων 1mM, 0,1mM, 0,01mM.
- A66: το στερεό διαλυτοποιείται σε DMSO ώστε η τελική συγκέντρωση του stock να είναι 10mM. Στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 παρασκευάζονται stocks συγκεντρώσεων 1mM, 0,1mM, 0,01mM.

- TGX-221: το στερεό διαλυτοποιείται σε DMSO ώστε η τελική συγκέντρωση του stock να είναι 10mM. Στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις 1:10 παρασκευάζονται stocks συγκεντρώσεων 1mM, 0,1mM, 0,01mM.
- GS27: παρελήφθησαν δυο stocks με διαφορετική περιεκτικότητα σε DMSO:

GS27^a: 3,9mM με διαλύτη H₂O, το οποίο αραιώθηκε κατά παρόμοιο τρόπο οπότε προέκυψαν stocks με συγκεντρώσεις 0,390mM, 0,039mM, 0,0039mM. Τα συγκεκριμένα stocks χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρική σειρά DU-145 στα πειράματα 1-2.

GS27^b: 3,9mM με περιεκτικότητα 37% (v/v) DMSO.

Πειραματική πορεία

- 1) Επιστροφή των αντίστοιχων plate με τον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων σε κάθε well και επώαση αυτών στους 37° C και 5% CO₂ για 24hrs. Για τα 96 well plates επιστρώνονται 250μL, για τα 24well plates 0,5mL και για τα 12 well plates 1mL κυτταρικού εναυωρήματος αντίστοιχα.
- 2) Παρασκευή των stock φαρμάκων σε πλήρες θρεπτικό μέσον. Για κάθε συνθήκη θα υπάρχουν triplicates

Πίνακας 4.2.7.1 Όγκοι και συγκεντρώσεις των εκάστοτε αναστολέων, όπως χρησιμοποιήθηκαν για ένα 96well plate

Ουσίες	Working stock (mM)	Όγκος που μεταφέρεται (μL)	Όγκος θρεπτικού μέσου (mL)	Τελική συγκέντρωση (μM)
Pictilicib	10	2,6	2,6	10
Pictilicib	1	2,6	2,6	1
Pictilicib	0,1	2,6	2,6	0,1
Pictilicib	0,01	2,6	2,6	0,01
A66	10	2,6	2,6	10
A66	1	2,6	2,6	1
A66	0,1	2,6	2,6	0,1
A66	0,01	2,6	2,6	0,01
Tgx-221	10	2,6	2,6	10
Tgx-221	1	2,6	2,6	1
Tgx-221	0,1	2,6	2,6	0,1
Tgx-221	0,01	2,6	2,6	0,01

GS27	3,9	60	2,6	100
GS27	0,39	60	2,6	10
GS27	0,039	60	2,6	1
GS27	0,0039	60	2,6	0,1

Πίνακας 4.2.7.2 Όγκοι και συγκεντρώσεις των εκάστοτε αναστολέων, όπως χρησιμοποιήθηκαν για ένα 12Well plate

Ουσίες	Όγκος που μεταφέρεται (μL)	Όγκος θρεπτικού μέσου (mL)
Pictilicib 0,1mM	5	5
A66 1mM	5	5
Tgx-221 1mM	5	5
GS27 3,9mM	64	5
Pictilicib 0,1mM + GS27 3,9mM	5 + 64	5
A66 1mM + GS273,9mM	5 + 64	5
Tgx-221 1mM + GS273,9mM	5 + 64	5

- 3) Αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού, στο οποίο εμπεριέχονται οι προς εξέταση ουσίες, όπως φαίνεται στον Πίνακα \$. Επώαση στους 37° C και 5% CO₂ για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Για τα πειράματα 1-2 έχει επιστρωθεί ένα δεύτερο πιάτο με μόνο θρεπτικό υλικό και 10⁴ κύτταρα/well, στο οποίο πραγματοποιείται χρώση με SRB των κυττάρων και αποτελεί το δείγμα ελέγχου πριν τη χορήγηση των ουσιών.
- 4) Μετά το πέρας των 72hrs ακολουθείται το πρωτόκολλο της χρώσης των κυττάρων με SRB για τα κύτταρα του πιάτου των 96Well.

3.2.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η βασική αρχή στην οποία βασίζεται είναι η μετακίνηση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, με ταχύτητα που

εξαρτάται κατ' αναλογία από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και του καθαρού φορτίου της πρωτεΐνης και αντιστρόφως ανάλογα από το μέγεθος και το σχήμα της πρωτεΐνης.

Υλικά- Συσκευές:

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης

Διαλύματα εργασίας:

- ddH₂O
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης
- Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS)
- Laemmli buffer 6X, του οποίου η σύσταση φαίνεται στον πίνακα 4.2.8.1

Πίνακας 4.2.8.1 Σύσταση του Laemmli buffer 6X

Συστατικό	Τελική Συγκέντρωση
Tris-HCl pH: 6.8	375mM
SDS	6%
Γλυκερόλη	48%
2- μερκαπτοαιθανόλη	9%
κυανούν της βρωμοφαινόλης	0,03%

- Πήκτωμα διαχωρισμού σύστασης 10%, για 2 Gels η περιεκτικότητα φαίνεται στον Πίνακα 4.2.8.2

Πίνακας 4.2.8.2 Σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού σύστασης 10%, για 2 gels

Συστατικό	Όγκος
ddH ₂ O	7,9 mL
Acrylamide 30%	6,7 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	5 mL
10% SDS	200 μL
10% APS	200 μL
TEMED	8 μL

- Πήκτωμα επιστοίβαξης, για 2 Gels η περιεκτικότητα φαίνεται στον Πίνακα 4.2.7.3

Πίνακας 4.2.7.3 Σύσταση του πηκτώματος επιστοιβαξης 10%, για 2 gels

Συστατικό	Όγκος
ddH ₂ O	4.1ml
1M Tris 6.8	750μl
10% SDS	60μl
30% Acrylamide	1ml
10% APS	60μl
TEMED	6μl

➤ Running Buffer η περιεκτικότητα του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 4.2.7.4

Πίνακας 4.2.7.4 Η σύσταση του Running Buffer

Συστατικό	Τελική συγκέντρωση
Tris-base	25mM
Glycine	250mM
SDS	0,1%

Πειραματική πορεία:

Παρασκευάζονται τα gels και φορτώνονται σε αυτά τα δείγματα πρωτεϊνών, αφού έχουν αποδιαταχτεί πλήρως οι πρωτεΐνες τους στους 95° C για 4min. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με σταθερό φορτίο αρχικά στα 120V και στη συνέχεια στα 180V.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες υπόκεινται σε διαδικασία ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευσή τους και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό τους. Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των πρωτεϊνών από τα gel σε μεμβράνες PVDF ύστερα από εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου. Η αρχή στην οποία βασίζεται η ανίχνευση είναι η σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου με ένα ειδικό πρωτεΐνιο αντίσωμα και στη συνέχεια με ειδικό δευτερεύον αντίσωμα που αναγνωρίζει και συνδέεται με το πρώτο. Εν συνεχεία, τα σύμπλοκα αυτά ανιχνεύονται με χρήση κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας.

Υλικά συσκευές:

- Συσκευή ανοσοαποτύπωσης
- Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών

- Διηθητικό χαρτί
- Διαλύματα εργασίας:
- Transfer buffer: η σύσταση του οποίου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 4.2.7.5

Πίνακας 4.2.7.5 Η σύσταση του Transfer buffer

Συστατικό	Τελική συγκέντρωση
Tris-base	25mM
Glycine	192mM
MeOH	20%

- Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου
- Διάλυμα έκπλυσης TBS (10X), η σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 4.2.7.6 και τα συστατικά διαλυτοποιούνται σε ddH₂O. Στη συνέχεια, το ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7,5 με την προσθήκη HCl.

Πίνακας 4.2.7.6 Η σύσταση του TBS (10X) διαλύματος

Συστατικό	Τελική Συγκέντρωση
Tris-HCl pH: 6.8	10mM
NaCl	0,154mM

- Tween 20
- Διάλυμα έκπλυσης εργασίας TBS-Tween 20
- Διάλυμα χημειοφωτεύγειας ECL (Biorad, #1705061): παρασκευάζεται από τα αντιδραστήρια A:B σε αναλογία 1:1
- Χρώση Ponceau
- Πρωτογενή αντισώματα:

Αντίσωμα	Κωδικός	Αραίωση
PTEN	Cell Signaling Technology, CST9188	1:5000
pS473Akt	Cell Signaling Technology, CST4060	1:5000
Akt	Cell Signaling Technology, CST9272	1:5000
GAPDH	Sigma-Aldrich, CB1001	1:5000

Πειραματική πορεία:

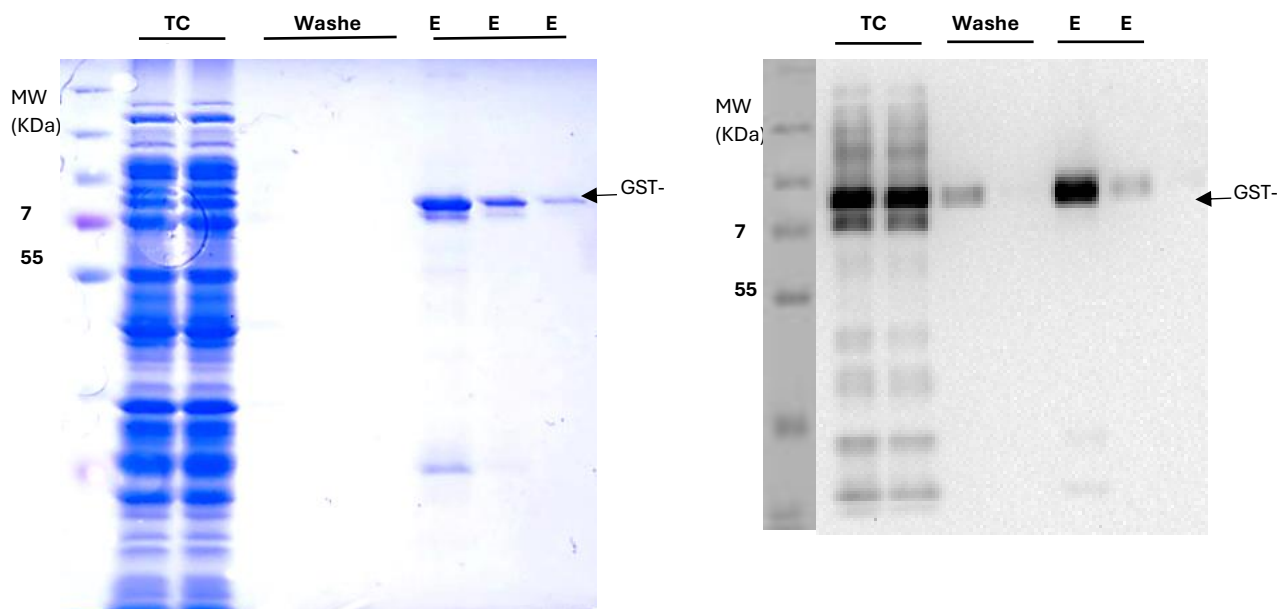
Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες υπόκεινται σε υγρή μεταφορά σε μεμβράνη, σε διάλυμα μεταφοράς για 2hrs σε σταθερή ένταση ρεύματος 400mA στον ψυκτικό θάλαμο. Μετά το τέλος της μεταφοράς των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, ελέγχεται η επιτυχία της με παροδική χρώση με Ponceau. Η μεμβράνη ξεπλένεται αρχικά με ddH₂O, ύστερα με TBS-T και στη συνέχεια σε κάθε μεμβράνη προστίθενται 5mL 5% γάλα διαλυμένο σε TBS-T, οπότε επώάζεται για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα γάλακτος 5% μπλοκάρει και αποκλείει τις μη ειδικές θέσεις ώστε τα αντισώματα να δεσμεύονται μόνο στις ειδικές θέσεις. Μετά το πέρας της ώρας επώασης, προστίθεται το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα και επώάζεται η μεμβράνη overnight στον ψυχρό θάλαμο υπό ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις διάρκειας 10min η κάθε μια με TBS-T και οι μεμβράνες επωάζονται με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:5000 για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανακίνηση. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούνται πάλι τρεις πλύσεις διάρκειας 10min η κάθε μια με TBS-T και οι μεμβράνες επωάζονται στον σκοτεινό θάλαμο για 5 min με το διάλυμα ECL, οπότε λαμβάνονται οι κατάλληλες ψηφιακές φωτογραφίες από τη συσκευή απεικόνισης ChemiDocTMXRS+system (Biorad, USA).

4 Αποτελέσματα

4.1 In vitro πειράματα

4.1.1 Έκφραση και απομόνωση GST-PTEN ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης σε E.coli BL21 κύτταρα

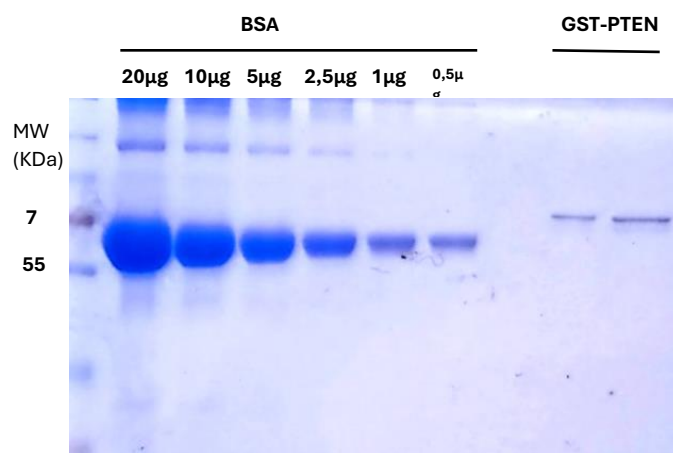
Για την έκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN σε βακτηριακά κύτταρα E.coli BL21 (DE3), ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, μετά από επαγωγή με 100μM IPTG σε θερμοκρασία 20° C. Η απομόνωσή της έγινε με χρήση σφαιριδίων αφαρόζης συζευγμένης με γλουταθειόνη και η τελική έκλουσή της με διάλυμα 20mM GSH, 2mM DTT, 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4, σε τρία κλάσματα. Στη συνέχεια τα δείγματα από τα διαφορετικά στάδια καθαρισμού ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 10%, όπως φαίνεται στην εικόνα XX. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη αναμένεται να έχει μοριακή μάζα περίπου 77 kDa, όπως προκύπτει από την μοριακή μάζα του PTEN που είναι 55 kDa και την ετικέτα GST που έχει περίπου 27kDa.



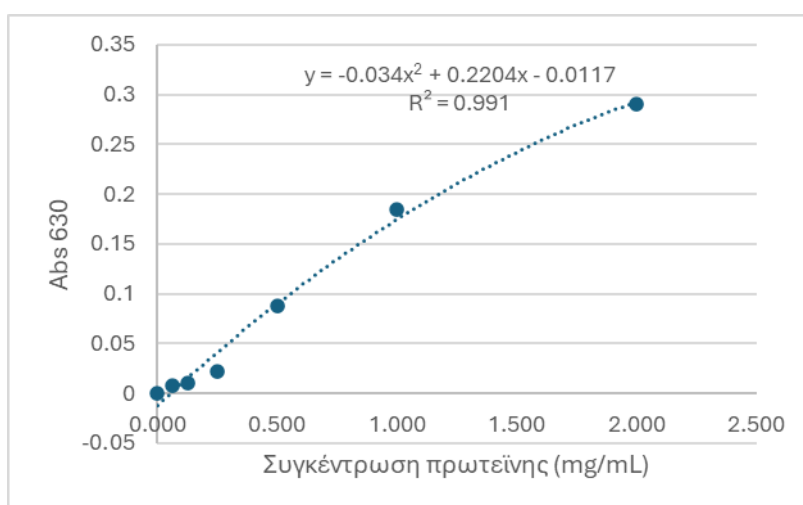
Εικόνα 4.1.1.1 Τα δείγματα των κλασμάτων αναλύθηκαν σε SDS-PAGE 10%. Αριστερά φαίνεται η χρώση της πηκτής με Coomassie Blue, η ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε είναι 35μl από κάθε δείγμα. Δεξιά φαίνεται η ανοσοαποτύπωση κατά Western των δειγμάτων των κλασμάτων, η ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε είναι 10μl Ab.PTEN 1:5000. TC1: total cell lysate, Washes: πλύσεις, E1, E2, E3: GST-PTEN κλάσματα έκλουσης.

Από τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στην εικόνα 4.1.1.1 γίνεται σαφές πως τα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pGEX-6p-1-PTEN υπερεκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στόχο στο διαλυτό βακτηριακό λύμα. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που εκλύεται ως τελικό προϊόν είναι υψηλής καθαρότητας.

Η ποσοτικοποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που εκλύεται γίνεται με χρήση πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1.1.2. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προκύπτει από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης των γνωστών δειγμάτων αλβουμίνης, όπως φαίνεται στο Γράφημα 4.1.1.1..



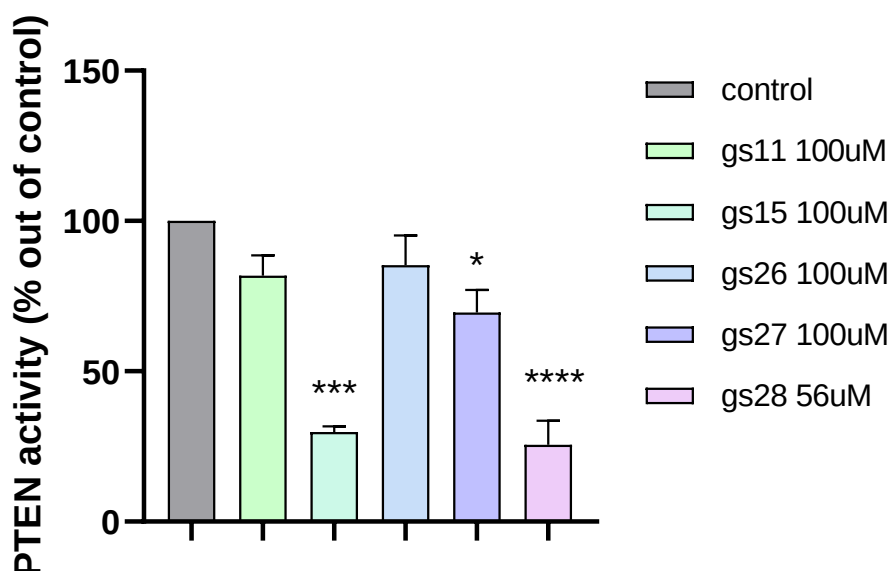
Εικόνα 4.1.1.2 Χρώση της πηκτής SDS-PAGE 10% με Coomassie Blue της πρότυπης καμπύλης BSA και των δειγμάτων των κλασμάτων έκλουσης. Αριστερά φαίνεται η ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε είναι 35μl από κάθε δείγμα.



Γράφημα 4.1.1.1 Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη BSA, σύμφωνα με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση της απομονωμένης πρωτεΐνης GST-PTEN.

4.1.2 Green Malachite assay

Πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Green Malachite σε διαφορετικά μόρια, παράγωγα ελευρωπαΐνης, υποψήφιους αναστολείς της δραστηριότητας της λιπιδικής φωσφατάσης του PTEN. Το ποσοστό αναστολής της δραστηριότητας του PTEN φαίνεται στο διάγραμμα 4.1.2.1 και τον πίνακα 4.1.2.1.



Γράφημα 4.1.2.1 Επίδραση των ενώσεων GS11/15/26/27/28 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και επώαση 10min, στην ενζυμική δραστηριότητα PIP₃-φωσφατάσης ανασυνδυασμένου GST-PTEN. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=3-5 αντιδράσεις σε δύο πειράματα. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ ANOVA

Πίνακας 4.1.2.1 Επί τοις εκατό αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας PIP₃-φωσφατάσης ανασυνδυασμένου GST-PTEN, επιδράσει των ενώσεων GS11/15/26/27 σε συγκέντρωση 100uM και της GS28 σε συγκέντρωση 56uM και επώαση 10min.

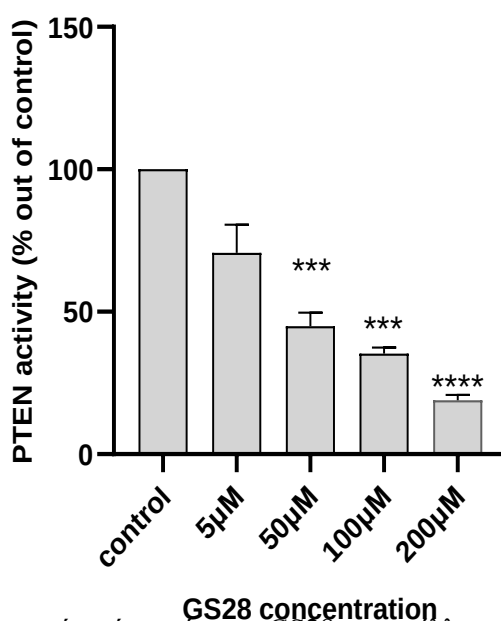
GS- compounds	Αναστολή
GS11	-
GS15	70%
GS26	-
GS27	40%
GS28 (56uM)	60%

Από το γράφημα 4.1.2.1 και τον πίνακα 4.1.2.1, παρατηρούμε ότι μεταξύ των διαφορετικών μορίων παράγωγων ελευρωπαΐνης, σημαντική αναστολή στην ενζυμική δραστηριότητα λιπιδικής φωσφατάσης ανασυνδυασμένου GST-PTEN εμφανίζουν τα GS15, GS27 και GS28, με το τελευταίο να αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα σε συγκέντρωση 56uM.

Από τις παραπάνω ενώσεις παράγωγα ελευρωπαΐνης, επιλέχθηκαν οι ενώσεις GS27 και GS28. Η GS28 μελετήθηκε περαιτέρω *in vitro* ως προς τον μηχανισμό επίδρασής της στην ενζυμική δραστηριότητα της λιπιδικής φωσφατάσης του ανασυνδυασμένου GST-PTEN, με τη δοκιμασία Green Malachite με υδατοδιαλυτό υπόστρωμα diC8-PIP₃. Η GS27 μελετήθηκε ως προς την πιθανή αντιολλαπλασιαστική δράση της είτε ξεχωριστά ή συνδυαστικά με τους αναστολείς της PI3K, Pictilicib (GDC-0941), A66, TGX-221, στις κυτταρικές σειρές DU-145, PC3 και MCF7. Επιπλέον, μελετήθηκε ως προς τις μεταβολές που επιφέρει η επίδρασή τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt.

4.1.2.1 GS28

Αρχικά μελετήθηκε η ανασταλτική δράση της ένωσης GS28 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με τη δοκιμασία Green Malachite και υδατοδιαλυτό λιπιδικό υπόστρωμα diC8-PIP₃.

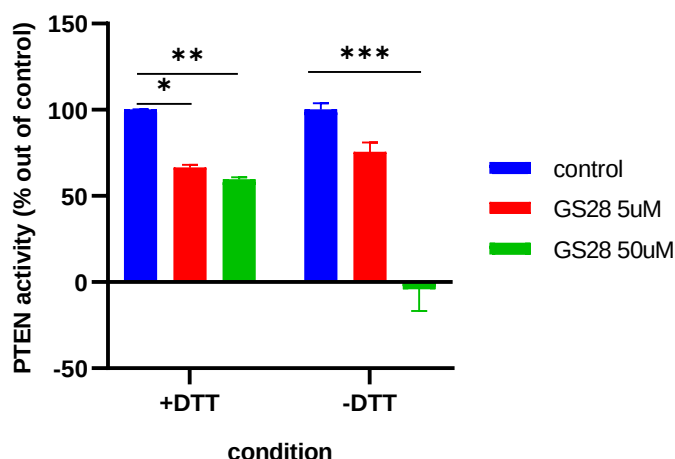


Στο γράφημα 4.1.2.1.1, παρατηρούμε ότι η ένωση GS28 αναστέλλει τη ενζυμική δραστηριότητα της Γράφημα 4.1.2.1.1 Επίδραση της ένωσης GS28 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και επώαση 10min, στην ενζυμική δραστηριότητα PIP₃-φωσφατάσης ανασυνδυασμένου GST-PTEN (168,54μg). Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=3-5 αντιδράσεις σε δύο πειράματα. ***: p<0,001, ****: p<0,0001 ANOVA

4.1.2.2 GS28 οξειδωτικός μηχανισμός

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας ότι τα bpV σύμπλοκα, γνωστοί αναστολείς της δραστηριότητας της λιπιδικής φωσφατάσης PTEN, δρουν οξειδώνοντας το αμινοξικό κατάλοιπο Cys124 και σχηματίζοντας δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων Cys124-Cys71, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν το GS28 αναστέλλει την δραστηριότητα της λιπιδικής φωσφατάσης PTEN κατά παρόμοιο τρόπο,

ακολουθώντας οξειδωτικό μηχανισμό. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε Green Malachite δοκιμασία παρουσία και απουσία του αναγωγικού παράγοντα DTT (dithiothreitol). Εάν, απουσία του αναγωγικού παράγοντα η ανασταλτική δράση του GS28 αυξάνει, τότε το GS28 ακολουθεί οξειδωτικό μηχανισμό αναστολής της δραστηριότητας της λιπιδικής φωσφατάσης του ανασυνδυσμένου GST-PTEN.

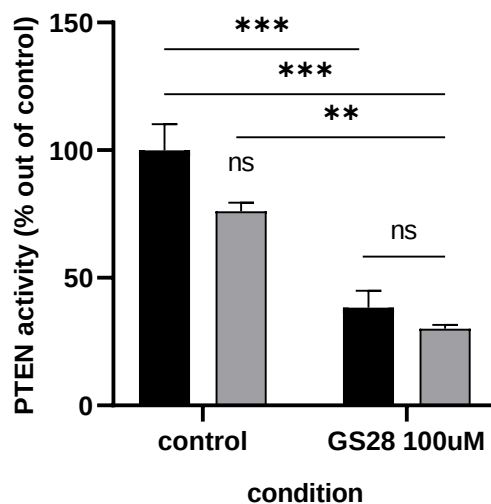


Γράφημα 4.1.2.2.1 Επίδραση της ένωσης GS28 παρουσία και απουσία του αναγωγικού μέσου DTT, και επώαση 10min σε συγκέντρωση 5μM και 50μM GS28, στην ενζυμική δραστηριότητα PIP₃-φωσφατάσης ανασυνδυσμένου GST-PTEN (278,72μg). Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=3 αντιδράσεις σε δύο πειράματα. ***: p<0,0001, **: p>0,0001, *:p>0,001. ANOVA

Από το γράφημα 4.1.2.2.1, παρατηρούμε ότι σε συνθήκες control παρουσία και απουσία του αναγωγικού παράγοντα DTT, παρατηρούμε ότι η ενζυμική δραστηριότητα της λιπιδικής φωσφατάσης του ανασυνδυσμένου GST-PTEN μειώνεται σε ποσοστό 70%. Στη συνέχεια, επιδράσει 50μM GS28, παρουσία DTT παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας σε ποσοστό 40%, το οποίο απουσία του αναγωγικού παράγοντα DTT μειώνεται σχεδόν σε ποσοστό 100%.

4.1.2.3 GS28 reversibility assay

Στη συνέχεια θέλοντας να μελετήσουμε περεταίρω τον μηχανισμό με τον οποίο γίνεται η οξειδωτική αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της λιπιδικής φωσφατάσης ανασυνδυσμένου GST-PTEN θελήσαμε να μελετήσουμε εάν είναι αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο ανασυνδυσμένος GST-PTEN ακινητοποιημένος σε GSH beads αгарόζης και επώαστηκε είτε με GS28 σε συγκέντρωση 100μM είτε με DMSO, ως control, και στην συνέχεια μετά από εκτεταμένες εκπλύσεις, για απομάκρυνση της περίσσειας της ένωσης GS28, ακολουθήθηκε η δοκιμασία φωσφατάσης. Μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση της ένωσης GS28 στις διαφορετικές συνθήκες, με τη δοκιμασία Green Malachite και υδατοδιαλυτό λιπιδικό υπόστρωμα diC8-PIP₃.



Γράφημα 4.1.2.3.1 Επίδραση της ένωσης GS28 (100μM) με (γκρι) ή χωρίς (μαύρο) προεπώαση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης με το μόριο GS28 και επώαση 10min σε συγκέντρωση 100μM GS28, στην ενζυμική δραστικότητα PIP₃-φωσφατάσης ανασυνδυσμένου GST-PTEN. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=3 αντιδράσεις σε ένα πείραμα. ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

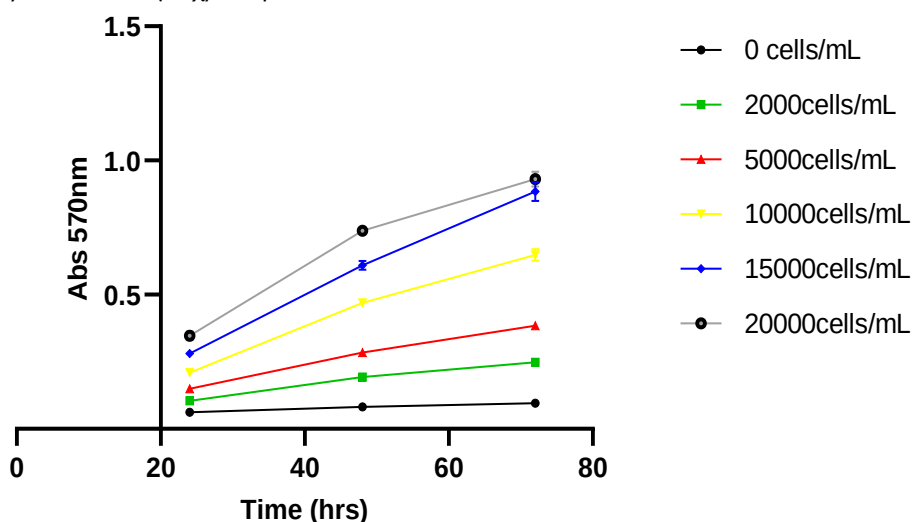
Από το γράφημα 4.1.2.3.1 παρατηρούμε ότι η προεπώαση για 1 ώρα της πρωτεΐνης με τον αναστολέα GS28 δεν επιφέρει στατιστικά σημαντική διαφορά στις control συνθήκες, απουσία δηλαδή του ανασυνδυσμένου GST-PTEN. Πιο συγκεκριμένα, μετά από επώαση για 10 min του ανασυνδυσμένου GST-PTEN σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τον αναστολέα, παρατηρούμε ότι στη συνθήκη στην οποία η πρωτεΐνη είχε προεπωαστεί για 1 ώρα με τον αναστολέα η ενζυμική δραστικότητα αναστέλλεται κατά παρόμοιο τρόπο, σε ποσοστό περίπου 60% με το δείγμα στο οποίο ο ανασυνδυσμένος GST-PTEN δεν έχει προεπωαστεί με το μόριο GS28.

4.2 Πειράματα σε κυτταρικές σειρές

4.2.1 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στην κυτταρική ανάπτυξη στις κυτταρικές σειρές, με χρώση SRB

Για την μελέτη της επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στην κυτταρική ανάπτυξη των σειρών DU-145, PC3, MCF-7, αρχικά, πραγματοποιήσαμε καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, για 72hrs, ώστε να επιλέξουμε την κατάλληλη συγκέντρωση κυττάρων με την οποία θα πραγματοποιήσουμε στη συνέχεια τα πειράματα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε καμπύλες δόσης-απόκρισης για τη συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων και συνδυασμού αυτών και από αυτό εξάγουμε πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης τους. Στη συνέχεια υπολογίσαμε την τιμή IC50, την συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται αναστολή του πολλαπλασιαστικού ρυθμού των κυττάρων σε ποσοστό 50%. Η τιμή IC50 αναφέρεται στην ισχύ του φαρμάκου (potency) και όσο πιο χαμηλή είναι τόσο πιο ισχυρό είναι. Για το σκοπό αυτό, επιστρώσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων και πραγματοποιήσαμε χρώση SRB, μετά από 24, 48 και 72 ώρες ανάπτυξης στον επωαστικό θάλαμο (37° C, 5% CO₂).

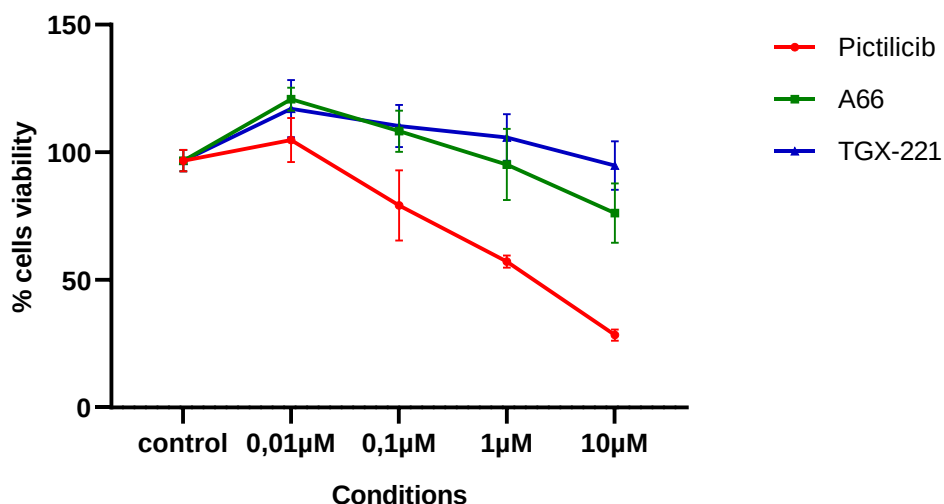
4.2.1.1 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στην κυτταρική ανάπτυξη σε κύτταρα DU-145, με χρώση SRB



Γράφημα 4.2.1.1.1 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων DU-145 σε συγκεντρώσεις 0, 2000, 5000, 10000, 15000, 20000 cells/mL και για χρονικό διάστημα 24, 48 και 72hr. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=4 αντιδράσεις σε τρία πειράματα. ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

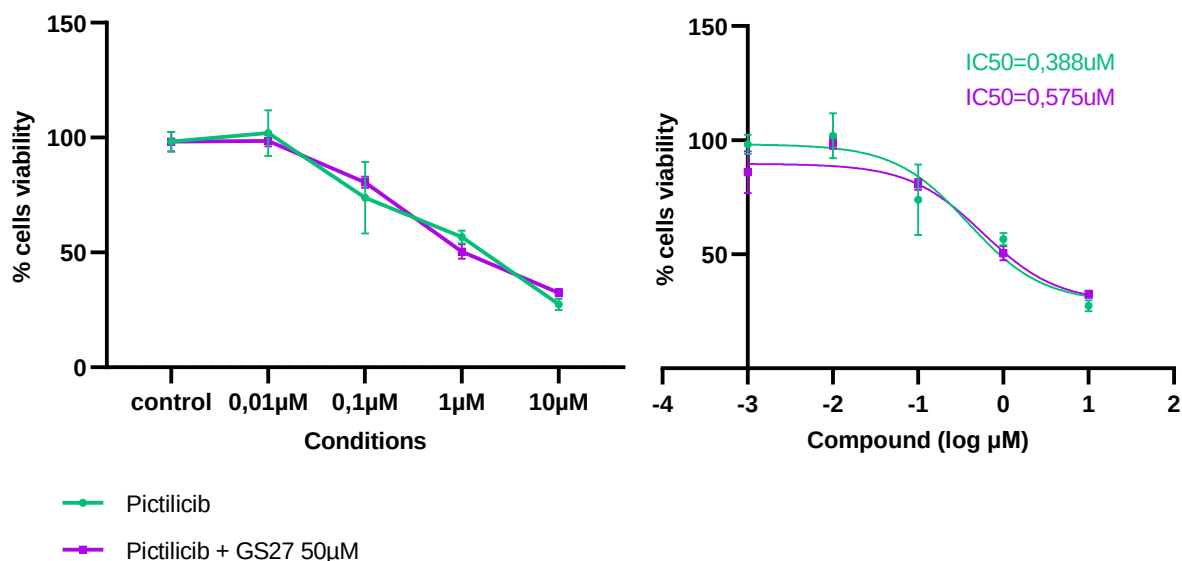
Από το διάγραμμα 4.2.1.1.1, παρατηρούμε ότι η ιδανική συγκέντρωση είναι τα 10000cells/mL, επειδή στις 72hrs, τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων της PI3K κινάσης, Pictilicib, A66, TGX-221 και του μορίου GS27, αναστολέα (in vitro) του PTEN, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων ως προς την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση στην κυτταρική σειρά DU-145, ύστερα από χορήγηση ξεχωριστά ή συνδυαστικά.



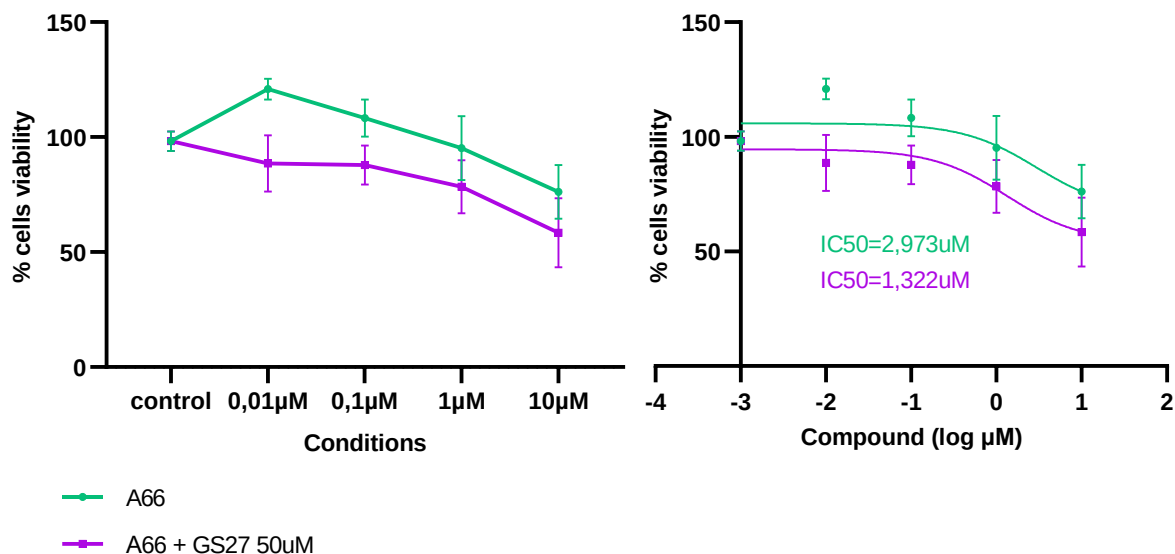
Γράφημα 4.2.1.1.2 Επί τοις εκατό κυτταρική ανάπτυξη της της κυτταρικής σειράς DU-145, μετά από έκθεση 48 ωρών σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις των αναστολέων Pictilicib, A66, TGX-221. Η τιμή 100% βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού, αντιστοιχεί σε κύτταρα, απουσία επίδρασης κάποιου αναστολέα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

Στο γράφημα 4.2.1.1.2 συγκρίνεται η αντιπολλαπλασιαστική δράση των PI3K αναστολέων Pictilicib, A66 και TGX-221. Παρατηρούμε ότι το Pictilicib εμφανίζει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση, ειδικά σε συγκεντρώσεις 1μM και 10μM. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1μM το Pictilicib, προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιαστικού ρυθμού σε ποσοστό περίπου 40%, ενώ σε συγκέντρωση 10μM, αναστολή σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%. Τα TGX-221 και A66 δεν εμφανίζουν σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση στο εύρος συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν.



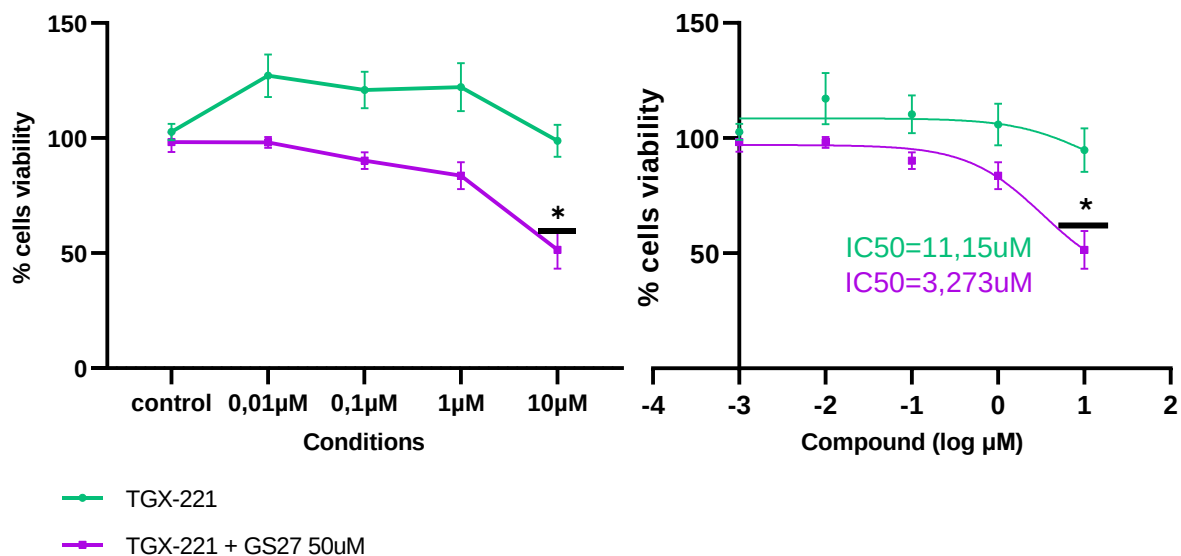
Διάγραμμα 4.2.1.1.3 Αριστερά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K Pictilicib και του συνδυασμού Pictilicib/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K Pictilicib και του συνδυασμού Pictilicib/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC50 Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). Επ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

Από το παραπάνω γράφημα 4.2.1.1.3, φαίνεται ότι η δράση του Pictilicib δεν επιφέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού Pictilicib/GS27. Ωστόσο, υπό και τις δύο συνθήκες, επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής δράσης σε ποσοστό πείπου από 70%. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή σε ποσοστό 50% και βλέπουμε ότι το Pictilicib έχει IC50 0,388μM, ενώ ο συνδυασμός Pictilicib και GS27 έχει τιμή IC50 0,575μM.



Διάγραμμα 4.2.1.1.4 Αριστερά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K A66 και του συνδυασμού A66/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K A66 και του συνδυασμού A66/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC50 Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). Επ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

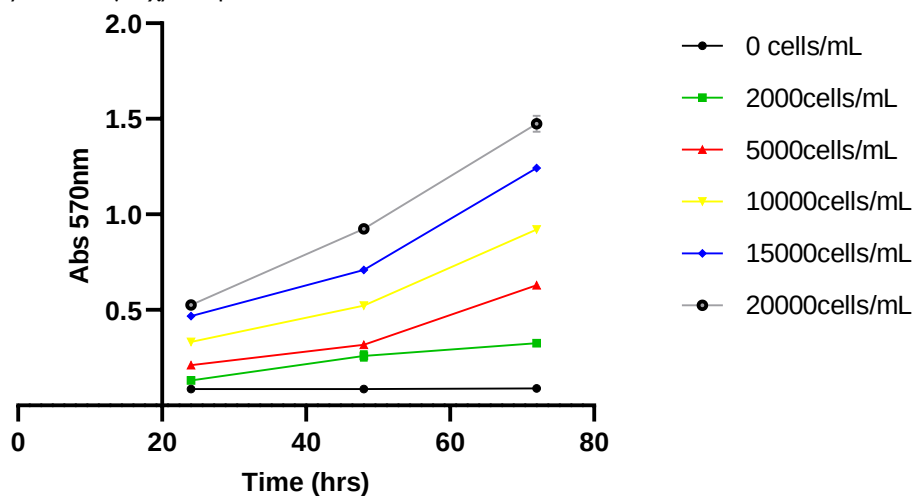
Από το παραπάνω Γραφημα 4.2.1.1.4, φαίνεται ότι η δράση του A66 δεν επιφέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού A66/GS27. Επιδράσει του συνδυασμού A66/GS27 επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής δράσης σε ποσοστό 40%, ενώ επιδράσει του A66 η αναστολή φτάνει το ποσοστό 30% περίπου. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή σε ποσοστό 50% και βλέπουμε ότι το A66 έχει IC50 2,973μM, ενώ ο συνδυασμός A66 και GS27 έχει τιμή IC50 1,322μM.



Διάγραμμα 4.2.1.1.5 Αριστερά παρατίθεται η δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K TGX-221 και του συνδυασμού TGX-221/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K TGX-221 και του συνδυασμού TGX-221/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC₅₀ Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). Επ***: p<0,0001, **: p>0,0001. ANOVA

Από το παραπάνω γράφημα 4.2.1.1.5, φαίνεται ότι η δράση του TGX-221 φέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού TGX-221/GS27 στην συγκέντρωση TGX-221 10μM/GS27 50μM. Επιδράσει του συνδυασμού TGX-221/GS27 επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής δράσης σε ποσοστό περίπου 40%, ενώ επιδράσει του TGX-221 δεν εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή σε ποσοστό 50% για τον αναστολέα TGX-221 η τιμή είναι 11,15μM, ενώ για τον συνδυασμό TGX-221/GS27 η τιμή είναι 3,273μM.

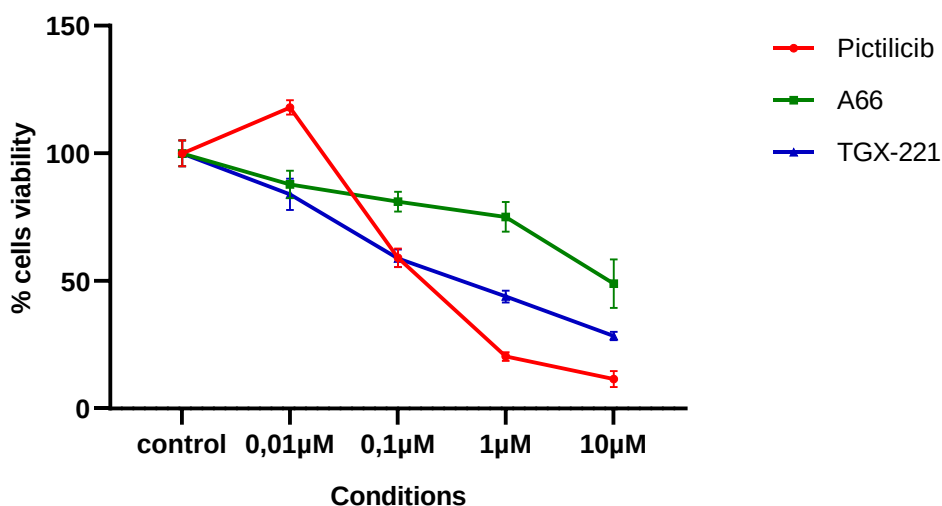
4.2.1.2 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στην κυτταρική ανάπτυξη σε κύτταρα PC3, με χρώση SRB



Διάγραμμα 4.2.1.2.1 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων PC3 σε συγκεντρώσεις 0, 2000, 5000, 10000, 15000, 20000cells/mL και για χρονικό διάστημα 24, 48 και 72hr. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από $n=4$ αντιδράσεις σε τρία πειράματα. ***: $p<0,0001$, **: $p>0,0001$. ANOVA

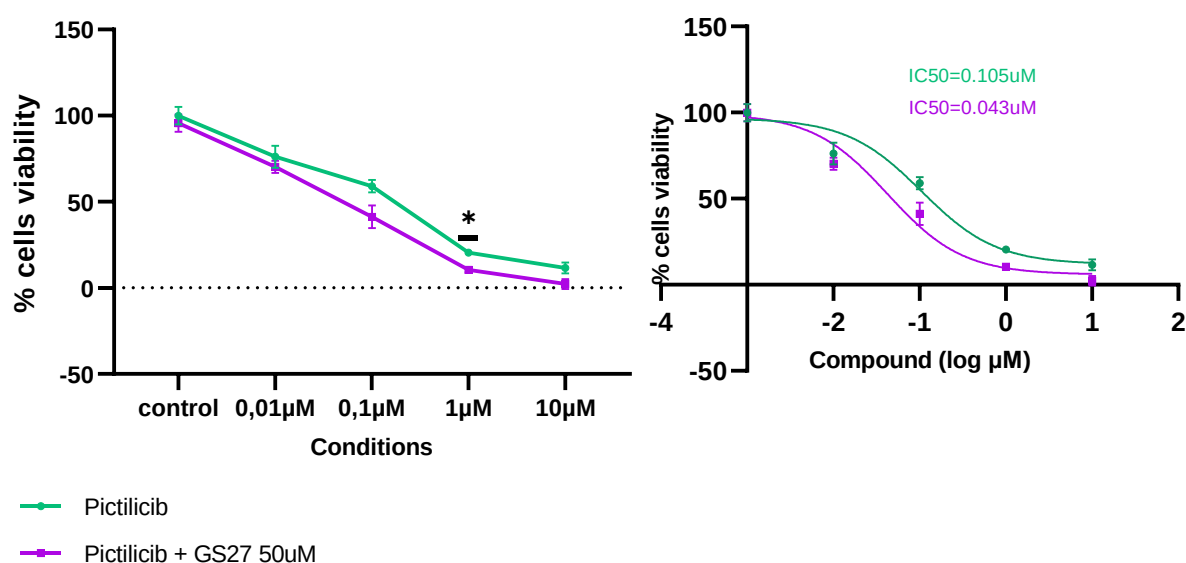
Από το διάγραμμα 4.2.1.2.1, παρατηρούμε ότι η ιδανική συγκέντρωση είναι τα 10000cells/mL, επειδή στις 72hrs, τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων της PI3K κινάσης, Pictilicib, A66, TGX-221 και του μορίου GS28, αναστολέα (in vitro) του PTEN, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων ως προς την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση στην κυτταρική σειρά PC3, ύστερα από χορήγηση ξεχωριστά ή συνδυαστικά.



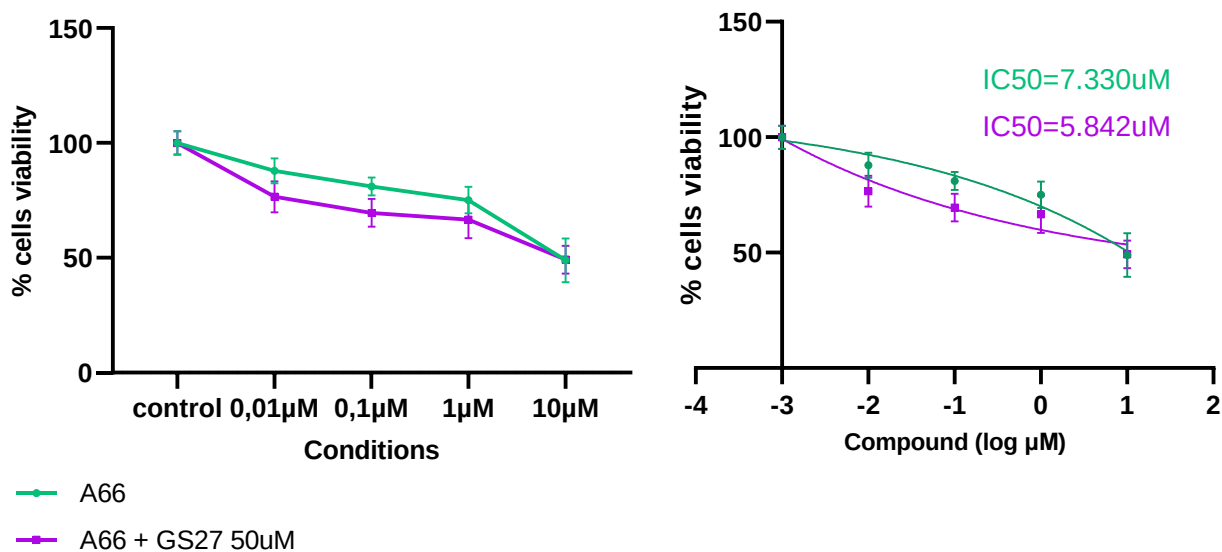
Γράφημα 4.2.1.2.2 Επί τοις εκατό κυτταρική ανάπτυξη της της κυτταρικής σειράς PC3, μετά από έκθεση 48 ωρών σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις των αναστολέων Pictilicib, A66, TGX-221. Η τιμή 100% βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού, αντιστοιχεί σε κύτταρα, απουσία επίδρασης κάποιου αναστολέα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

Στο διάγραμμα 4.2.1.2.2 συγκρίνεται η αντιπολλαπλασιαστική δράση των PI3K αναστολέων Pictilicib A66 και TGX-221. Παρατηρούμε ότι το Pictilicib εμφανίζει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση, ειδικά σε συγκεντρώσεις 1μM και 10μM. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1μM το Pictilicib, προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιαστικού ρυθμού σε ποσοστό περίπου 80%, ενώ σε συγκέντρωση 10μM, αναστολή σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%. Μικρότερη συγκριτικά αντιπολλαπλασιαστική δράση εμφανίζει το TGX-221, το οποίο σε συγκέντρωση 10μM αναστέλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%. Το A66 εμφανίζει τη χαμηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση και σε συγκέντρωση 10μM αναστέλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 40%.



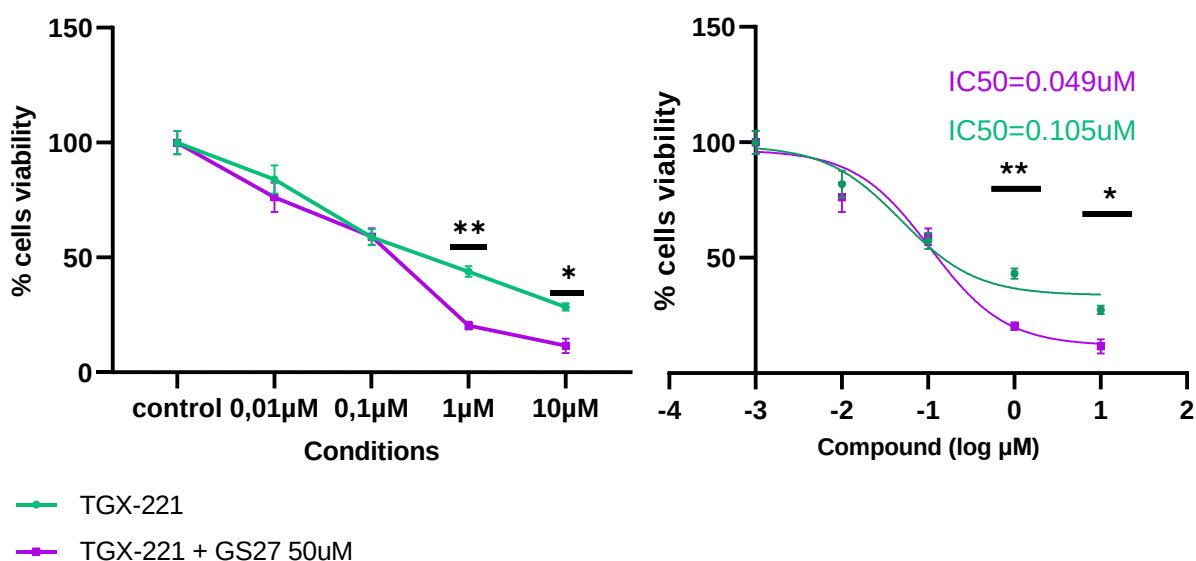
Διάγραμμα 4.2.1.2.3 Αριστερά παρατίθεται η δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K Pictilicib και του συνδυασμού Pictilicib/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δόσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K Pictilicib και του συνδυασμού Pictilicib/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC50 Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). Επ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

Από το παραπάνω διάγραμμα 4.2.1.2.3, φαίνεται ότι η αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα του Pictilicib δεν φέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού Pictilicib/GS27, εκτός από τη συγκέντρωση 1μM. Επιδράσει του Pictilicib, επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής δράσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%, ενώ επιδράσει του συνδυασμού Pictilicib/GS27 η πολλαπλασιαστικής δράσης φτάνει σχεδόν το 100%. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστό 50% και βλέπουμε ότι το Pictilicib έχει IC50 0,105μM, ενώ ο συνδυασμός Pictilicib και GS27 έχει τιμή 0,043μM.



Διάγραμμα 4.2.1.2.4 Αριστερά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K A66 και του συνδυασμού A66/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K A66 και του συνδυασμού A66/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC50 Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). Επ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

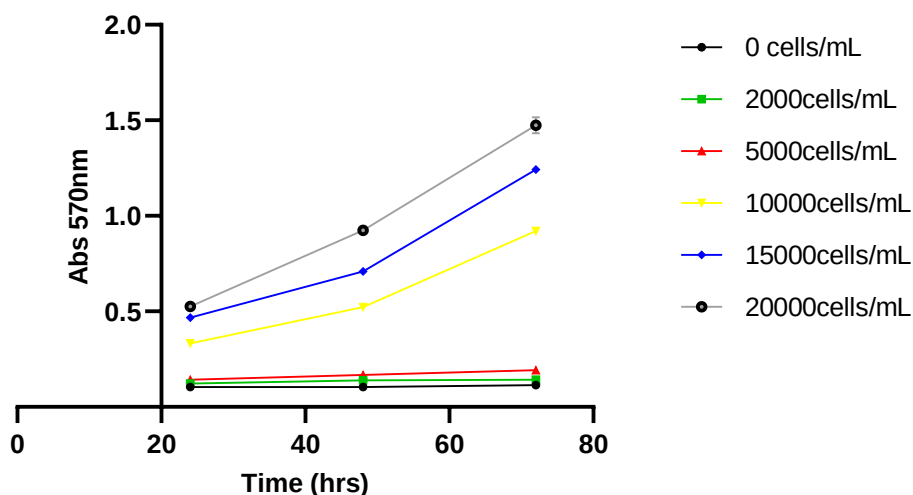
Από το παραπάνω διάγραμμα 4.2.1.2.4, φαίνεται ότι η αντιπολλαπλασιαστική δράση του A66 δεν φέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού A66/GS27. Εν αντιθέσει με τα προηγούμενα αποτελέσματα επίδρασης Pictilicib και συνδυασμού Pictilicib και GS27, επιδράσει του συνδυασμού A66/GS27 επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής δράσης σε ποσοστό περίπου 50%, ενώ επιδράσει του A66 ποσοστό περίπου 40%. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, η τιμή IC50 για το A66 είναι 7,33μM, ενώ για τον συνδυασμό A66/GS27 είναι 5,842μM.



Διάγραμμα 4.2.1.2.5 Αριστερά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K TGX-221 και του συνδυασμού TGX-221/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h. Δεξιά παρατίθεται η δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση του αναστολέα PI3K TGX-221 και του συνδυασμού TGX-221/GS27 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC50 Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

Από το παραπάνω διαγράμμα 4.2.1.2.5, φαίνεται ότι η δράση του TGX-221 δεν φέρει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη δράση του συνδυασμού TGX-221/GS27. Επιδράσει του συνδυασμού TGX-221/GS27 επιτυγχάνεται αναστολή της πολλαπλασιαστικής ικανότητας σε ποσοστό περίπου 90%, ενώ επιδράσει του TGX-221 ποσοστό περίπου 70%, χωρίς ωστόσο η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Από το λογαριθμικό διάγραμμα, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή σε ποσοστό 50% για τον αναστολέα TGX-221 η τιμή είναι 0,105μM ενώ για τον συνδυασμό TGX-221/GS27 η τιμή είναι 0,049μM.

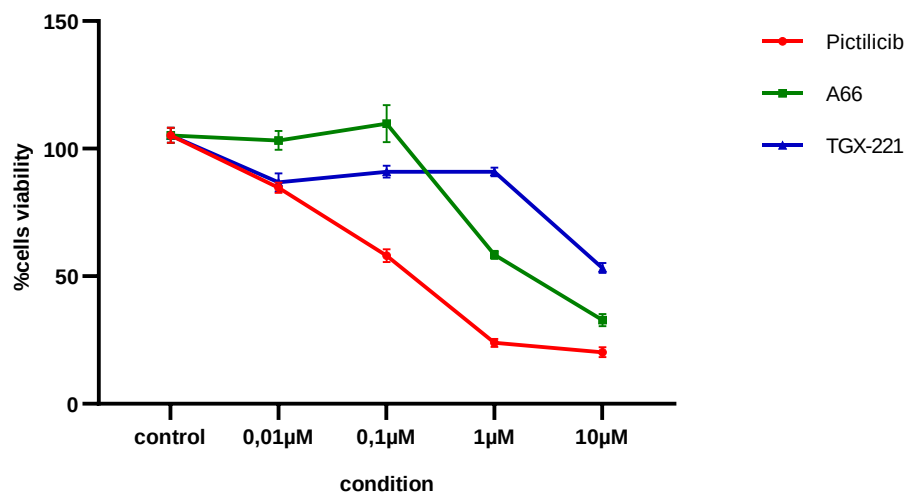
4.2.1.3 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K στην κυτταρική ανάπτυξη σε κύτταρα MCF-7, με χρώση SRB



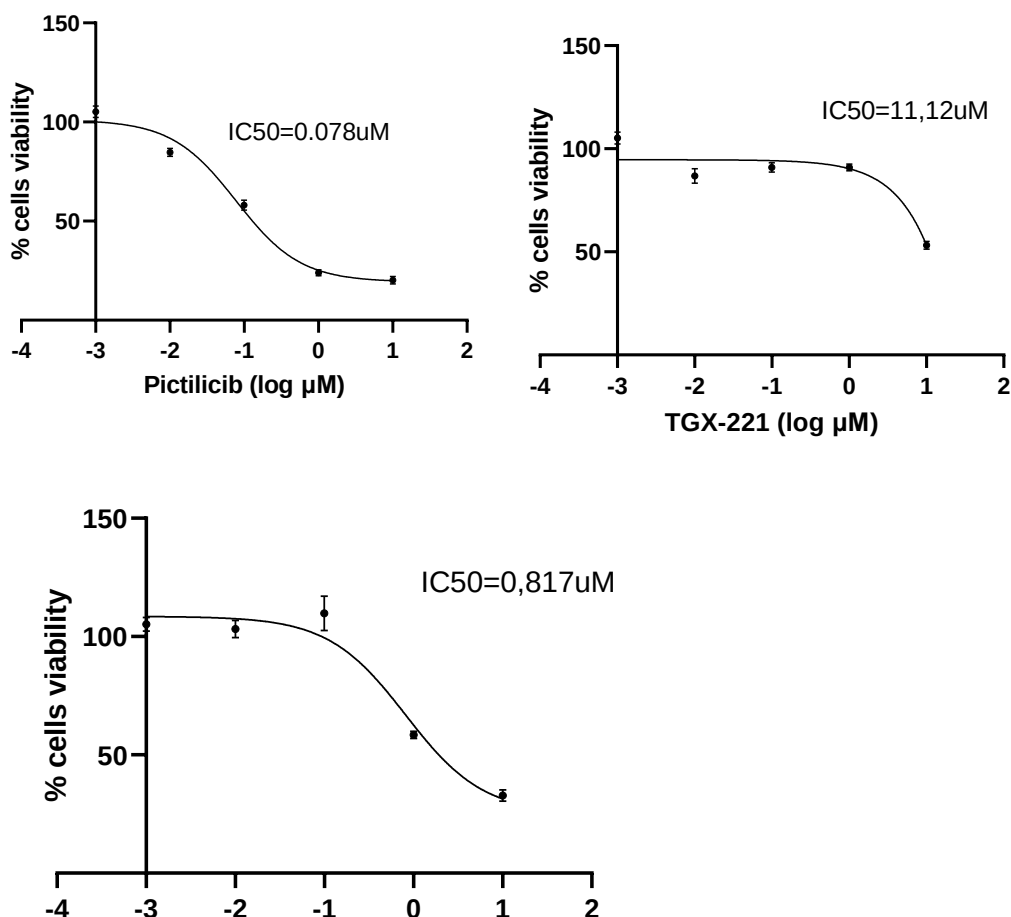
Διάγραμμα 4.2.1.3.1 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων MCF7 σε συγκεντρώσεις 0, 2000, 5000, 10000, 15000, 20000cells/mL και για χρονικό διάστημα 24, 48 και 72hr. Τα αποτελέσματα δίνονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και προέρχονται από n=4 αντιδράσεις σε τρία πειράματα. ***: $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

Από το διάγραμμα 4.2.1.3.1, παρατηρούμε ότι η ιδανική συγκέντρωση είναι τα 10000cells/mL, επειδή στις 72hrs, τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων της PI3K κινάσης, Pictilicib, A66, TGX-221 και του μορίου GS28, αναστολέα (in vitro) του PTEN, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων ως προς την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση στην κυτταρική σειρά DU-145, ύστερα από χορήγηση ξεχωριστά ή συνδυαστικά.



Γράφημα 4.2.1.3.2 Επί τοις εκατό κυτταρική ανάπτυξη της της κυτταρικής σειράς MCF-7, μετά από έκθεση 48 ωρών σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις των αναστολέων Pictilicib, A66, TGX-221. Η τιμή 100% βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού, αντιστοιχεί σε κύτταρα, απουσία επίδρασης κάποιου αναστολέα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).



Διάγραμμα 4.2.1.3.3 Δοσοεξαρτώμενη αντιπρολαπλασιαστική δράση των αναστολέων PI3K σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, σε λογαριθμική κλίμακα, από το οποίο διάγραμμα εξάγεται η τιμή IC₅₀ Για κάθε επίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates). $p < 0,0001$, **: $p > 0,0001$. ANOVA

Στο διάγραμμα 4.2.1.3.2 συγκρίνεται η αντιπολλαπλασιαστική δράση των PI3K αναστολέων Pictilicib A66 και TGX-221, καθώς και του μορίου GS27. Παρατηρούμε ότι το Pictilicib εμφανίζει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση, ειδικά σε συγκεντρώσεις 1μM και 10μM. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1μM το Pictilicib, προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιαστικού ρυθμού σε ποσοστό περίπου 80%, ενώ σε συγκέντρωση 10μM, αναστολή σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%. Μικρότερη συγκριτικά αντιπολλαπλασιαστική δράση εμφανίζει το A66, το οποίο σε συγκέντρωση 10μM αναστέλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%. Το TGX-221 εμφανίζει τη χαμηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση και σε συγκέντρωση 10μM αναστέλλει σε ποσοστό μεγαλύτερο από 40%.

Από το λογαριθμικό διάγραμμα 4.2.1.3.3, μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των αναστολέων που επιφέρουν αναστολή σε ποσοστό 50% για τον αναστολέα Pictilicib η τιμή είναι 0,078μM, για τον αναστολέα A66 η τιμή είναι 0,817μM ενώ για τον αναστολέα TGX-221 η τιμή IC50 είναι 11,12μM.

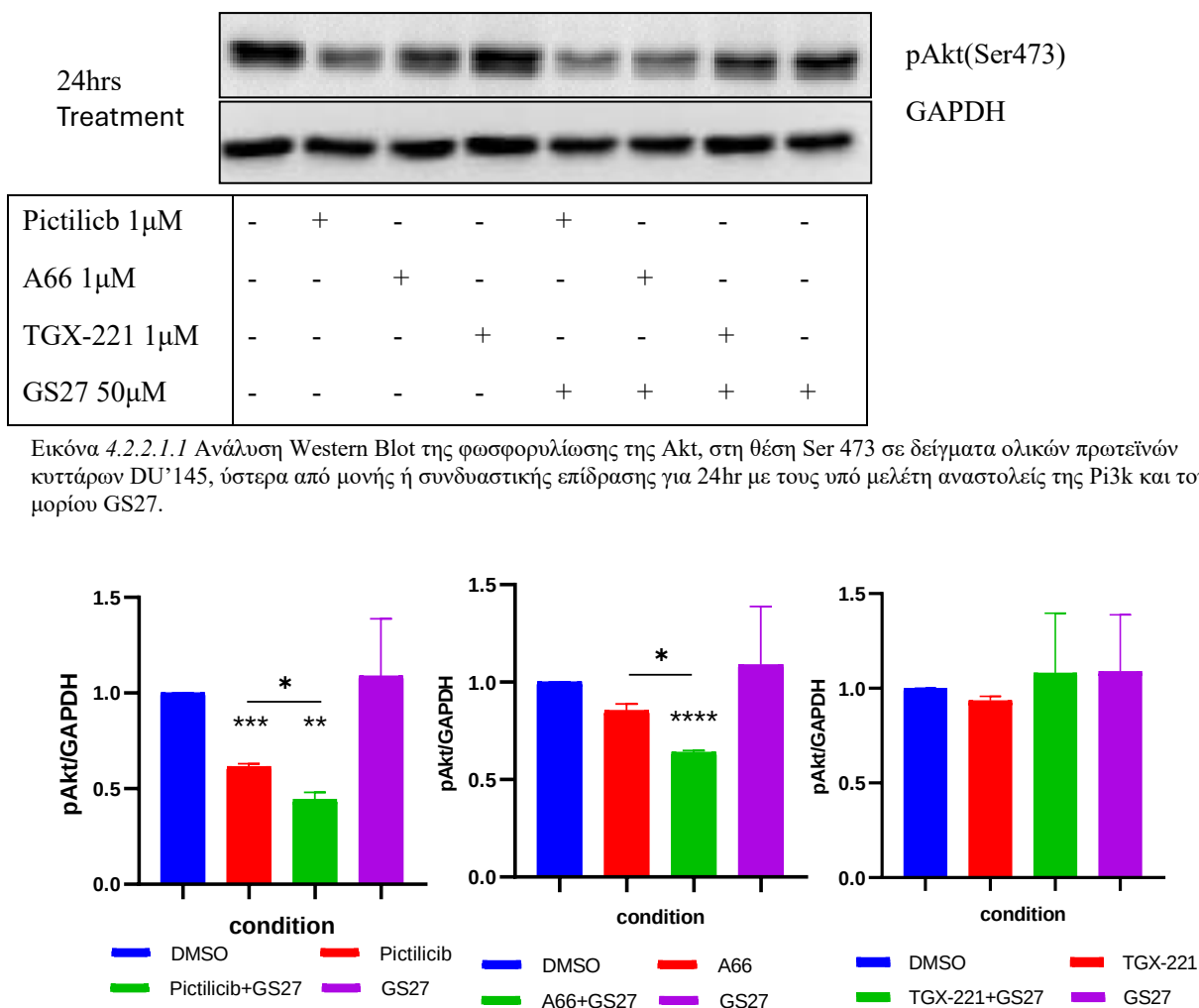
4.2.2 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K.

Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 hrs σε συγκέντρωση 1μM PI3K αναστολέων και 50μM GS27, είτε από μόνα τους είτε συνδυαστικά με το μόριο GS27, ώστε να μελετήσουμε τη μακροπρόθεσμη δράση των μορίων στο βιοσηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K και πιο συγκεκριμένα στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Akt στη θέση Ser473.

4.2.2.1 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K σε κύτταρα DU-145.

Στην εικόνα 4.2.2.1.1 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της pAkt (Ser473) και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη.

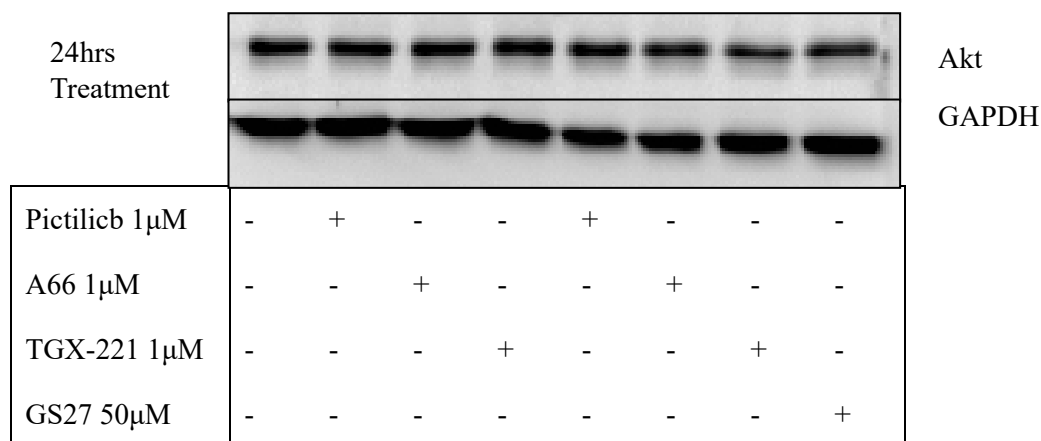
Στο γράφημα 4.2.2.1.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της pAkt (Ser473) κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) αναστέλλεται τόσο υπό την επίδραση Pictilicib 1μM, όσο και υπό την συνδυαστική επίδραση Pictilicib 1μM/GS27 50μM, κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιδράσεων. Επιπλέον, ότι η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) δεν αναστέλλεται ούτε υπό την επίδραση A66 1μM, ούτε και υπό την συνδυαστική επίδραση A66 1μM/GS27μM. Τέλος, η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) αναστέλλεται τόσο υπό την επίδραση TGX-221 1μM, όσο και υπό την συνδυαστική επίδραση TGX-221 1μM/GS27μM, κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιδράσεων.



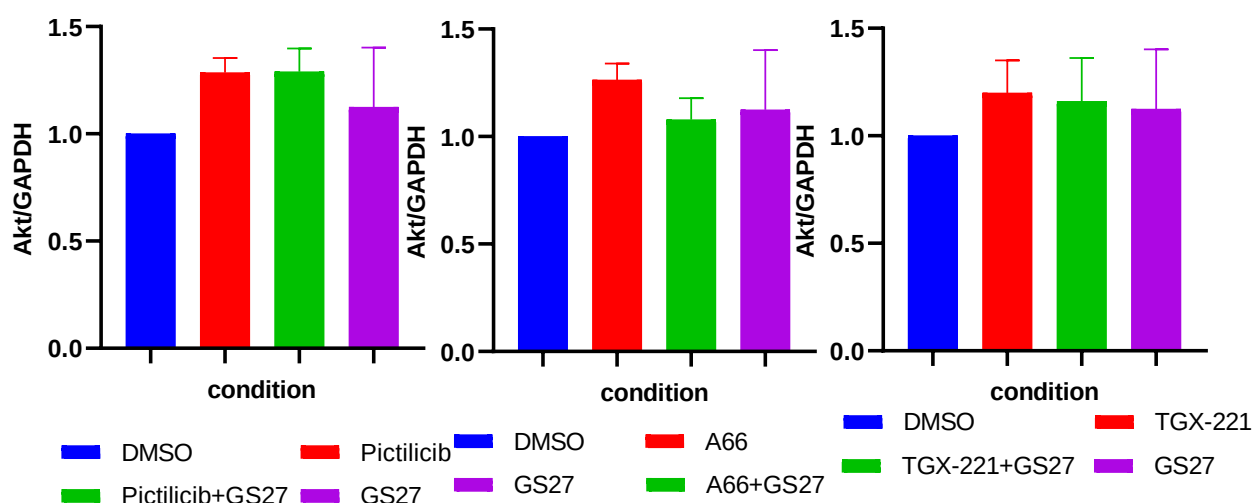
Εικόνα 4.2.2.1.1 Ανάλυση Western Blot της φωσφορυλίωσης της Akt, στη θέση Ser 473 σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων DU'145, ύστερα από μονής ή συνδυαστικής επίδρασης για 24hr με τους υπό μελέτη αναστολείς της Pi3k και του μορίου GS27.

Γράφημα 4.2.2.1.1 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.1.1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την Akt. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

Στην εικόνα 4.2.2.1.2 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της Akt και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη. Στο γράφημα 4.2.2.1.2 παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της Akt κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η έκφραση της Akt παραμένει σταθερή σε όλες τις συνθήκες.



Εικόνα 4.2.2.1.2 Ανάλυση Western Blot της Akt, σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων DU-145, ύστερα από μονή ή συνδυαστική επίδραση για 24hr με τους υπό τους μελέτη αναστολείς της PI3k και του μορίου GS27.

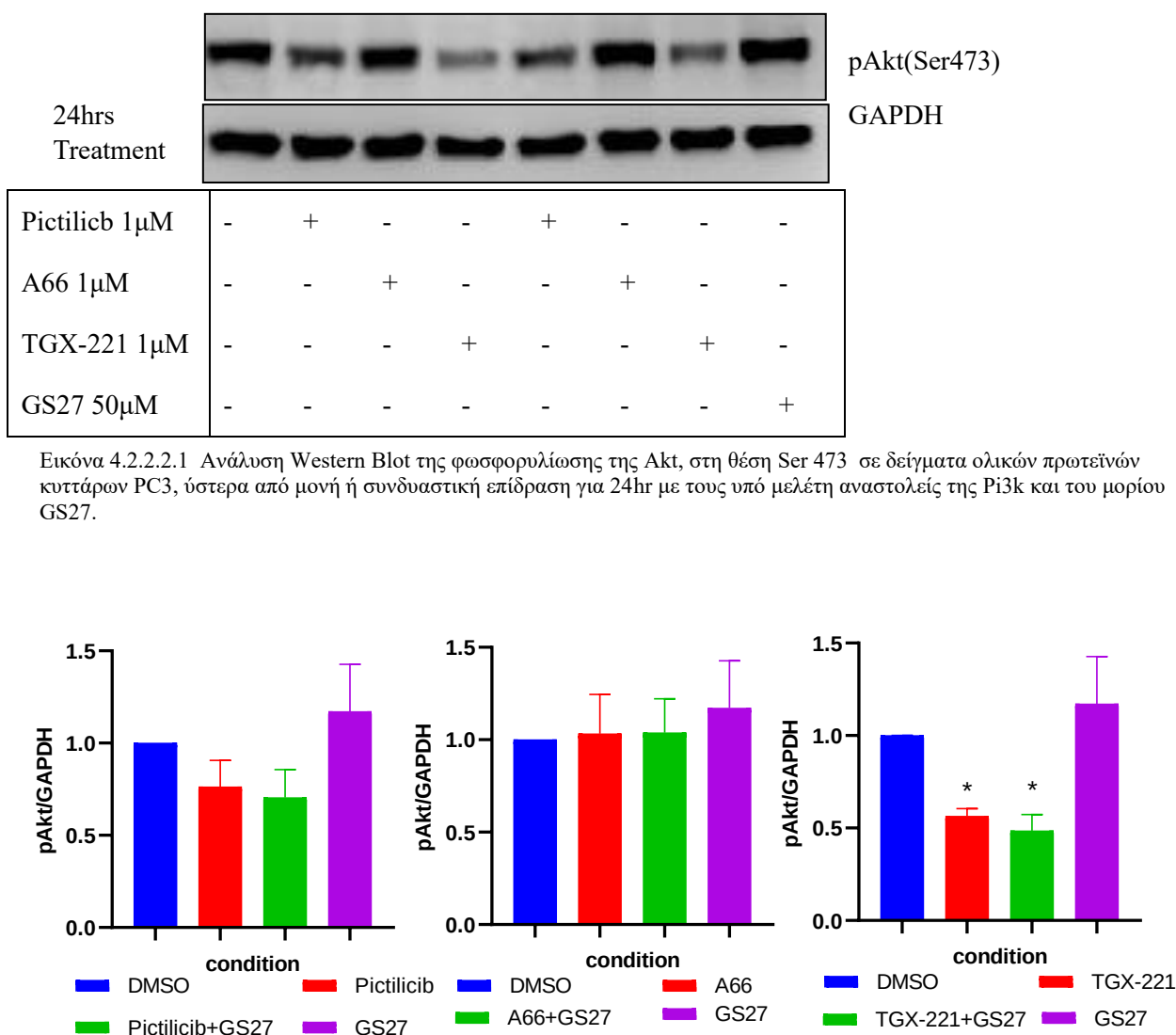


Γράφημα 4.2.2.1.2 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.1.2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

4.2.2.2 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K και του GS27 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K σε κύτταρα PC3.

Στην εικόνα 4.2.2.2.1 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της pAkt (Ser473) και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη. Στο γράφημα παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της pAkt (Ser473) κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) αναστέλλεται τόσο υπό την επίδραση Pictilicib 1μM, όσο και υπό την συνδυαστική επίδραση Pictilicib 1μM/GS27μM, ωστόσο κατά στατιστικά μη σημαντικό τρόπο. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) δεν αναστέλλεται ούτε υπό την επίδραση A66 1μM, ούτε και υπό την συνδυαστική

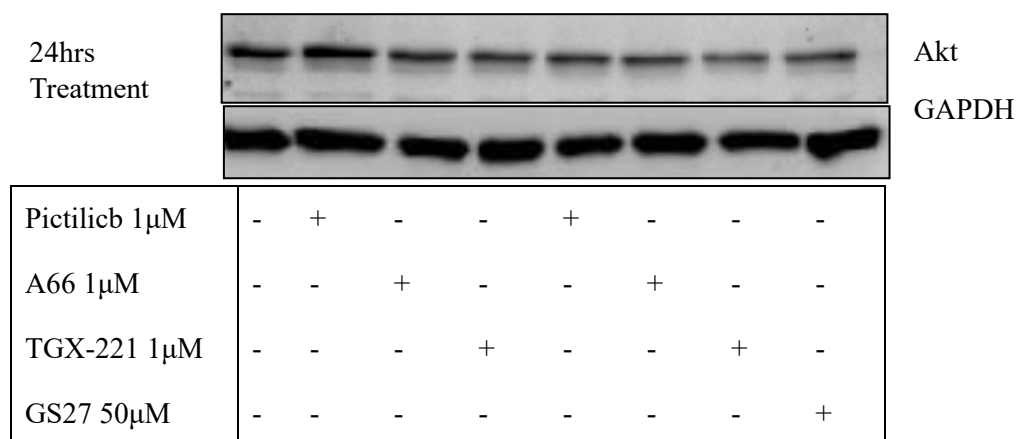
επίδραση A66 1μM/GS27μM. Τέλος, η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) αναστέλλεται τόσο υπό την επίδραση TGX-221 1μM , όσο και υπό την συνδυαστική επίδραση TGX-221 1μM/GS27μM, κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιδράσεων.



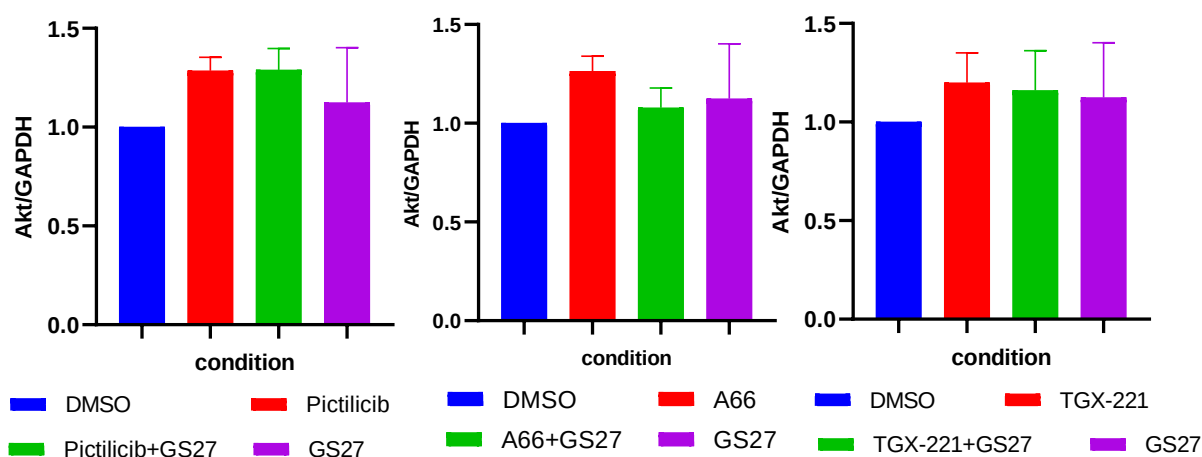
Εικόνα 4.2.2.2.1 Ανάλυση Western Blot της φωσφορυλίωσης της Akt, στη θέση Ser 473 σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων PC3, ύστερα από μονή ή συνδυαστική επίδραση για 24hr με τους υπό μελέτη αναστολείς της P13k και του μορίου GS27.

Γράφημα 4.2.2.2.1 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.2.1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

Στην εικόνα 4.2.2.2.2 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της Akt και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη. Στο γράφημα 4.2.2.2.2 παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της Akt κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η έκφραση της Akt παραμένει σταθερή σε όλες τις συνθήκες.



Εικόνα 4.2.2.2.2 Ανάλυση Western Blot της Akt, σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων PC3, ύστερα από μονή ή συνδυαστική επίδραση για 24hr με τους υπό μελέτη αναστολείς της PI3k και του μορίου GS27.

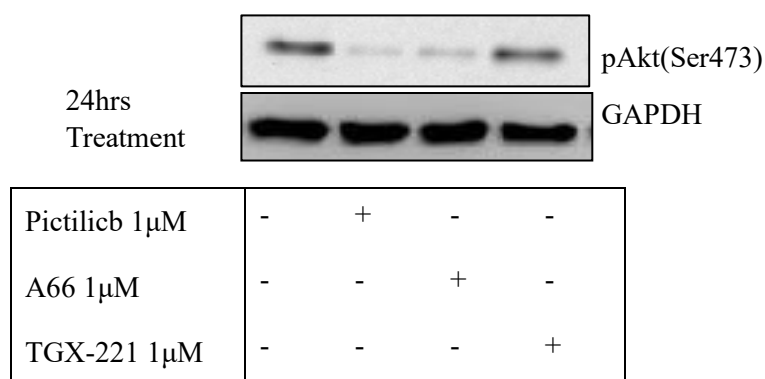


Γράφημα 4.2.2.2.2 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.2.2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

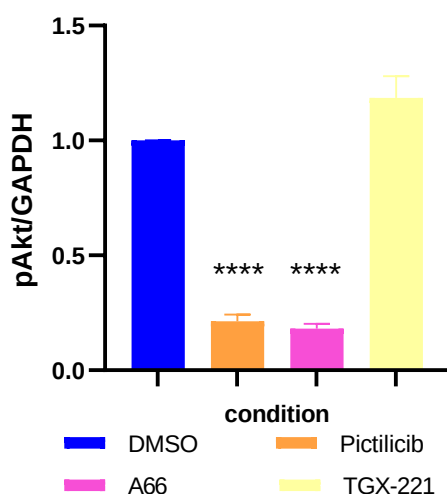
4.2.2.3 Μελέτη επίδρασης των αναστολέων της PI3K στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K σε κύτταρα MCF-7.

Στην εικόνα 4.2.2.3.1 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της pAkt (Ser473) και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη. Στο γράφημα 4.2.2.3.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της pAkt (Ser473)

κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) αναστέλλεται τόσο υπό την επίδραση Pictilicib 1μM , όσο και υπό την επίδραση A66 1μM κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση της Akt (Ser473) δεν αναστέλλεται υπό την επίδραση TGX-221 1μM.

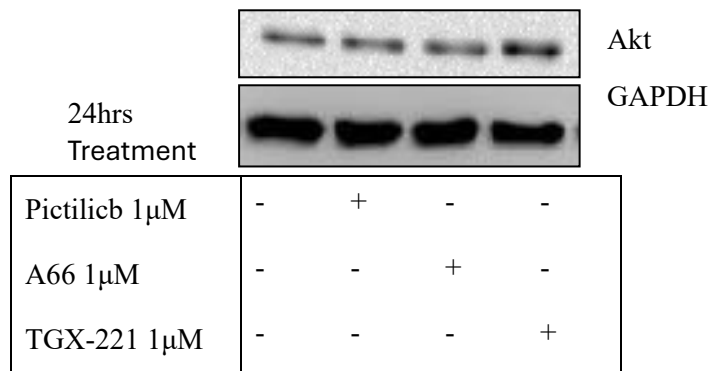


Εικόνα 4.2.2.3.1 Ανάλυση Western Blot της φωσφορυλίωσης της Akt, στη θέση Ser 473 σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων MCF7, ύστερα από επίδραση για 24hr με τους υπό μελέτη αναστολείς της Pi3K.

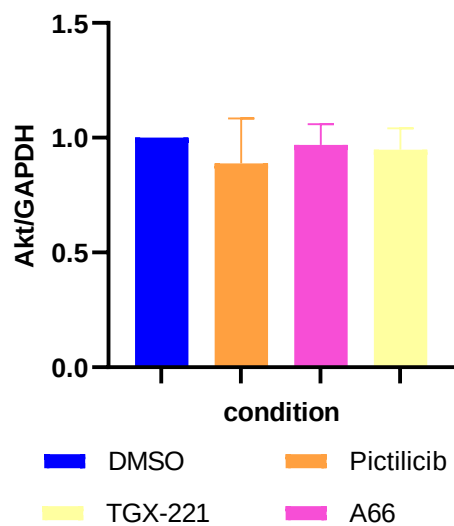


Γράφημα 4.2.2.3.1 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.3.1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

Στην εικόνα 4.2.2.3.2 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της Western Blot ως προς τα επίπεδα της Akt και της GAPDH, η οποία λειτουργεί ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλά δείγματα για την εκάστοτε συνθήκη, αλλά χάριν συντομίας στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα δείγμα από τα τριπλά από την εκάστοτε συνθήκη. Στο γράφημα 4.2.2.3.2 παρατίθενται τα αποτελέσματα της Western Blot, τα επίπεδα της Akt κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα της GAPDH. Παρατηρούμε, ότι η έκφραση της Akt παραμένει σταθερή σε όλες τις συνθήκες.



Εικόνα 4.2.2.3.2 Ανάλυση Western Blot της Akt, σε δείγματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων MCF7, ύστερα από επίδραση για 24hr με τους υπό μελέτη αναστολείς της Pi3K.



Γράφημα 4.2.2.3.2 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας 4.2.2.3.2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως κανονικοποίηση του κάθε δείγματος ως προς την GAPDH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος SEM και έχουν προκύψει από τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (biological replicates).

5 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στόχοι της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ενζυμική *in vitro* μελέτη της ανασταλτικής ικανότητας διάφορων παραγώγων ελευρωπαΐνης ως προς τη δραστικότητα λιπιδικής φωσφατάσης της PTEN και η πιθανή συνεργιστική δράση τους με αναστολείς της κινάσης PI3K στις καρκινικές σειρές PC3, DU-145 και MCF-7.

5.1 Πειράματα *in vitro*

5.1.1 Χαρακτηρισμός επαγωγής έκφρασης, απομόνωσης και ενεργότητας της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN

Με σκοπό την *in vitro* μελέτη της ανασταλτικής ικανότητας διαφόρων παραγώγων ολευρωπαΐνης ως προς την ενεργότητα της λιπιδικής φωσφατάσης της PTEN, έγινε επαγωγή έκφρασης και απομόνωση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης GST-PTEN, από βακτηριακά κύτταρα BL21 (DE3). Από την εικόνα 4.1.1.1 και το στιγμιότυπο ανοσοαποτύπωσης κατά Western, συμπεραίνεται ότι τα βακτηριακά κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο PGEX-6P-1-GST-PTEN, υπερεκφράζουν στο σωστό μοριακό βάρος την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-PTEN με την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Επιπλέον, από τη χρώση SDS-PAGE πηκτής με Coomassie Blue, συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη που εκλούεται ως τελικό προϊόν της απόμονωσής της με χρωματογραφία συγγενείας, είναι εξαιρετικής καθαρότητας και υψηλής συγκέντρωσης. Μαλιστα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το πειραματικό πρωτόκολλο μετασχηματισμού, επαγωγής της έκφρασης και απομόνωσης της ανασυνδυασμένης GST-PTEN, εξαιρετικά επαναλήψιμο. Τέλος, ως προς την ενεργότητα της λιπιδικής φωσφατάσης της ανασυνδιασμένης GST-PTEN, η οποία μελετήθηκε με την δοκιμή Green Malachite και με λιπιδικό υπόστρωμα το υδατοδιαλυτό PIP₃, η απομονωμένη GST-PTEN κρίνεται ενεργή.

5.1.2 Χαρακτηρισμός της πιθανής ανασταλτικής δράσης των παραγώγων ελευρωπαΐνης.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μελετήθηκαν τα παράγωγα ελευρωπαΐνης GS11, GS15, GS26, GS27, GS28, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ενζυμική δραστικότητα λιπιδικής φωσφατάσης της ανασυνδυασμένης GST-PTEN με τη δοκιμή Green Malachite και λιπιδικό υδατοδιαλυτό υπόστρωμα PIP₃.

Μεταξύ των υπό μελέτη παραγώγων, από το γράφημα 4.1.2.1 και τον Πίνακα 4.1.2.1 διαφαίνεται ότι το GS28 την σημαντικότερη ανασταλτική δράση παρουσιάζει, και ύστερα ακολουθούν τα GS27 και GS15. Μάλιστα, όπως φαίνεται και στο γράφημα 4.1.2.1.1, το GS28 αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα της λιπιδικής φωσφατάσης του ανασυνδυασμένου GST-PTEN σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%, ακόμα και σε συγκέντρωση 50μM. Τα παραπάνω, συμφωνούν με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο μηχανισμός της δράσης του GS28 ως προς την ενζυμική δραστηριότητα λιπιδικής φωσφατάσης GST-PTEN. Είναι γνωστό στη βιβλιογραφία, ότι τα σύμπλοκα bpV δρουν οξειδώνοντας το αμινοξικό κατάλοιπο Cys124 και σχηματίζοντας δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των καταλοίπων Cys124-Cys71, και ο μηχανισμός οξείδωσης που περιγράφηκε είναι αντιστρεπτός (C.-U. Lee et al., 2015, Pessoa et al., 2015). Επιπλέον, και τα σύμπλοκα τύπου VO αν και δεν εμφανίζουν οξειδωτικό μηχανισμό, ο μηχανισμός αναστολής τους είναι επίσης αντιστρεπτός (Collins et al., 2016). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, διερευνήθηκε εάν το GS28 ακολουθεί οξειδωτικό μηχανισμό δράσης.

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν, όπως φαίνεται στο 4.1.2.2.1διάγραμμα, συμπεραίνεται ότι το GS28, δρα με οξειδωτικό μηχανισμό αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα λιπιδικής φωσφατάσης της ανασυνδυασμένης GST-PTEN, αφού απουσία αναγωγικού μέσου, παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, σε ποσοστό σχεδόν 100%.

Ως προς την αντιστρεπτότητα του μηχανισμού οξείδωσης του PTEN από το GS28, από το γράφημα 4.1.2.3.1διαφαίνεται ότι ο μηχανισμός αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας λιπιδικής φωσφατάσης GST-PTEN, δεν είναι αντιστρεπτός, αφού και στις δύο συνθήκες που μελετήθηκαν το ποσοστό αναστολής είναι παρόμοιο.

5.2 Πειράματα σε κυτταρικές σειρές

5.2.1 Επίδραση αναστολέων στην κυτταρική ανάπτυξη

Προκειμένου να μελετηθεί εάν το παράγωγο GS27 επιδρά στον μεταβολισμό των λιπιδίων συνεργιστικά με τους ήδη γνωστούς αναστολείς της PI3K, Pictilicib, A66, TGX-221, αποτιμήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα τους σε δύο καρκινικές σειρές προστάτη, την DU-145 κυτταρική σειρά η οποία είναι PTEN WT και την PC-3, που είναι PTEN null. Επίσης, μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική τους ικανότητα στην καρκινική σειρά μαστού MCF-7, η οποία επίσης είναι PTEN WT και υπολογίστηκε η συγκέντρωση IC50 για κάθε υπό μελέτη συνθήκη.

Η αξιολόγηση της αντιπολλαπλασιαστικής ικανότητας των εκάστοτε αναστολέων στις διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές μελετήθηκε με την μέθοδο χρώσης με σουλφουροδαμίνη

(SRB) και η αντιπολλαπλασιαστική δράση μεταφράζεται ως συνάρτηση της συνολικής πρωτεΐνης των ζωντανών κυττάρων.

Από την αξιολόγηση των αναστολέων στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων DU-145, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.2.1.1.2, το Pictilicib, εμφανίζει ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση σε σχέση με το TGX-221, ενώ το A66 φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων. Μάλιστα, η επίδραση Pictilisib σε συγκέντρωση 1μM μειώνει την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα σε ποσοστό περίπου 40%, ενώ σε συγκέντρωση 10μM, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%. Από την συνδυαστική επίδραση των αναστολέων με το παράγωγο ελευρωπαΐνης GS27, παρατηρείται ότι δεν εμφανίζει συνεργιστικό αποτέλεσμα με τους αναστολείς Pictilicib και A66. Εξάιρεση αποτελεί η συνδυαστική επίδραση του TGX-221 σε συγκέντρωση 10μM με GS27, κατά την οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των DU-145 κυττάρων.

Ως προς την προστατική κυτταρική σειρά PC-3, από την αξιολόγηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των αναστολέων, φαίνεται στο διάγραμμα 4.2.1.2.2 πως το Pictilicib εμφανίζει την ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση, και ακολουθούν το TGX-221 και το A66. Πιο αναλυτικά, το Pictilisib μειώνει τον πολλαπλασιαστικό ρυθμό σε συγκέντρωση 1μM σε ποσοστό 80%, ενώ σε συγκέντρωση 10μM σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%. Μάλιστα, το Pictilisib, μετά από τη συνδυαστική επίδραση με το GS27 σε συγκέντρωση 1μM, εμφανίζει στατιστικά σημαντική επίδραση, η οποία υποδεικνύει πιθανή συνεργιστική δράση υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Το TGX-221, σε συγκέντρωση 10μM εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%, ενώ το A66 στην ίδια συγκέντρωση σε ποσοστό μεγαλύτερο από 40%. Αντίστοιχα, από την συνδυαστική επίδραση των προαναφερθέντων αναστολέων με το παράγωγο ελευρωπαΐνης GS27, φαίνεται να επέρχεται στατιστικά σημαντική μείωση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του TGX-221 στις συγκεντρώσεις 10μM και 1μM μετά από συνδυαστική επίδραση του με GS27, υποδεικνύοντας συνεργιστική δράση των δύο αναστολέων στις συγκεντρώσεις αυτές.

Τέλος, για την καρκινική σειρά μαστού MCF-7, στην οποία μελετήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική δράση των προαναφερθέντων αναστολέων, παρατηρείται στο διάγραμμα 4.2.1.3.2 ότι το Pictilicib, εμφανίζει την ισχυρότερη επίδραση, ενώ ακολουθούν το A66 και το TGX-221. Πιο συγκεκριμένα, το Pictilicib, εμφανίζει σε συγκέντρωση 1μM αναστολή του πολλαπλασιαστικού ρυθμού σε ποσοστό περίπου 80%, και σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%, συγκέντρωση 10μM. Το A66 σε συγκέντρωση 10μM εμφανίζει αναστολή της αντιπολλαπλασιαστικής ικανότητας σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%, ενώ το TGX-221 στην ίδια συγκέντρωση, σε ποσοστό μικρότερο από 40%.

Για τους αναστολείς της PI3K που μελετώνται στη παρούσα εργασία, είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία οι τιμές IC₅₀ και EC₅₀ για μια πληθώρα καρκινικών σειρών, μεταξύ των οποίων και οι DU-145, PC3 και MCF-7, εξασφαλίζοντας έτσι αξιοπιστία στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Το Pictilicib, το οποίο είναι παν-αναστολέας, σε ενζυμικά πειράματα εμφανίζει IC₅₀ 3nM ως προς την ισομορφή PI3K p110α και p110δ, 33nM ως προς την ισομορφή PI3K p110β και 75nM ως προς την ισομορφή PI3K p110γ. Στη βιβλιογραφία, εμφανίζει εύρος συγκέντρωσης EC₅₀ που κυμαίνεται μεταξύ 0,25μM και 1μM, ως προς την κυτταρική σειρά DU-145, 0,28-0,8μM ως προς την σειρά MCF-7 και 0,28-0,34μM ως προς την σειρά PC3. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀, για τα κύτταρα DU-145 είναι 0,388μM, για τα MCF-7 είναι 0,105μM και για τα PC3 είναι 0,078μM, συνεπώς. Επίσης υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀ για το Pictilicib, μετά από συγχορήγηση του GS27, και η τιμή EC₅₀ είναι 0,575μM για τα DU-147 κύτταρα και 0,043μM για τα PC3 κύτταρα. Στα PC3 κύτταρα, παρατηρείται μείωση της τιμής EC₅₀ έπειτα από συγχορήγηση του GS27, που υποδεικνύει πιθανή συνεργιστική δράση τους.

Το A66, το οποίο είναι αναστολέας της PI3Kα, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι έχει IC₅₀ 32nM ως προς την PI3Kα, μεγαλύτερη από 1,25μM ως προς την PI3Kδ, μεγαλύτερη από 12,5μM ως προς την PI3Kβ και 3,38mM ως προς την PI3Kγ. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀, για τα κύτταρα DU-145 είναι 2,973μM, για τα MCF-7 είναι 0,817μM και για τα PC3 είναι 7,33μM. Επίσης υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀ για το A66, μετά από συγχορήγηση του GS27, και η τιμή EC₅₀ είναι 1,322μM για τα DU-147 κύτταρα και 5,842μM για τα PC3 κύτταρα, οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη τιμή χωρίς την επίδραση του GS27, αποτέλεσμα που υποδηλώνει πιθανή συνεργιστική επίδραση του GS27 στην δράση του αναστολέα A66 στην κυτταρική σειρά PC3.

Το TGX-221, το οποίο είναι αναστολέας της PI3Kβ, έχει αναφερθεί ότι έχει IC₅₀ 5nM ως προς την PI3Kβ, 0,1μM ως προς την PI3Kδ και EC₅₀ 35,6 μM ως προς την κυτταρική σειρά DU-145 και 18.2μM ως προς την κυτταρική σειρά PC3. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, υπολογίστηκε η τιμή EC₅₀ για τα κύτταρα MCF-7 είναι 11,2μM, για τα DU-145 είναι 11,15μM και για τα PC3 είναι 0,106μM. Η τιμή EC₅₀ για το TGX-221 υπολογίστηκε μετά από συγχορήγηση του GS27, και η τιμή EC₅₀ είναι 3,273μM για τα DU-147 κύτταρα και 0,049μM για τα PC3 κύτταρα, οι οποίες είναι σημαντικά μειωμένες από τις αντίστοιχες χωρίς την επίδραση του GS27, και υποδεικνύει πιθανή συνεργιστική δράση του GS27 στην δράση του αναστολέα TGX-221 στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

Στη βιβλιογραφία, γίνεται φανερό ότι κυτταρικές σειρές αρνητικές ως προς τον PTEN (PTEN null) εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία στο Pictilicib συγκριτικά με άλλους ισομορφοεκλεκτικούς αναστολείς της PI3K (Poovassery JS., et al, 2015). Λαμβάνοντας υπόψιν, όλα τα παραπάνω δεδομένα τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την ευαισθησία στο Pictilicib την κυτταρικής σειράς PC3 (PTEN null) εν συγκρίσει με τις κυτταρικές σειρές DU-145 και MCF-7 (PTEN WT). Ως

προς τη συνδυαστική επίδραση των γνωστών αναστολέων με το GS27, τα κύτταρα PC3 εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία ως προς τους συνδυασμούς Pictilicib/GS27 και TGX-21/GS27, συγκριτικά με τα DU-145. Αν και η απώλεια PTEN δεν αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ευαισθησία των PTEN null κυττάρων στους αναστολείς της PI3Kβ, η κυτταρική σειρά PC3 εμφανίζει υψηλή ευαισθησία ως προς το TGX-221, αναστέλλοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, επιβεβαιώνοντας έτσι τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Mao N., et al, 2021, Schwartz S, et al, 2015) . Η επίδραση με GS27 από μόνη της, ωστόσο δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στον ρυθμό πολλαπλασιασμού και συνεπώς στην τιμή EC50.

Τέλος, τα αποτελέσματα στην κυτταρική σειρά MCF7, η οποία φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο PIK3CA (E545K), ενεργοποιώντας (gain of function) το PI3K/Akt μονοπάτι, συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να έχουν υψηλότερη ευαισθησία ως προς τον αναστολέα της PI3Kα, A66 (Beaver JA., et al, 2013)

5.2.2 Επίδραση των αναστολέων στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt

Όπως αναλύθηκε εκτενώς στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας, το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt εμφανίζει πρωταρχικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης. Μάλιστα, η περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, χαρακτηρίζεται συχνά από PTEN μεταλλάξεις που έχουν ως συνέπεια την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt και την φωσφορυλίωση της Akt στα αμινοξικά κατάλοιπα Thr308 και Ser473 καθοδικά της PI3K. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων της PI3K, Pictilicib, A66 και TGX-221, μακροπρόθεσμα μετά από 24hr έκθεση των κυττάρων σε αυτούς είτε συνδυαστικά με το μόριο GS27.

Από το γράφημα 4.2.2.1.1. για την κυτταρική σειρά DU-145, το Pictilicib είτε από μόνο του είτε συνδυαστικά με το GS27 προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της Akt Ser473 ως προς το δείγμα ελέγχου, ενώ στατιστικά σημαντική είναι και η μεταξύ τους διαφορά. Αντίστοιχα, ο συνδυασμός A66 με το GS27 προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση ως προς το δείγμα ελέγχου αλλά και ως προς την επίδραση μόνο με A66. Αντιθέτως, η επίδραση με TGX-21 είτε μόνη της είτε συνδυαστικά με το GS27, δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt.

Από το γράφημα 4.2.2.2.1. για την κυτταρική σειρά PC3, το Pictilicib ενώ μειώνει την φωσφορυλίωση της Akt, αυτή η μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική, ούτε μετά την συνεπίδραση με το GS27. Η φωσφορυλίωση της Akt παραδόξως αυξάνει, κατά στατιστικά μη σημαντικό τρόπο, μετά την επίδραση με A66, παρουσία ή απουσία τους GS27. Σύμφωνα με τους Το TGX-221 ωστόσο παρουσία και απουσία τους GS27, μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser473, κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο, χωρίς ωστόσο η παρουσία του GS27 να συνεργεί στατιστικά σημαντικά στην παρατηρούμενη μείωση.

Από το γράφημα 4.2.2.3.1., για την κυτταρική σειρά MCF-7, στην οποία έγινε επίδραση μόνο με τους αναστολείς της PI3K, η επίδραση με το Pictilicib και το A66, επιφέρει εξαιρετικά υψηλή αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt. Αντιθέτως, η επίδραση με TGX-221 δεν επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα για τους γνωστούς αναστολείς της PI3K για τις κυτταρικές σειρές DU-145 και MCF7 (PTEN WT) συμφωνούν με την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, όσον αφορά την κυτταρική σειρά PC3 (PTEN null), δεν φαίνεται η αναμενόμενη μείωση φωσφορυλίωσης επιδράσει του παν-αναστολέα Pictilicib. Επιδράσει του αναστολέα της PI3Kβ, TGX-221 η στατιστικά σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt, βρίσκεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπως εξηγήθηκε αναλυτικότερα προηγουμένως (Mao N., et al, 2021, Schwartz S, et al, 2015). Τέλος, το GS27, φαίνεται πως επιδρά συνεργιστικά στην μείωση του βαθμού φωσφορυλίωσης της Akt, στην περίπτωση των DU-145 με το Pictilicib και το A66, και στην περίπτωση των PC3, συνεργιστικά με τον αναστολέα TGX-122.

5.2.3 Μελλοντικά πειράματα

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η φωσφορυλίωση της Akt, ρυθμίζει άμεσα τη de novo βιοσύνθεση των λιπιδίων, φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας την ACLY, αυξάνοντας έτσι τη βιοσύνθεση του ακετυλο-συνενζύμου A. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, θα είχε εξαιρετικό ενδιαφέρον η μελέτη της συνδυαστικής επίδρασης των PI3K αναστολέων συνεπιδράσει του συνθετικού παραγώγου ελευρωπαΐνης GS27, ως προς το προφίλ μεταβολισμού των λιπιδίων των υπό μελέτη καρκινικών σειρών, ως προς τα επίπεδα ενεργοποίησης της ACLY, ως προς την μετατόπιση της pAkt στον πυρήνα των κυττάρων και ως προς την αποθηκευμένη ως εστέρας χοληστερόλης, σε μορφή σταγονιδίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

6 Βιβλιογραφία

- Ahmad F, Cherukuri MK, Choyke PL. Metabolic reprogramming in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2021 Oct;125(9):1185-1196. doi: 10.1038/s41416-021-01435-5. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34262149; PMCID: PMC8548338.
- Altinoğlu, S. A., Wang, M., Li, K. Q., Li, Y., & Xu, Q. (2016). Intracellular delivery of the PTEN protein using cationic lipidoids for cancer therapy. *Biomaterials Science*, 4(12), 1773–1780.
- Baek, S. H., Lee, J. H., Kim, C., Ko, J.-H., Ryu, S.-H., Lee, S.-G., Yang, W. M., Um, J.-Y., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Sethi, G., & Ahn, K. S. (2017). Ginkgolic Acid C 17:1, Derived from Ginkgo biloba Leaves, Suppresses Constitutive and Inducible STAT3 Activation through Induction of PTEN and SHP-1 Tyrosine Phosphatase. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2), 276. <https://doi.org/10.3390/molecules22020276>
- Beaver JA, Gustin JP, Yi KH, Rajpurohit A, Thomas M, Gilbert SF, Rosen DM, Ho Park B, Lauring J. PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5413-22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0884. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23888070; PMCID: PMC3805128.
- Belter, A., Rolle, K., Piwecka, M., Fedoruk-Wyszomirska, A., Naskręt-Barciszewska, M. Z., & Barciszewski, J. (2016). Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.
- Bolduc, D., Rahdar, M., Tu-Sekine, B., Sivakumaren, S. C., Raben, D., Amzel, L. M., Devreotes, P., Gabelli, S. B., & Cole, P. (2013). Phosphorylation-mediated PTEN conformational closure and deactivation revealed with protein semisynthesis. *Elife*, 2, e00691.
- Bononi, A., & Pinton, P. (2015). Study of PTEN subcellular localization. *Methods*, 77, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.002>
- Boosani, C. S., & Agrawal, D. K. (2013). PTEN modulators: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(5), 569–580.
- Boosani, C. S., Gunasekar, P., & Agrawal, D. K. (2019). An update on PTEN modulators—a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(11), 881–889.
- Borges, G. A., Webber, L. P., M Marques, A. E., Guerra, E. N. S., Castilho, R. M., & Squarize, C. H. (2020). Pharmacological PTEN inhibition: Potential clinical applications and effects in tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, 15(2), 1329–1344. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0065>

- Brito, M. B., Goulielmaki, E., & Papakonstanti, E. A. (2015). Focus on PTEN regulation. *Frontiers in Oncology*, 5(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00166>
- Burdon, R. H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(4), 775–794.
- Butler, M., McKay, R. A., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Witchell, D., Murray, S. F., Dean, N. M., Bhanot, S., & Monia, B. P. (2002). Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Diabetes*, 51(4), 1028–1034.
- Cao, J., Schulte, J., Knight, A., Leslie, N. R., Zagozdzon, A., Bronson, R., Manevich, Y., Beeson, C., & Neumann, C. A. (2009). Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *The EMBO Journal*, 28(10), 1505–1517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2009.101>
- Carracedo, A., & Pandolfi, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: Of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, 27(41), 5527–5541. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.247>
- Chadborn, N. H., Ahmed, A. I., Holt, M. R., Prinjha, R., Dunn, G. A., Jones, G. E., & Eickholt, B. J. (2006). PTEN couples Semaphora3A signalling to growth cone collapse. *Journal of Cell Science*, 119(5), 951–957.
- Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 127–150.
- Chen, Z., Chen, B., Xu, W.-F., Liu, R.-F., Yang, J., & Yu, C.-X. (2012). Effects of PTEN inhibition on regulation of tau phosphorylation in an okadaic acid-induced neurodegeneration model. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(6), 411–419.
- Collins, J., Cilibrizzi, A., Fedorova, M., Whyte, G., Mak, L. H., Guterman, I., Leatherbarrow, R., Woscholski, R., & Vilar, R. (2016). Vanadyl complexes with dansyl-labelled di-picolinic acid ligands: synthesis, phosphatase inhibition activity and cellular uptake studies. *Dalton Transactions*, 45(16), 7104–7113.
- Das, S., Dixon, J. E., & Cho, W. (2003). Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7491–7496.
- De Paula, M. L., Cui, Q., Hossain, S., Antel, J., & Almazan, G. (2014). The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. *Glia*, 62(1), 64–77.
- Endicott SJ, Ziemba ZJ, Beckmann LJ, Boynton DN, Miller RA. Inhibition of class I PI3K enhances chaperone-mediated autophagy. *J Cell Biol*. 2020 Dec 7;219(12):e202001031. doi: 10.1083/jcb.202001031. PMID: 33048163; PMCID: PMC7557678.

- Fallon, L., Bélanger, C. M. L., Corera, A. T., Kontogiannia, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., Voortman, J., Haber, M., Rouleau, G., & Thorarindottir, T. (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI (3) K–Akt signalling. *Nature Cell Biology*, 8(8), 834–842.
- Foster, M. W., Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine*, 15(9), 391–404.
- Gatenby, R., Gillies, R. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat Rev Cancer* 4, 891–899 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrc1478>
- Gogvadze, V. G., & Zhukova, A. A. (1991). The role of lipid peroxidation products in cumene hydroperoxide-induced Ca²⁺ efflux from mitochondria. *FEBS Letters*, 287(1), 139–141. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80034-Z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80034-Z)
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714–2723.
- Gupta, A., Anjomani-Virmouni, S., Koundouros, N., Dimitriadi, M., Choo-Wing, R., Valle, A., Zheng, Y., Chiu, Y.-H., Agnihotri, S., & Zadeh, G. (2017). PARK2 depletion connects energy and oxidative stress to PI3K/Akt activation via PTEN S-nitrosylation. *Molecular Cell*, 65(6), 999–1013.
- Gupta, A., Anjomani-Virmouni, S., Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2017). PARK2 loss promotes cancer progression via redox-mediated inactivation of PTEN. *Molecular & Cellular Oncology*, 4(6), e1329692.
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005 Oct;8(4):311-21. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008. PMID: 16226706.
- Han, S.-J., Zhang, Y., Kim, I., Chay, K.-O., Yoon, H. J., Jang, D. Il, Yang, S. Y., Park, J., Woo, H. A., Park, I., & Lee, S.-R. (2017). Redox regulation of the tumor suppressor PTEN by the thioredoxin system and cumene hydroperoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.029>
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., & Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 647–662. <https://doi.org/10.1042/BST0340647>
- Hopkins, B. D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Rapp, Z., Shaw, J., Pappas, K., Jennifer, S. Y., Hodakoski, C., & Mense, S. (2013). A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter

- signaling and survival. *Science*, 341(6144), 399–402.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huu, T. N., Park, J., Zhang, Y., Park, I., Yoon, H. J., Woo, H. A., & Lee, S. R. (2021). Redox regulation of pten by peroxiredoxins. *Antioxidants*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox10020302>
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresser, M. J., & Ramachandran, C. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 843–851. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.843>
- Kakumoto, T., & Nakata, T. (2013). Optogenetic control of PIP3: PIP3 is sufficient to induce the actin-based active part of growth cones and is regulated via endocytosis. *PloS One*, 8(8), e70861.
- Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., DeNicola, G., Webster, K. A., Weiss, D., & Perez-Mancera, P. A. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 147(2), 382–395.
- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C., Kawamura, N., Tamura, M., & Hashimoto, S. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17474–17479.
- Ketschek, A., & Gallo, G. (2010). Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia. *Journal of Neuroscience*, 30(36), 12185–12197.
- Knafo, S., Sánchez-Puelles, C., Palomer, E., Delgado, I., Draffin, J. E., Mingo, J., Wahle, T., Kaleka, K., Mou, L., & Pereda-Perez, I. (2016). PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nature Neuroscience*, 19(3), 443–453.
- Kotzampasi DM, Premeti K, Papafotika A, Syropoulou V, Christoforidis S, Cournia Z, Leondaritis G. The orchestrated signaling by PI3K α and PTEN at the membrane interface. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022 Oct 7;20:5607-5621. doi: 10.1016/j.csbj.2022.10.007. PMID: 36284707; PMCID: PMC9578963.
- Kreis, P., Hendricusdottir, R., Kay, L., Papageorgiou, I. E., van Diepen, M., Mack, T., Ryves, J., Harwood, A., Leslie, N. R., & Kann, O. (2013). Phosphorylation of the actin binding protein Drebrin at S647 is regulated by neuronal activity and PTEN. *PLoS One*, 8(8), e71957.
- Kreis, P., Leondaritis, G., Lieberam, I., & Eickholt, B. J. (2014). Subcellular targeting and dynamic

- regulation of PTEN: Implications for neuronal cells and neurological disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(1 APR), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00023>
- Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R., & Rhee, S. G. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16419 LP – 16424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407396101>
- Lee, C.-U., Hahne, G., Hanske, J., Bange, T., Bier, D., Rademacher, C., Hennig, S., & Grossmann, T. N. (2015). Redox Modulation of PTEN Phosphatase Activity by Hydrogen Peroxide and Bisperoxidovanadium Complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(46), 13796–13800. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201506338>
- Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Cristofano, A. Di, Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., & Pavletich, N. P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: Implications for its phosphoinositide phosphatase activity and mLee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Cristofano, A. Di, Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., & Pavletich, N. P. (1999). Crystal. *Cell*, 99(3), 323–334.
- Lee, Y.-R., Chen, M., Lee, J. D., Zhang, J., Lin, S.-Y., Fu, T.-M., Chen, H., Ishikawa, T., Chiang, S.-Y., & Katon, J. (2019). Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science*, 364(6441).
- Leslie, N. R., Kriplani, N., Hermida, M. A., Alvarez-Garcia, V., & Wise, H. M. (2016). The PTEN protein: Cellular localization and post-translational regulation. *Biochemical Society Transactions*, 44, 273–278. <https://doi.org/10.1042/BST20150224>
- Li, N.-N., Meng, X.-S., Bao, Y.-R., Wang, S., & Li, T.-J. (2018). Evidence for the Involvement of COX-2/VEGF and PTEN/PI3K/AKT Pathway the Mechanism of Oroxin B Treated Liver Cancer. *Pharmacognosy Magazine*, 14(54), 207–213. https://doi.org/10.4103/pm.pm_119_17
- Li, Y., Prasad, A., Jia, Y., Roy, S. G., Loison, F., Mondal, S., Kocjan, P., Silberstein, L. E., Ding, S., & Luo, H. R. (2011). Pre-treatment with PTEN inhibitor SF1670 augments the efficacy of granulocyte transfusion in a clinically relevant mouse model. *Blood*, 117(24), 6702–6713.
- Li, Zhong, Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., & Li, L. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nature Cell Biology*, 7(4), 399–404.
- Li, Zhonghan, & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(8), 622–638.
- Lin, D.-C., Xu, L., Chen, Y., Yan, H., Hazawa, M., Doan, N., Said, J. W., Ding, L.-W., Liu, L.-Z., &

- Yang, H. (2015). Genomic and functional analysis of the E3 ligase PARK2 in glioma. *Cancer Research*, 75(9), 1815–1827.
- Lindsay, Y., McCoull, D., Davidson, L., Leslie, N. R., Fairservice, A., Gray, A., Lucocq, J., & Downes, C. P. (2006). Localization of agonist-sensitive PtdIns (3, 4, 5) P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. *Journal of Cell Science*, 119(24), 5160–5168.
- Liu, K., Lu, Y., Lee, J. K., Samara, R., Willenberg, R., Sears-Kraxberger, I., Tedeschi, A., Park, K. K., Jin, D., & Cai, B. (2010). PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1075–1081.
- Liu, T., Wang, Y., Wang, Y., & Chan, A. M. (2019). Multifaceted regulation of PTEN subcellular distributions and biological functions. *Cancers*, 11(9), 1247.
- Liu, X.-Y., Zhang, L.-J., Chen, Z., & Liu, L.-B. (2017). The PTEN inhibitor bpV (pic) promotes neuroprotection against amyloid β -peptide (25-35)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Neurological Research*, 39(8), 758–765.
- Mak, L. H., Vilar, R., & Woscholski, R. (2010). Characterisation of the PTEN inhibitor VO-OHPic. *Journal of Chemical Biology*, 3(4), 157–163.
- Mao, L., Jia, J., Zhou, X., Xiao, Y., Wang, Y., Mao, X., Zhen, X., Guan, Y., Alkayed, N. J., & Cheng, J. (2013). Delayed administration of a PTEN inhibitor BPV improves functional recovery after experimental stroke. *Neuroscience*, 231, 272–281.
- Mao N, Zhang Z, Lee YS, Choi D, Rivera AA, Li D, Lee C, Haywood S, Chen X, Chang Q, Xu G, Chen HA, de Stanchina E, Sawyers C, Rosen N, Hsieh AC, Chen Y, Carver BS. Defining the therapeutic selective dependencies for distinct subtypes of PI3K pathway-altered prostate cancers. *Nat Commun*. 2021 Aug 20;12(1):5053. doi: 10.1038/s41467-021-25341-9. PMID: 34417459; PMCID: PMC8379232.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298–306.
- McLoughlin, N. M., Mueller, C., & Grossmann, T. N. (2018). The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. *Cell Chemical Biology*, 25(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.009>
- Mihai, C., Bao, S., Lai, J.-P., Ghadiali, S. N., & Knoell, D. L. (2012). PTEN inhibition improves wound healing in lung epithelia through changes in cellular mechanics that enhance migration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(3), L287–L299.
- Novella-Maestre, E., Herraiz, S., Rodríguez-Iglesias, B., Díaz-García, C., & Pellicer, A. (2015). Short-term PTEN inhibition improves in vitro activation of primordial follicles, preserves follicular

- viability, and restores AMH levels in cryopreserved ovarian tissue from cancer patients. *PLoS One*, 10(5), e0127786.
- Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., & Kamata, H. (2011). On–off system for PI3-kinase–Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10349–10354.
- Obad, S., dos Santos, C. O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E. M., Hansen, H. F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J., & Kauppinen, S. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*, 43(4), 371–378. <https://doi.org/10.1038/ng.786>
- Ohtake, Y., Park, D., Abdul-Muneer, P. M., Li, H., Xu, B., Sharma, K., Smith, G. M., Selzer, M. E., & Li, S. (2014). The effect of systemic PTEN antagonist peptides on axon growth and functional recovery after spinal cord injury. *Biomaterials*, 35(16), 4610–4626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.037>
- Parsons, R. (2019). Restoring tumor suppression. *Science*, 364(6441), 633–634.
- Pessoa, J. C., Garribba, E., Santos, M. F. A., & Santos-Silva, T. (2015). Vanadium and proteins: uptake, transport, structure, activity and function. *Coordination Chemistry Reviews*, 301, 49–86.
- Poovassery JS, Kang JC, Kim D, Ober RJ, Ward ES. Antibody targeting of HER2/HER3 signaling overcomes heregulin-induced resistance to PI3K inhibition in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015 Jul 15;137(2):267-77. doi: 10.1002/ijc.29378. Epub 2014 Dec 19. PMID: 25471734.
- Pulido, R. (2018). PTEN inhibition in human disease therapy. *Molecules*, 23(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules23020285>
- Putz, U., Howitt, J., Doan, A., Goh, C.-P., Low, L.-H., Silke, J., & Tan, S.-S. (2012). The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Science Signaling*, 5(243), ra70–ra70.
- Rahimzadeh M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Arab S, Mobasheri H. Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun*. 2016 Dec;5(4):257-261.
- Rahdar, M., Inoue, T., Meyer, T., Zhang, J., Vazquez, F., & Devreotes, P. N. (2009). A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 480–485.
- Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S.-R., & Kwon, J. (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science Signaling*, 2000(53), pe1–

pel.

- Rosivatz, E., Matthews, J. G., McDonald, N. Q., Mulet, X., Ho, K. K., Lossi, N., Schmid, A. C., Mirabelli, M., Pomeranz, K. M., & Erneux, C. (2006). A small-molecule inhibitor for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN). *ACS Chemical Biology*, 1(12), 780–790.
- Schmid, A. C., Byrne, R. D., Vilar, R., & Woscholski, R. (2004). Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Letters*, 566(1–3), 35–38.
- Shen, W. H., Balajee, A. S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P. P., & Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*, 128(1), 157–170.
- Shiwarski, D. J., Tipton, A., Giraldo, M. D., Schmidt, B. F., Gold, M. S., Pradhan, A. A., & Puthenveedu, M. A. (2017). A PTEN-regulated checkpoint controls surface delivery of δ opioid receptors. *Journal of Neuroscience*, 37(14), 3741–3752.
- Schwartz S, Wongvipat J, Trigwell CB, Hancox U, Carver BS, Rodrik-Outmezguine V, Will M, Yellen P, de Stanchina E, Baselga J, Scher HI, Barry ST, Sawyers CL, Chandarlapaty S, Rosen N. Feedback suppression of PI3K α signaling in PTEN-mutated tumors is relieved by selective inhibition of PI3K β . *Cancer Cell*. 2015 Jan 12;27(1):109-22. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.008. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25544636; PMCID: PMC4293347.
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research*, 264(1), 29–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.2000.5130>
- Smith, S. L., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2021). Approaches to Investigating the Protein Interactome of PTEN. *Journal of Proteome Research*, 20(1), 60–77. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00570>
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3330>
- Spinelli, L., Lindsay, Y. E., & Leslie, N. R. (2015). PTEN inhibitors: An evaluation of current compounds. *Advances in Biological Regulation*, 57, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.012>
- Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A., & Sucher, N. J. (1997). (S) NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*, 18(5), 691–696.
- Sury, M. D., Vorlet-Fawer, L., Agarinis, C., Yousefi, S., Grandgirard, D., Leib, S. L., & Christen, S. (2011). Restoration of Akt activity by the bisperoxovanadium compound bpV (pic) attenuates

- hippocampal apoptosis in experimental neonatal pneumococcal meningitis. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 201–208.
- Swayze, E. E., Siwkowski, A. M., Wancewicz, E. V, Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Hung, G., Monia, B. P., & Bennett, and C. F. (2007). Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 687–700.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794–798.
- Tanaka, M., & Grossman, H. B. (2003). In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin. *Gene Therapy*, 10(19), 1636–1642.
- Tanaka, Motoyoshi, Koul, D., Davies, M. A., Liebert, M., Steck, P. A., & Grossman, H. B. (2000). MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene*, 19(47), 5406–5412.
- Terrien, E., Chaffotte, A., Lafage, M., Khan, Z., Prehaud, C., Cordier, F., Simenel, C., Delepierre, M., Buc, H., & Lafon, M. (2012). Interference with the PTEN-MAST2 interaction by a viral protein leads to cellular relocation of PTEN. *Science Signaling*, 5(237), ra58–ra58.
- Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., & Zhao, J. J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews. Cancer*, 15(1), 7–24.
- Walker, C. L., Wang, X., Bullis, C., Liu, N.-K., Lu, Q., Fry, C., Deng, L., & Xu, X.-M. (2015). Biphasic bisperoxovanadium administration and Schwann cell transplantation for repair after cervical contusive spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 264, 163–172.
- Wang, D., Yang, H., Gu, J., Cao, Y., Meng, X., Wang, X., Lin, Y., & Gao, M. (2015). Suppression of phosphatase and tensin homolog protects insulin-resistant cells from apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2695–2700.
- Wang, X., Huang, H., & Young, K. H. (2015). The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging*, 7(12), 1032–1049. <https://doi.org/10.18632/aging.100855>
- Wang, Y.-L., Li, F., & Chen, X. (2015). Pten inhibitor-bpV ameliorates early postnatal propofol exposure-induced memory deficit and impairment of hippocampal LTP. *Neurochemical Research*, 40(8), 1593–1599.
- Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021 Jan-

Dec;30:963689721999617. doi: 10.1177/0963689721999617.

Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2014). Pten. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 641–669. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082411-113907>

Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2014 Jul 12;2(2):111-20. PMID: 25374912; PMCID: PMC4219300.

Xiao, Y., Yeong Chit Chia, J., Gajewski, J. E., Sio Seng Lio, D., Mulhern, T. D., Zhu, H.-J., Nandurkar, H., & Cheng, H.-C. (2007). PTEN catalysis of phospholipid dephosphorylation reaction follows a two-step mechanism in which the conserved aspartate-92 does not function as the general acid — Mechanistic analysis of a familial Cowden disease-associated PTEN mutation. *Cellular Signalling*, 19(7), 1434–1445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.01.021>

Yu M, Chen J, Xu Z, Yang B, He Q, Luo P, Yan H, Yang X. Development and safety of PI3K inhibitors in cancer. *Arch Toxicol*. 2023 Mar;97(3):635-650. doi: 10.1007/s00204-023-03440-4. Epub 2023 Feb 11. PMID: 36773078; PMCID: PMC9968701.

Zhang M, Jang H, Nussinov R. PI3K inhibitors: review and new strategies. *Chem Sci*. 2020 May 19;11(23):5855-5865. doi: 10.1039/d0sc01676d. PMID: 32953006; PMCID: PMC7472334.

Zhang, Y., Han, S.-J., Park, I., Kim, I., Chay, K.-O., Kim, S. M., Jang, D. Il, Lee, T.-H., & Lee, S.-R. (2017). Redox regulation of the tumor suppressor PTEN by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 982.

Zhang, Y., Park, J., Han, S. J., Yang, S. Y., Yoon, H. J., Park, I., Woo, H. A., & Lee, S. R. (2020). Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. *Redox Biology*, 34(January), 101553. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101553>

Zhou X, Yang X, Sun X, Xu X, Li X, Guo Y, Wang J, Li X, Yao L, Wang H, Shen L. Effect of PTEN loss on metabolic reprogramming in prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2019 Mar;17(3):2856-2866. doi: 10.3892/ol.2019.9932. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30854061; PMCID: PMC6386093.

Zhu, Y., Hoell, P., Ahlemeyer, B., & Kriegelstein, J. (2006). PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis. *Apoptosis*, 11(2), 197–207.

