

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανάπτυξη in vitro μεθοδολογίας μέτρησης δραστικότητας κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3KCA) και σάρωση μορίων για την εύρεση ειδικών αναστολέων των ογκογόνων της μορφών.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΠΑΠΑΦΩΤΙΚΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

© 2026 Alexandra Papafotika
Το παρόν έργο διατίθεται με άδεια Creative Commons Αναφορά Δημιουργού – Μη Εμπορική Χρήση – Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές (CC BY-NC-ND 4.0).
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.el

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαφωτίκα Αλεξάνδρας: 05-09-2012

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 744α/23-10-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:
Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μέλη:
Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy, Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας ΙΤΕ, Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών,

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-11-2012
Ανάπτυξη *in vitro* μεθοδολογίας μέτρησης δραστικότητας κινάσης της φωσφατιδυλϊνοσιτόλης (*PI3KCA*) και σάρωση μορίων για την εύρεση ειδικών αναστολέων των ογκογόνων της μορφών.

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1240α/29-09-2026
1.Χριστοφορίδης Σάββας, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2.Φώτσης Θεόδωρος, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3.Carol Murphy, Ερευνήτρια Α' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών (ΙΒΕ) - Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ)
4.Παπαμαρκάκη Θωμαΐς, τ. Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5.Λεονταρίτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6.Μπέης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7.Γεωργιάδου Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό **«ΑΡΙΣΤΑ»** στις **16-11-2026**

Ιωάννινα 20-11-2026
ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Σπυρίδων Κονιτσιώτης
Καθηγητής Νευρολογίας

ΙΑΤΡΙΚΗ · ΣΧΟΛΗ · ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ 1977

Η Γραμματέας του Τμήματος
Μαρία Καπιτοπούλου

Από τη διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. Exploring a Non-ATP Pocket for Potential Allosteric Modulation of PI3Kα.
Gkeka P, **Papafotika A**, Christoforidis S, Cournia Z.
J Phys Chem B. 2015 Jan 22;119(3):1002-16.

2. Discovery of New Aminosubstituted Pyrrolopyrimidines with Antiproliferative Activity Against Breast Cancer Cells and Investigation of their Effect Towards the PI3Kα Enzyme
Daniilides K, Lougiakis N, Evangelidis T, Kostakis IK, Pouli N, Marakos P, Mikros E, Skaltsounis AL, Bach S, Baratte B, Ruchaud S, Karamani V, **Papafotika A**, Christoforidis S, Argyros O, Kouvari E, Tamvakopoulos C.
Anticancer Agents Med Chem. 2016 Dec 7, [Epub ahead of print]

3. Design and synthesis of novel 7-aminosubstituted pyrido[2,3-b]pyrazines exhibiting anti-breast cancer activity.
Argyros O, Lougiakis N, Kouvari E, **Papafotika A**, Raptopoulou CP, Psycharis V, Christoforidis S, Pouli N, Marakos P, Tamvakopoulos C.
Eur J Med Chem. 2017 Jan 27;126:954-968.

4. The orchestrated signaling by PI3Ka and PTEN at the membrane interface.
Kotzampasi D, Premeti K, **Papafotika A**, Syropoulou V, Christoforidis S, Cournia Z, Leondaritis G
Comput Struct Biotechnol J. 2022 Oct 7:20:5607-5621

5. A new functional assay reveals that membrane binding is critical for overactivation of the phosphoinositide 3-kinase H1047R mutant.
Papafotika A, Pavlaki M, Lazani V, Karamani V, Aggelidis D, Kapella A, Kotzampasi D, Agianian B, Efstratiadis A, Cournia Z, and Christoforidis S
J Biol Chem. 2026 Mar;302(3):111207

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (ΙΒΕ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη.

Η εκπόνηση της διατριβής χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΡΟΜ, με τίτλο «Ογκογόνες Μεταλλάξεις της 3-Κινάσης της Φωσφατιδυλϊνισιτόλης σε Καρκίνους του Μαστού και του Παχέος Εντέρου: Ανάπτυξη Στοχευμένων Αντικαρκινικών Φαρμάκων και Διαγνωστικών Δεικτών», στο πλαίσιο της Δράσης Εθνικής Εμβέλειας «Συνεργασία» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) 2007–2013, καθώς και από το πρόγραμμα MEM-DRUG, με τίτλο «Στοχεύοντας στη διεπιφάνεια πρωτεΐνης-μεμβράνης: μία καινοτόμος προσέγγιση στον σχεδιασμό φαρμάκων», στο πλαίσιο της 1ης Προκήρυξης Ερευνητικών Έργων ΕΛΙΔΕΚ για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και των ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού.

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη, για την εξαιρετική συνεργασία που έχουμε όλα αυτά τα χρόνια. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε και εξακολουθεί να μου δείχνει, η καθοδήγησή του, οι ιδέες του, οι ατελείωτες συζητήσεις μας, επιστημονικές και μη, καθώς και η έμπνευση που μου προσφέρει, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τον Ομότιμο Καθηγητή Θεόδωρο Φώτση και την Ερευνήτρια Α΄ του ΙΒΕ/ΙΤΕ Carol Murphy, για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθ’ όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, καθώς και για την εποικοδομητική επικοινωνία και συνεργασία μας. Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Γιώργο Λεονταρίτη, τον Καθηγητή Δημήτρη Μπέη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Γεωργιάδου, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής και για την εκτίμηση που μου δείχνουν. Ένα ξεχωριστό και ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη, η οποία πριν από 27 χρόνια ήταν η πρώτη που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω και να αγαπήσω τον κόσμο της βιολογίας και της βιοχημείας.

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου, πρώην και νυν, για τη συνεργασία και τις υπέροχες στιγμές που μοιραστήκαμε και εξακολουθούμε να μοιραζόμαστε. Τη Βάλια, τη Βασιλική, τον Δημήτρη Α., τη Σοφία, τον Δημήτρη Μπ., την Ευαγγελία και τη Δέσποινα. Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω την Εύη για τις πολύτιμες συμβουλές της, αλλά και για τις αγωνίες που μοιραζόμαστε καθημερινά στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης τον Παναγιώτη, τη Μάρθα και την Έλενα για την βοήθεια που προσφέρουν με μεγάλη προθυμία και τη συμβολή τους στη δημιουργία μιας ευχάριστης και δημιουργικής καθημερινότητας στο εργαστήριο καθώς και όλες τις ερευνητικές ομάδες, τα μέλη του Ινστιτούτου και το διοικητικό προσωπικό για το όμορφο κλίμα συνεργασίας που υπάρχει.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους εξωτερικούς συνεργάτες, τον Παύλο

Αγανιάν και τη Μαρία Παυλάκη από το Δημοκρήτειο Πανεπιστήμιο για τα πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) καθώς και τη Ζωή Κούρνια και τον Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο, Ερευνητές Α΄ στο ΙΙΒΕΑΑ, για τις ενώσεις που μου διέθεσαν προς αξιολόγηση στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την αγάπη μου στον σύζυγό μου Γαβριήλ, σύντροφο και συνοδοιπόρο μου, που με στηρίζει πάντα σε ό,τι κάνω, αλλά και στα δύο υπέροχα παιδιά μου Φαίδωνα και Ιφιγένεια, που μεγάλωσαν παράλληλα με αυτή τη διατριβή και που κάνουν τη ζωή μου όμορφη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3Kα) αποτελεί βασικό συστατικό του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT, το οποίο ρυθμίζει θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και ο μεταβολισμός. Η απορρύθμιση της PI3Kα, συχνά μέσω ογκογόνων μεταλλαγών του γονιδίου *PIK3CA*, συνδέεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου. Μεταξύ των συχνότερων μεταλλαγών συγκαταλέγονται οι H1047R και E545K, οι οποίες ενισχύουν την ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα μέσω διαφορετικών μοριακών μηχανισμών, που δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας νέας μεθόδου προσδιορισμού της δραστικότητας της PI3Kα, η διερεύνηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην αυξημένη δραστικότητα των δύο μεταλλαγμένων μορφών και η αναζήτηση υποψήφιων αναστολέων έναντι της PI3Kα H1047R.

Αρχικά, αναπτύχθηκε μια νέα, χωρίς κύτταρα (*cell-free*), *in vitro* δοκιμασία ενζυμικής δραστικότητας, βασισμένη στην ανταγωνιστική δέσμευση του προϊόντος της αντίδρασης, PIP_3, από την περιοχή PH της πρωτεΐνης GRP1. Η μέθοδος ακολουθεί αρχή τύπου ELISA και βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση του υποστρώματος PIP_2 ενσωματωμένου σε ανασυσταθέντα λιποσώματα, ώστε να προσομοιάζει καλύτερα το φυσιολογικό μεμβρανικό περιβάλλον. Επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του παραγόμενου PIP_3, με κατώτερο όριο ανίχνευσης 1 ng και ικανοποιητική ενδο- και διαπειραματική επαναληψιμότητα. Η αξιοπιστία της αξιολογήθηκε μέσω της μελέτης βασικών ενζυμικών χαρακτηριστικών, της επιβεβαίωσης της ανασταλτικής δράσης καθιερωμένων αναστολέων και της απόκρισης της PI3Kα σε φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που προσομοιώνει την ενεργοποίησή της μέσω του υποδοχέα του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR).

Η συγκριτική μελέτη της φυσικού τύπου (WT) PI3Kα και των μεταλλαγμένων μορφών E545K και H1047R ανέδειξε διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστικότητάς τους. Η E545K παρουσίασε αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τη WT, ανεξάρτητα από τη μορφή του υποστρώματος PIP_2, είτε αυτό ήταν ενσωματωμένο σε λιποσώματα είτε σε υδατοδιαλυτή μορφή. Το εύρημα αυτό συνάδει με τον προτεινόμενο μηχανισμό δράσης της μεταλλαγής, η οποία επηρεάζει την αλληλεπίδραση της καταλυτικής υπομονάδας p110α με την ανασταλτική ρυθμιστική υπομονάδα p85α. Αντίθετα, η H1047R εμφάνισε αυξημένη δραστικότητα έναντι της WT μόνο παρουσία PIP_2 ενσωματωμένου σε λιποσώματα (ℓPIP_2), υποδεικνύοντας ότι η υπερενεργοποίησή της εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το μεμβρανικό περιβάλλον. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίχθηκαν από πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR), τα οποία έδειξαν υψηλότερο ρυθμό σύνδεσης της H1047R-PI3Kα με τη μεμβράνη σε σύγκριση με τη

WT. Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ενισχυμένη δραστικότητα της H1047R συνδέεται στενά με το μεμβρανικό περιβάλλον και την παρουσία του λιπιδικού υποστρώματος σε οργανωμένη μορφή.

Τέλος, η δοκιμασία αξιοποιήθηκε για την αξιολόγηση 168 ενώσεων ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της PI3Kα H1047R, οι οποίες προέκυψαν από διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως ο *de novo* σχεδιασμός, ο εικονικός έλεγχος και η διερεύνηση βιβλιοθηκών φυσικών προϊόντων. Η ένωση PI3K-0010, με τη μορφή άλατος 1:1, αναδείχθηκε ως το πιο υποσχόμενο μόριο-οδηγός, καθώς παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της μεταλλαγμένης PI3Kα H1047R σε σύγκριση με τη φυσικού τύπου (WT) μορφή. Η μικρή επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης ATP στην IC_{50} της ένωσης, σε συνδυασμό με τον σχεδιασμό της που αποσκοπούσε στη στόχευση περιοχής εκτός της θέσης πρόσδεσης του ATP, υποδηλώνει έναν πιθανό αλλοστερικό ή γενικότερα μη αμιγώς ATP-ανταγωνιστικό μηχανισμό δράσης. Ενδιαφέρον παρουσίασαν επίσης οι ανάλογες ενώσεις PI3K-0021 και PI3K-0024, οι οποίες εμφάνισαν διαφορετικά χαρακτηριστικά ανασταλτικής ισχύος και εκλεκτικότητας. Συγκεκριμένα, η PI3K-0024 ανέστειλε την ενζυμική δραστικότητα σε νανομοριακές συγκεντρώσεις, χωρίς όμως να εμφανίζει εκλεκτικότητα υπέρ της H1047R, ενώ η PI3K-0021 ξεχώρισε λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς του έναντι της μεταλλαγμένης μορφής PI3Kα H1047R.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή παρουσιάζει μια ευαίσθητη και επαναλήψιμη μέθοδο προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα και αναδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο του λιπιδικού περιβάλλοντος στην ενεργοποίηση της ογκογόνου μεταλλαγής H1047R. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναζήτηση και αξιολόγηση νέων υποψήφιων αναστολέων της PI3Kα, με ιδιαίτερη έμφαση στην εκλεκτική αναστολή των ογκογόνων μεταλλαγμένων μορφών της.

SUMMARY

Phosphatidylinositol 3-kinase alpha (PI3Kα) is a key component of the PI3K/AKT signaling pathway, which regulates fundamental cellular processes, including proliferation, survival, and metabolism. Dysregulation of PI3Kα, often resulting from oncogenic mutations in the *PIK3CA* gene, is associated with the development and progression of many types of cancer. Among the most frequent mutations are H1047R and E545K, which enhance PI3Kα enzymatic activity through distinct molecular mechanisms that have not yet been fully elucidated. The aim of this thesis was to develop and optimize a novel method for measuring PI3Kα activity, investigate the mechanisms contributing to the increased activity of these two mutant forms, and identify candidate inhibitors targeting PI3Kα H1047R.

First, a novel cell-free *in vitro* enzymatic activity assay was developed, based on the competitive binding of the reaction product, PIP_3, by the pleckstrin homology (PH) domain of the GRP1 protein. The method follows an ELISA-based principle and was optimized using PIP_2 incorporated into reconstituted liposomes to better mimic the physiological membrane environment. It enables the quantitative determination of PIP_3 production, with a lower limit of detection of 1 ng and satisfactory intra- and inter-assay reproducibility. The reliability of the assay was evaluated by assessing typical enzymatic features, confirming the IC_{50} of well-known inhibitors and assessing the response of PI3Kα to a phosphorylated peptide derived from the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), which mimics receptor-mediated activation.

A comparative analysis of wild-type (WT) PI3Kα and the E545K and H1047R mutant forms revealed distinct features in the regulation of their enzymatic activity. E545K exhibited increased activity compared to WT, irrespective of the form of the PIP_2 substrate, whether incorporated into liposomes or present in a water-soluble form. This finding is consistent with the proposed mechanism of the mutation, which affects the interaction between the catalytic subunit p110α and the inhibitory regulatory subunit p85α. In contrast, H1047R exhibited increased activity relative to WT only in the presence of liposome-incorporated PIP_2 (ℓPIP_2), suggesting that its hyperactivation depends substantially on the membrane environment. These findings were further supported by surface plasmon resonance (SPR) experiments, which demonstrated a higher rate of association of H1047R PI3Kα with the membrane compared with WT. Overall, the results suggest that the enhanced activity of H1047R is closely associated with the membrane environment and the presence of the lipid substrate in an organized form.

Finally, the assay was used to evaluate 168 compounds for their inhibitory activity against PI3Kα H1047R. These compounds had been obtained through different approaches, including *de novo* design, virtual screening, and the investigation of natural product libraries. The compound PI3K-0010, in its 1:1 salt

form, emerged as the most promising lead, exhibiting stronger inhibitory activity against mutant PI3Kα H1047R than the WT form. The limited effect of increased ATP concentrations on the compound's IC_{50}, together with its design to target a region outside the ATP-binding site, suggests a potential allosteric or, more generally, non-purely ATP-competitive mechanism of action. The related compounds PI3K-0021 and PI3K-0024 also showed interesting but distinct inhibitory potency and selectivity profiles. Specifically, PI3K-0024 inhibited enzymatic activity at nanomolar concentrations but did not exhibit selectivity for H1047R, whereas PI3K-0021 stood out for its high selectivity toward the mutant PI3Kα H1047R form.

In conclusion, this thesis presents a sensitive and reproducible method for measuring PI3Kα enzymatic activity and highlights the critical role of the lipid environment in the enhanced activity of the oncogenic H1047R mutant. The assay provides a useful tool for identifying and evaluating novel PI3Kα inhibitor candidates, with particular emphasis on the selective inhibition of oncogenic mutant forms.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 1

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 3

SUMMARY 5

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ 7

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 9

1.1 Η κλάση I των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 10

1.2 Η κλάση II των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 14

1.3 Η κλάση III των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 15

1.4 Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT και η απορρύθμιση του στην καρκινογένεση 16

1.5 Δομή της PI3Kα και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της καταλυτικής και ρυθμιστικής υπομονάδας 19

1.6 Οι ενεργοποιητικές μεταλλαγές της PI3Kα 22

1.7 Η μεταλλαγή E545K στην ελικοειδή περιοχή της PI3Kα 24

1.8 Η μεταλλαγή H1047R στην καταλυτική (kinase) περιοχή της PI3Kα 25

1.9 Στοχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR στον καρκίνο. Ανάπτυξη αναστολέων έναντι των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 26

1.10 Οι μέθοδοι μέτρησης της δραστικότητας της PI3Kα 29

2. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής 31

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 32

3.1 Υλικά 32

3.2 Μέθοδοι 32

3.2.1 Έκφραση και καθαρισμός της GST-GRP1 32
3.2.2 Παρασκευή λιποσωμάτων 34

3.2.3 Το πρωτόκολλο της μεθόδου μέτρησης της δραστικότητας της PI3K 35

3.2.4 Πειράματα Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) 36

3.2.5 Στατιστική ανάλυση 37

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 38

4.1 Αρχή της νέας μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής δραστικότητας 38

4.2 Βελτιστοποίηση τηςδοκιμασίας προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα 40

4.3 Επαλήθευση της εξειδίκευσης της μεθόδου 47

4.4 Ο ρόλος της μεμβράνης στην υπερενεργοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της PI3Kα 50

4.5 Η μεταλλαγή H1047R αυξάνει τον ρυθμό πρόσδεσης της PI3Kα στη μεμβράνη σύμφωνα με πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) 51

4.6 Αξιολόγηση μορίων για την ανακάλυψη επιλεκτικών αναστολέων της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της κινάσης PI3Kα 55

4.6.1 De novo σχεδιασμός και επιλογή υποψήφιων αναστολέων της PI3Kα μέσω εικονικής αξιολόγησης και δομικής ανάλυσης 56

4.6.2 Πειραματική αξιολόγηση βιβλιοθήκης φυσικών προϊόντων 56

4.6.3 Προκλήσεις και στρατηγικές για αξιόπιστη εκτίμηση της δράσης των πιθανών αναστολέων της PI3Kα 57

4.6.4 Πειραματική αξιολόγηση της εκλεκτικότητας των υποψηφίων αναστολέων της PI3Kα (H1047R) 60

4.6.5 Διερεύνηση του μηχανισμού αναστολής της PI3Kα H1047R από το μόριο PI3K-0010 (άλας 1:1) 71

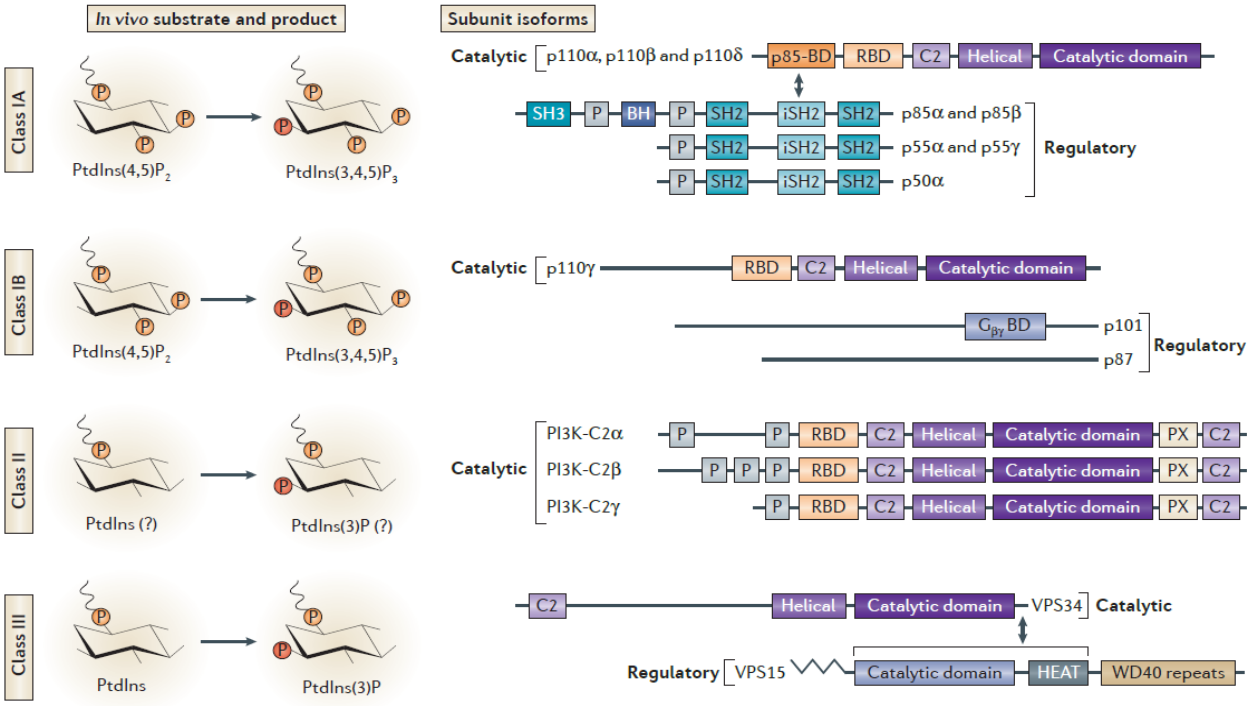
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 76

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 82

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3Ks) αποτελούν μια ξεχωριστή και εξελικτικά διατηρημένη οικογένεια ενδοκυττάριων λιπιδικών κινασών, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε πολλές πτυχές της κυτταρικής βιολογίας, ενώ παράλληλα συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και η γήρανση (1). Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούνται μέσω ποικίλων υποδοχέων, αυξητικών παραγόντων και άλλων εξωκυττάριων σημάτων, με αποτέλεσμα να στρατολογούνται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνουν την 3'-υδροξυλομάδα του δακτυλίου ινοσιτόλης φωσφοινοσιτιδίων (phosphoinositides, PtdIns). Ως αποτέλεσμα της δράσης αυτής, ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η επιβίωση, ο μεταβολισμός και η ενδοκυττάρια διακίνηση μεμβρανών(2,3).

Οι PI3Ks κατατάσσονται σε τρεις κλάσεις (I, II και III) ανάλογα με τα δομικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και τον μηχανισμό ενεργοποίησής τους (Εικόνα 1.1)(2,4).

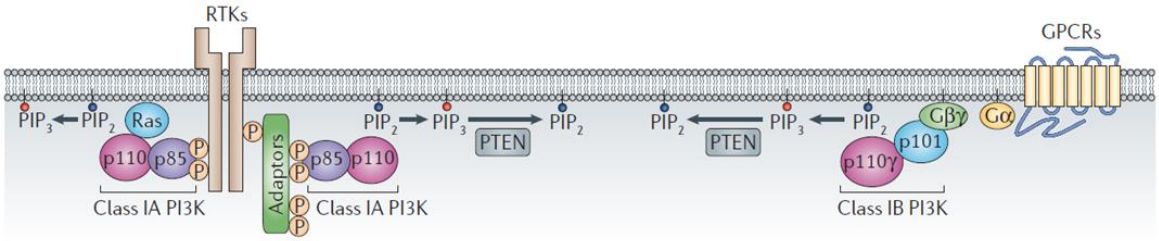


Εικόνα 1.1: Ταξινόμηση των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3Ks). *Οι PI3Ks χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με βάση την in vivo εξειδίκευση των υποστρωμάτων τους και τα δομικά χαρακτηριστικά τους.* ***Class IA:*** *Καταλύει τη μετατροπή του PtdIns(4,5)P_2 σε PtdIns(3,4,5)P_3, με καταλυτικές υπομονάδες (p110α, p110β, p110δ) και ρυθμιστικές υπομονάδες (p85α, p85β, p55α, p55γ, p50α).* ***Class IB:*** *Μετατρέπει το PtdIns(4,5)P_2 σε PtdIns(3,4,5)P_3, με μοναδική καταλυτική υπομονάδα (p110γ) και ρυθμιστικές υπομονάδες (p101, p87).* ***Class II****: Χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το PtdIns και το μετατρέπει πιθανόν σε*

PtdIns(3)P, με τρεις διαφορετικές ισομορφές καταλυτικών υπομονάδων (PI3K-C2α, PI3K-C2β, PI3K-C2γ). ***Class III****: Μετατρέπει το PtdIns σε PtdIns(3)P, με καταλυτική υπομονάδα VPS34 και ρυθμιστική υπομονάδα VPS1. Αναπαραγωγή από* Thorpe et al. (5)

1.1 Η κλάση Ι των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

Οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης της κλάσης Ι είναι ετεροδιμερή ένζυμα, αποτελούμενα από μία καταλυτική και μία ρυθμιστική υπομονάδα. Χωρίζονται περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες, ΙΑ και ΙΒ, με βάση τις διαφορές στις ρυθμιστικές υπομονάδες και στον τύπο του υποδοχέα που οδηγεί στην ενεργοποίησή τους (3). Οι κινάσες της κλάσης ΙΑ ενεργοποιούνται από υποδοχείς κινασών τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs), ενώ οι κινάσες της κλάσης ΙΒ ενεργοποιούνται από υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες (GPCRs) (Εικόνα 1.2)(2,3).



Εικόνα 1.2: Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των PI3Ks της κλάσης Ι. *Οι δύο υποκατηγορίες των PI3Ks κλάσης Ι ενεργοποιούνται μέσω διαφορετικών τύπων υποδοχέων: οι PI3Ks της κλάσης ΙΑ ενεργοποιούνται από υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) ή φωσφορυλιωμένους προσαρμογείς, ενώ οι PI3Ks της κλάσης ΙΒ ενεργοποιούνται από GPCRs μέσω των υπομονάδων Gβγ. Και οι δύο τύποι καταλύουν τη μετατροπή του PIP_2 σε PIP_3, προάγοντας ενδοκυττάριες σηματοδοτικές οδούς. Αναπαραγωγή από* Engelman et al. (2)

Παρότι *in vitro* διάφορα φωσφοϊνοσιτίδια όπως η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), η φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP) και η διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP_2) μπορούν να θεωρηθούν ως υποστρώματα των κινασών της κλάσης Ι, *in vivo* το κύριο υπόστρωμά τους είναι το PIP_2, το οποίο φωσφορυλιώνουν με με αποτέλεσμα την παραγωγή τριφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP_3) (Εικόνα 1.1) (5). Το φωσφολιπίδιο PIP_3 λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος (second messenger) και αποτελεί βασικό ρυθμιστή πολλαπλών κυτταρικών διεργασιών ενεργοποιώντας καθοδικά ένα μεγάλο αριθμό μορίων. Πρωτεΐνες με PH (Pleckstrin Homology) δομικές περιοχές συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη στα σημεία ενεργοποίησης της PI3K, όπου και συνδέονται άμεσα με το παραγόμενο PIP_3 (6). Από τους πιο βασικούς τελεστές του PIP_3 είναι οι πρωτεΐνες AKT (Serine-Threonine Kinase), γνωστές και ως PKB (protein kinase B), καθώς και η PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1). Τόσο η AKT όσο και η

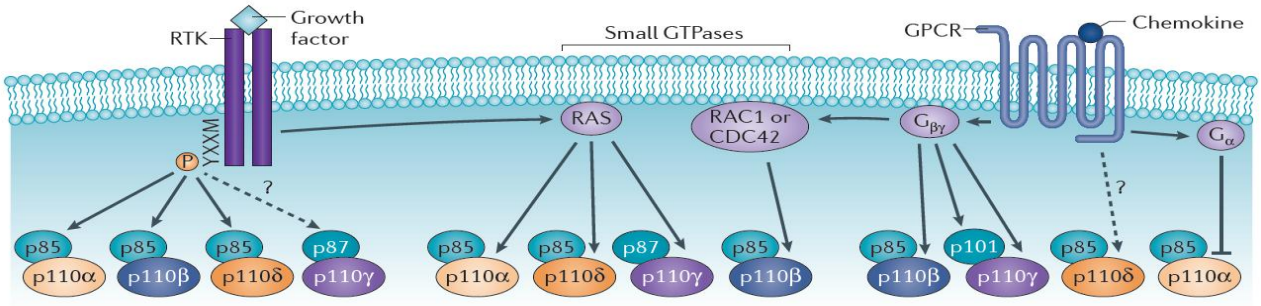
PDK1 συνδέονται με το PIP_3 μέσω των PH περιοχών τους, κι έτσι στρατολογούνται στη πλασματική μεμβράνη. Η εγγύτητά τους στη μεμβράνη διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της AKT από την PDK1 στη θέση θρεονίνη 308 (T308) (6). Αυτό οδηγεί στη σταθεροποίηση της AKT σε μια ενεργή διαμόρφωση ώστε να μπορέσει να φωσφορυλιωθεί και στη θέση σερίνη 473 (S473) από το mTORC2 αποκτώντας έτσι την πλήρη ενεργή της μορφή (Εικόνα 1.4) (7). Άλλες πρωτεΐνες οι οποίες έχουν PH δομικές περιοχές και ενεργοποιούνται από το PIP_3 είναι οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) κάποιων μελών των Rac, Ras και ARF (ADP-ribosylation factor) οικογενειών. Πιστεύεται μάλιστα ότι η ενεργοποίηση αυτών των μικρών GTPασών εξαρτάται από τις διαφορετικές ισομορφές των καταλυτικών υπομονάδων των PI3K σε αντίθεση με την ενεργοποίηση της AKT που έχει έναν περισσότερο καθολικό χαρακτήρα (4).

Οι PI3Ks της κλάσης IA (Εικόνα 1.1) περιλαμβάνουν τρεις καταλυτικές ισομορφές της p110, τις p110α, p110β και p110δ οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PIK3CA*, *PIK3CB* και *PIK3CD,* αντίστοιχα. Τρία γονίδια κωδικοποιούν επίσης και τις πέντε ρυθμιστικές υπομονάδες της κλάσης IA. Το γονίδιο *PIK3R1* κωδικοποιεί την p85α και τις δύο μικρότερες ισομορφές p55α και p50α, ενώ τα γονίδια *PIK3R2* και *PIK3R3* κωδικοποιούν τις p85β και p55γ αντίστοιχα (2,3). Συνηθίζεται οι ρυθμιστικές υπομονάδες να αναφέρονται συλλογικά ως p85. Η p110 καταλυτική υπομονάδα αποτελείται από πέντε αυτοτελείς δομικές και λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 1.1). Μία αμινοτελική περιοχή (Adaptor Binding Domain – ABD), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της p110 με την p85 υπομονάδα, μία περιοχή σύνδεσης με Ras πρωτεΐνες (Ras Binding Domain – RBD), μία περιοχή ονομαζόμενη C2 για την οποία έχει προταθεί ότι συμμετέχει στη σύνδεση με τη μεμβράνη, μία ελικοειδής περιοχή (Helical domain), η οποία αλληλεπιδρά με τη ρυθμιστική υπομονάδα και τέλος την καταλυτική δομική περιοχή της πρωτεΐνης (kinase domain) στο καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας, η οποία περιέχει λειτουργικά σημαντικές περιοχές, όπως τις θέσεις πρόσδεσης του PIP_2 και του ATP (3,8). Όλες οι ισομορφές της p85 ρυθμιστικής υπομονάδας έχουν μία κοινή κεντρική δομή που περιλαμβάνει δύο SH2 περιοχές (μία αμινοτελική nSH2 και μία καρβοξυτελική cSH2) μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται μία inter-SH2 (iSH2) περιοχή, η οποία και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με την p110. Οι δύο μεγαλύτερες ισομορφές p85α και p85β περιλαμβάνουν επιπλέον μία SH3 και μία BH περιοχή στο αμινοτελικό τους άκρο (Εικόνα 1.1) (5,8).

Η ρυθμιστική υπομονάδα p85 είναι εκείνη που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ενεργοποίηση των κινασών της κλάσης IA, μέσω της σύνδεσής της με την πλασματική μεμβράνη. Οι περιοχές nSH2 και cSH2 της p85 προσδένονται σε φωσφορυλιωμένα μοτίβα YXXM ενεργοποιημένων υποδοχέων κινασών τυροσίνης ή άλλων φωσφορυλιωμένων προσαρμογέων (Adaptors), με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση του ετεροδιμερούς p85/p110 στην πλασματική μεμβράνη, όπου η καταλυτική υπομονάδα p110 φωσφορυλιώνει το PIP_2 προς PIP_3 (Εικόνα 1.2) (2,3).

Ουσιαστικά, οι ρυθμιστικές υπομονάδες των κινασών της κλάσης ΙΑ έχουν τριπλό ρόλο. Σταθεροποιούν την p110 καταλυτική υπομονάδα, αναστέλουν την ενζυμική ενεργότητα της κινάσης στην αδρανή της κατάσταση και τέλος στρατολογούν την κινάση στην μεμβράνη και την ενεργοποιούν διευκολύνοντας την επαφή της με τα λιπιδιακά υποστρώματα (4). Η σύνδεση της ρυθμιστικής υπομονάδας με τη κυτταρική μεμβράνη δεν ακυρώνει τον δεσμό μεταξύ p110 και p85. Οι PI3K διατηρούν τη μορφή τους ως ετεροδιμερή σύμπλοκα αμόμα και μετά τη σύνδεση της ρυθμιστικής τους υπομονάδας με τους φωσφορυλιωμένους υποδοχείς.

Η σύνδεση της ρυθμιστικής υπομονάδας με την κυτταρική μεμβράνη μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση (Εικόνα 1.2) (2). Στην περίπτωση υποδοχέων κινασών τυροσίνης, όπως ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) ή ο υποδοχέας αιμοπεταλικού αυξητικού παράγοντα (Platelet Derived Growth Factor Receptor, PDGFR), η p85 συνδέεται απευθείας με τον υποδοχέα. Αντίθετα, στην περίπτωση της ινσουλίνης, ή του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1), η σύνδεση είναι έμμεση μέσω άλλων μορίων προσαρμογέων (Adaptors), όπως το υπόστρωμα του υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate, IRS) (2). Αλληλεπίδραση των κινασών με την πλασματική μεμβράνη γίνεται επίσης και μέσω της RBD (Ras Binding Domain) των καταλυτικών υπομονάδων, με απευθείας σύνδεση τους με μικρές GTPases. Οι ισομορφές p110α και p110δ αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες Ras ενώ η p110β με τις πρωτεΐνες RAC1 και CDC42 της οικογένειας Rho (Εικόνα 1.3) (3,5). Η p110β ισομορφή μπορεί επίσης να συνδεθεί άμεσα και σε Gβγ υπομονάδες ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών, ενσωματώνοντας έτσι σήματα τόσο από RTKs όσο και από GPCRs. Η ισομορφή p110δ πιστεύεται ότι μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί καθοδικά των GPCRs χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι πρωτεΐνες Gα μπορούν να συνδεθούν με την ισομορφή p110α αναστέλλοντας την (Εικόνα 1.3) (5).



Εικόνα 1.3: Διαφορετικοί ρόλοι των καταλυτικών ισομορφών των PI3K κλάσης I σε διαφορετικά πλαίσια κυτταρικής σηματοδότησης*. Οι PI3Ks της κλάσης I ενεργοποιούνται καθοδικά από RTKs, GPCRs και μικρές GTPασες. Οι υπομονάδες p85 προσδένονται σε φωσφοτυροσίνες τύπου YXXM σε RTKs, ενεργοποιώντας τις p110α, p110β και p110δ. Το σύμπλοκο p87–p110γ ενδέχεται επίσης να ενεργοποιείται από RTKs. Οι μικρές GTPάσες της*

οικογένειας RAS (για τις p110α, p110δ, p110γ) και RHO (RAC1, CDC42 για την p110β) ενισχύουν τη σηματοδότηση μέσω σύνδεσης με RAS-binding domains των κινασών. Καθοδικά των GPCRs, οι Gβγ υπομονάδες ενεργοποιούν τις p110β, p110γ και τη ρυθμιστική p101, ενώ η ενεργοποίηση της p110δ είναι πιθανή αλλά όχι πλήρως διευκρινισμένη. Επιπλέον, οι Gα υπομονάδες μπορούν να αναστείλουν την p110α. Αναπαραγωγή από Thorpe et al.(5)

Η PI3Kγ, το μοναδικό μέλος της κλάσης IB, είναι επίσης ετεροδιμερές ένζυμο και αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα p110γ (κωδικοποιούμενη από το *PIK3CG*), η οποία έχει μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες υπομονάδες της κλάσης IA, και τους προσαρμογείς p101 και p84/p87PIKAP (κωδικοποιούμενοι από τα *PIK3R5* και *PIK3R6* αντίστοιχα) οι οποίοι αντίθετα διαφέρουν κατά πολύ από τη p85 (Εικόνα 1.1). Σε αυτή τη διαφοροποίηση των μη καταλυτικών υπομονάδων των κλάσεων IA και IB έγκειται και η διαφορά στην ενεργοποίηση τους. Η PI3Kγ ενεργοποιείται κυρίως καθοδικά των GPCRs, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με Gβγ υπομονάδες - έχει αποδειχθεί ότι η p101 διαθέτει καρβοξυτελική περιοχή σύνδεσης με Gβγ υπομονάδες (1,9). Αν και η επικρατούσα άποψη είναι ότι δεν ενεργοποιείται μέσω RTKs, έχει προταθεί εναλλακτικά ότι ενεργοποίηση μπορεί να γίνει μέσω της p87 και Ras ή ακόμα και μέσω TLR/IL1Rs (10). Η λειτουργία των προσαρμογέων της κλάσης IB δεν είναι πλήρως κατανοητή. Πιθανολογείται ότι συμβάλλουν στη στρατολόγηση της p110γ στην πλασματική μεμβράνη και στη διαμεσολάβηση της αλληλεπίδρασής της με G-πρωτεΐνες. Η σύνδεση χημειοκινών με GPCRs προκαλεί την αποδέσμευση των Gβγ υπομονάδων, οι οποίες συνδέονται τόσο με την p110γ όσο και με τους προσαρμογείς της. (Εικόνα 1.3) (5).

Οι τέσσερις καταλυτικές ισομορφές των PI3Ks της κλάσης I, όπως έχει αναφερθεί, έχουν μια κοινή διατηρημένη δομή, έχουν τα ίδια λιπιδιακά υποστρώματα και παράγουν τα ίδια λιπιδιακά προϊόντα. Παρά όμως τις ομοιότητες τους έχουν τόσο επικαλυπτόμενες όσο και διακριτές λειτουργίες. Η έκφραση των p110α και p110β είναι ευρεία σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς. Αντίθετα η έκφραση των p110δ και p110γ είναι πιο περιορισμένη κυρίως στα λευκοκύτταρα (leykocytes) (11). Η γενετική απώλεια της p110α ή της p110β στον ποντικό προκαλεί θάνατο κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, καταδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο των ισομορφών αυτών στην εμβρυογένεση (11). Αντίθετα, η απώλεια της p110γ ή της p110δ δεν είναι εμβρυϊκά θανατηφόρα, αλλά συνοδεύεται από σημαντικές διαταραχές στην ανάπτυξη και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (12–15). Η καταλυτική ισομορφή p110α παίζει επίσης βασικό ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και στο μεταβολισμό της γλυκόζης (5). Η p110β ισομορφή μοιάζει και αυτή να έχει μια επίδραση στη σηματοδότηση της ινσουλίνης συμπληρώνοντας πιθανά τη δράση της p110α στη συγκεκριμένη διεργασία (15). Η p110β παίζει σημαντικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα (5). Οι p110γ και p110δ ισομορφές, από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερη σημασία για το ανοσοποιητικό σύστημα όπου και εκφράζονται. Έτσι απώλεια της p110γ προκαλεί βλάβη στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων, στην ενεργοποίηση των

Τ λεμφοκυττάρων και στη μετανάστευση ουδετεροφίλων. Παρομοίως απώλεια της p110δ προκαλεί λειτουργικές ατέλειες στα λεμφοκύτταρα, στα ουδετερόφιλα και στα μαστοκύτταρα (5).

1.2 Η κλάση ΙΙ των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

Οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης της κλάσης ΙΙ αποτελούν τη λιγότερο μελετημένη και λειτουργικά διακριτή υποομάδα της οικογένειας των PI3Ks, παρουσιάζοντας σημαντικές διαφορές τόσο στη δομή όσο και στη βιολογική τους δράση σε σύγκριση με τις κλάσεις Ι και ΙΙΙ (4).

Σε ασπόνδυλους οργανισμούς, όπως η Caenorhabditis elegans και η Drosophila melanogaster, απαντά μία μόνο ισομορφή (piki-1 και PI3K68D, αντίστοιχα), ενώ στα σπονδυλωτά έχουν ταυτοποιηθεί τρεις καταλυτικές ισομορφές: PI3K-C2α, PI3K-C2β και PI3K-C2γ. Σε αντίθεση με τις PI3Ks κλάσης Ι, οι οποίες λειτουργούν ως ετεροδιμερή ένζυμα με καταλυτική και ρυθμιστική υπομονάδα, οι PI3Ks κλάσης ΙΙ είναι μεγάλες μονομερείς κινάσες (~170–190 kDa) χωρίς σταθερά συνδεδεμένες ρυθμιστικές υπομονάδες, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της ενεργότητάς τους (3,16).

Δομικά, οι PI3Ks κλάσης ΙΙ διατηρούν τον χαρακτηριστικό καταλυτικό πυρήνα των PI3Ks, ο οποίος περιλαμβάνει την ελικοειδή περιοχή (helical domain) και την καταλυτική περιοχή (kinase domain). Ωστόσο, διακρίνονται από την παρουσία επιπρόσθετων λιπιδιοδεσμευτικών περιοχών. Στο Ν-τελικό άκρο φέρουν μία περιοχή C2 που διευκολύνει την πρόσδεση σε μεμβράνες, ενώ στο C-τελικό άκρο διαθέτουν δεύτερο C2 domain και μία περιοχή PX (phox homology), η οποία εμπλέκεται στην αναγνώριση φωσφοϊνοσιτιδίων και στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενζύμου. Η δομική αυτή οργάνωση επιτρέπει χωρικά ελεγχόμενη ενεργοποίηση και στοχευμένη παραγωγή φωσφοϊνοσιτιδίων σε εξειδικευμένα μεμβρανικά διαμερίσματα (1,4).

Για αρκετά χρόνια, τα ακριβή λιπιδιακά προϊόντα των PI3Ks κλάσης ΙΙ αποτέλεσαν αντικείμενο επιστημονικής συζήτησης. Πλέον έχει τεκμηριωθεί ότι οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν κυρίως τη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) παράγοντας PI(3)P, ενώ υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να καταλύσουν τη μετατροπή της PI(4)P σε $PI(3,4)P_2$ (3,17,18). Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι το $PI(3,4)P_2$ μπορεί να παραχθεί είτε άμεσα από τις PI3Ks κλάσης ΙΙ είτε έμμεσα μέσω αποφωσφορυλίωσης του PIP_3, προϊόντος των PI3Ks κλάσης Ι. Οι διακριτές αυτές δεξαμενές λιπιδίων εμφανίζουν χωρική και λειτουργική εξειδίκευση, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία του υποκυτταρικού εντοπισμού και του μικροπεριβάλλοντος παραγωγής τους για τη βιολογική τους δράση (3).

Τα φωσφοϊνοσιτιδικά προϊόντα των PI3Ks κλάσης ΙΙ διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ταυτότητας των ενδοκυττάριων μεμβρανών, ιδιαίτερα στο πλαίσιο του ενδοσωματικού συστήματος. Οι PI3K-C2α και PI3K-C2β έχουν εντοπιστεί σε πρώιμα ενδοσώματα, ενδοσώματα ανακύκλωσης, καθώς και σε

όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα, όπου συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής διακίνησης και της ενδοκύτωσης (19). Μελέτες σε γενετικά μοντέλα έχουν επιβεβαιώσει τον ρόλο τους στη ρύθμιση της ενδοσωματικής ωρίμανσης και της διακίνησης υποδοχέων (1).

Σε επίπεδο ισομορφών, η PI3K-C2α έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία εξειδικευμένων δεξαμενών PI(3)P που ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική διακίνηση και τη λειτουργία του πρωτογενούς κροσσού, ενώ η PI3K-C2β εμπλέκεται στη ρύθμιση της δυναμικής του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής μετανάστευσης (16). Η PI3K-C2γ φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της ινσουλινοεξαρτώμενης σηματοδότησης, ιδιαίτερα σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς όπως το ήπαρ και ο σκελετικός μυς (20).

Λειτουργικά, οι PI3Ks κλάσης II συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της ενδοκυττάρωσης, της ανακύκλησης υποδοχέων, της κυτταρικής πολικότητας, της κυτταρικής μετανάστευσης και της αγγειογένεσης. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια της PI3K-C2α οδηγεί σε σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες και εμβρυϊκή θνησιμότητα, γεγονός που υπογραμμίζει τη θεμελιώδη φυσιολογική της σημασία (4).

Σε παθολογικό επίπεδο, η δυσρύθμιση των PI3Ks κλάσης II έχει συσχετιστεί με καρκινογένεση, μεταβολικές διαταραχές και αγγειακές παθήσεις. Αν και οι περισσότερες στοχευμένες θεραπείες έχουν αναπτυχθεί έναντι των PI3Ks κλάσης I, τα τελευταία χρόνια αυξάνεται το ενδιαφέρον για τη φαρμακολογική στόχευση και των κινασών της κλάσης II, τόσο ως ανεξάρτητων θεραπευτικών στόχων όσο και ως ρυθμιστών της ευαισθησίας σε αντικαρκινικούς παράγοντες (21).

Συνολικά, οι PI3Ks κλάσης II αποτελούν εξειδικευμένες λιπιδικές κινάσες με ιδιαίτερη δομική οργάνωση, διακριτή εξειδίκευση υποστρωμάτων και έντονα χωρικά ρυθμιζόμενη δράση. Η ικανότητά τους να δημιουργούν τοπικές δεξαμενές PI(3)P και PI(3,4)P_2 τις καθιστά κεντρικούς ρυθμιστές της μεμβρανικής ταυτότητας και της ενδοκυτταρικής διακίνησης, ενώ η κατανόηση της βιολογίας τους συνεχίζει να εμπλουτίζει τις γνώσεις μας για τη σηματοδότηση των φωσφοϊνοσιτιδίων και τις θεραπευτικές της προεκτάσεις.

1.3 Η κλάση III των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

Οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης της κλάσης III αντιπροσωπεύονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα από ένα και μοναδικό ένζυμο, τη Vacuolar Protein Sorting 34 (VPS34), επίσης γνωστή ως PIK3C3. Η VPS34 αποτελεί την εξελικτικά περισσότερο διατηρημένη μορφή PI3K και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό παραγωγής 3-φωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI(3)P), ενός φωσφοϊνοσιτιδικού λιπιδίου με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοσωματικής κυκλοφορίας και της αυτοφαγίας (3,4).

Η VPS34 φωσφορυλιώνει αποκλειστικά τη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) στη θέση 3 του ινοσιτολικού δακτυλίου, παράγοντας PI(3)P, το οποίο λειτουργεί ως

λιπιδιακό σήμα πρόσδεσης για πρωτεΐνες που φέρουν δομικά μοτίβα FYVE ή PX. Η στρατολόγηση πρωτεϊνών-τελεστών (effectors) είναι απαραίτητη για τη διαμόρφωση ειδικών μεμβρανικών διαμερισμάτων και την προώθηση διεργασιών όπως η ενδοκύττωση, η ενδοσωματική ωρίμανση και η αυτοφαγία (3).

Σε λειτουργικό επίπεδο, η VPS34 δρα εντός δύο διακριτών πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που καθορίζουν τη βιολογική της εξειδίκευση: Το σύμπλοκο I, το οποίο συμμετέχει στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, και το σύμπλοκο II, που σχετίζεται με τη μεταφορά πρωτεϊνών από τα πρώιμα ενδοσώματα προς τα όψιμα (3). Το σύμπλοκο I αποτελείται κυρίως από τις πρωτεΐνες VPS34, Beclin 1, VPS15 (PIK3R4), ATG14L και NRBF2 και δρα κυρίως στα αρχικά στάδια της αυτοφαγίας, προάγοντας τον σχηματισμό των φαγοφορίων (3). Το σύμπλοκο II περιλαμβάνει επίσης τις VPS34, Beclin 1 και VPS15, αλλά αντί του ATG14L περιέχει UVRAG (UV radiation resistance-associated gene), το οποίο κατευθύνει τη δράση του συμπλόκου στην ενδοσωμική ωρίμανση και τη μεταφορά λυσοσωμικών ενζύμων (3,22).

Νεότερες μελέτες προτείνουν ότι η VPS34 εμπλέκεται σε ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών πέραν της κλασικής αυτοφαγίας, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της ενδοσωματικής κινητικότητας, της κυτταρικής επιβίωσης και της απόκρισης στο κυτταρικό στρες. Συγκεκριμένα, εργασίες σε ιστούς όπως ο αμφιβληστροειδής και οι ανοσολογικοί κυτταρικοί πληθυσμοί δείχνουν ότι η VPS34 είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική λειτουργία τους και ότι η απώλειά της ή η δυσλειτουργία της μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις (22,23).

Η εμπλοκή της VPS34 σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταβολικές διαταραχές και καρκινική επιβίωση έχει καταδειχθεί σε πλήθος μελετών· η ανεπάρκεια του ενζύμου συσχετίζεται με συσσώρευση ατελών αυτοφαγικών δομών, επιταχυνόμενη κυτταρική γήρανση και μειωμένη αντίσταση σε κυτταρικό στρες. Αντιθέτως, η υπερενεργοποίηση της αυτοφαγίας μέσω παθολογικών διαδρομών VPS34 μπορεί να υποστηρίξει τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων, καθιστώντας την κλάση III PI3K έναν ενδιαφέροντα φαρμακολογικό στόχο για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις (3,23).

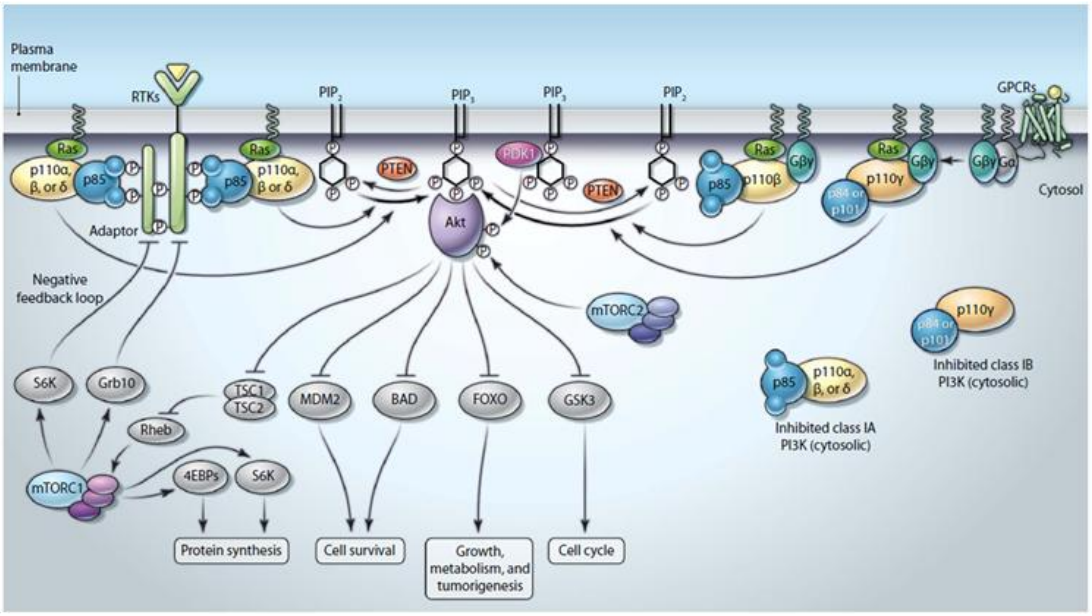
Συνολικά, η VPS34, ως το μοναδικό μέλος της κλάσης III των PI3Ks, αποτελεί θεμελιώδη ρυθμιστή της μεμβρανικής ταυτότητας και της κυτταρικής ομοιοστασίας, συνδέοντας στενά τον μεταβολισμό, την ενδοσωματική δυναμική και την αυτοφαγία μέσω της παραγωγής του PI(3)P και της συμμετοχής της σε εξειδικευμένα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

1.4 Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT και η απορρύθμισή του στην καρκινογένεση

Η καρκινογένεση αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου. Μέσα στο πλαίσιο αυτής της ευαίσθητης ισορροπίας, πρωτεΐνες και

σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης αποτελούν συχνούς στόχους ογκογόνων μεταβολών (24,25).

Ένα από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στις διεργασίες αυτές είναι το PI3K/AKT, το οποίο αποτελεί κεντρικό ρυθμιστικό άξονα της κυτταρικής φυσιολογίας και συνδέεται άμεσα με την καρκινογένεση μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής επιβίωσης, του μεταβολισμού, της αγγειογένεσης, της διαφοροποίησης και της κινητικότητας των κυττάρων (Εικόνα 1.4). Αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου μοριακού δικτύου που περιλαμβάνει επίσης το σύμπλεγμα mTOR, σχηματίζοντας τον άξονα PI3K/AKT/mTOR, ο οποίος απορρυθμίζεται συχνά σε διάφορους τύπους καρκίνου (26–28).



Εικόνα 1.4: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/AKT. *Η εικόνα απεικονίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT, το οποίο ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs) ή υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Η ενεργοποίηση των PI3K οδηγεί στη μετατροπή του PIP_2 σε PIP_3 και στην επακόλουθη ενεργοποίηση της Akt (AKT), η οποία ρυθμίζει καθοριστικές κυτταρικές διεργασίες όπως η επιβίωση, ο κυτταρικός κύκλος, η πρωτεϊνοσύνθεση και ο μεταβολισμός. Η PTEN δρα ως βασικός αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης PI3K/AKT, ενώ τα σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2 συμμετέχουν σε διαφορετικά επίπεδα της σηματοδοτικής οδού. Αναπαραγωγή από* Vadas et al.(7)

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινά κυρίως μέσω υποδοχέων κινασών τυροσίνης (RTKs), όπως οι EGFR, HER2 και IGF-1R, καθώς και μέσω GPCRs ή RAS. Οι PI3Ks κλάσης I φωσφορυλιώνουν το $PI(4,5)P_2$ (PIP_2) προς $PI(3,4,5)P_3$ (PIP_3), το οποίο δρα ως λιπιδικός δεύτερος αγγελιαφόρος. Η συσσώρευση του PIP_3 οδηγεί στη στρατολόγηση της AKT και της PDK1 στην κυτταρική μεμβράνη, όπου η AKT φωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη 308 από την PDK1 και στη σερίνη 473 από το σύμπλοκο mTORC2, αποκτώντας πλήρη καταλυτική δραστικότητα (29–31). Η AKT, ως κεντρική κινάση σερίνης/θρεονίνης, ρυθμίζει πληθώρα μορίων-στόχων που

σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τον μεταβολισμό και την κινητικότητα. Ένας βασικός μηχανισμός προαγωγής της επιβίωσης είναι η φωσφορυλίωση και αναστολή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BAD, καθώς και η αναστολή της δράσης μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας FOXO, οι οποίοι επάγουν την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων (31–33). Επιπλέον, η AKT αναστέλλει το σύμπλοκο TSC1/TSC2, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της mTORC1 και ενίσχυση της πρωτεϊνοσύνθεσης και της κυτταρικής ανάπτυξης (28,34).

Κεντρικός αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού αυτού είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (phosphatase and tensin homolog), μια λιπιδική φωσφατάση, που ανταγωνίζεται τη δράση των PI3Ks κλάσης I, αποφωσφορυλιώνοντας το PIP_3 προς PIP_2 και περιορίζοντας έτσι τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της AKT στην πλασματική μεμβράνη (35,36). Η απώλεια ή η λειτουργική αδρανοποίηση του PTEN μέσω μεταλλάξεων, διαγραφών, επιγενετικών ή μετα-μεταφραστικών μηχανισμών έχει σαν αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT συμβάλλοντας καθοριστικά στην έναρξη και εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου (36). Η βιολογική λειτουργία του PTEN όμως δεν περιορίζεται μόνο στην απενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω AKT, αλλά επηρεάζει επίσης τη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, της μεταβολικής δραστηριότητας και της γονιδιακής έκφρασης(37,38). Δομικές και λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστικότητά του ρυθμίζεται δυναμικά από διαμορφώσεις της C-τελικής ουράς, φωσφορυλιώσεις και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη μεμβρανική του πρόσδεση, στοιχεία κρίσιμα για την αντικαρκινική του λειτουργία (39). Επιπλέον, το PTEN εντοπίζεται όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα, όπου συμβάλλει στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας, στον έλεγχο της επιδιόρθωσης DNA και στη ρύθμιση της οργάνωσης της χρωματίνης, υποδηλώνοντας έναν πολυεπίπεδο ογκοκατασταλτικό ρόλο (40). Η συχνή απώλεια ή μετάλλαξή του σε ευρύ φάσμα συμπαγών και αιματολογικών κακοηθειών το καθιστά έναν από τους πλέον κρίσιμους ογκοκατασταλτικούς παράγοντες στην ανθρώπινη καρκινογένεση (41). Ως εκ τούτου, στρατηγικές που στοχεύουν στην αποκατάσταση της λειτουργίας, στη σταθεροποίηση ή στη μίμηση της δραστικότητας του PTEN αποτελούν αντικείμενο εντατικής φαρμακευτικής και μεταφραστικής έρευνας τα τελευταία έτη.

Η παθολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT συμβάλλει στην ογκογένεση και στην εξέλιξη του κακοήθους φαινοτύπου, προσδίδοντας χαρακτηριστικά όπως ανθεκτικότητα στην απόπτωση, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενισχυμένη αγγειογένεση. Η AKT προάγει την έκφραση του αγγειογόνου παράγοντα VEGF και καταστέλλει αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, όπως η p27^Kip1, διευκολύνοντας την είσοδο των κυττάρων στη φάση S και την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση (42,43).

Παράλληλα, το μονοπάτι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση της AKT ενισχύει την αερόβια γλυκόλυση (φαινόμενο Warburg) μέσω αυξημένης έκφρασης μεταφορέων γλυκόζης, όπως ο GLUT1, και ενεργοποίησης βασικών γλυκολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης της εξοκινάσης και της φωσφοφρουκτοκινάσης (44,45). Με αυτόν τον τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν τη μεταβολική ευελιξία να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται ταχέως ακόμη και σε υποξικές συνθήκες.

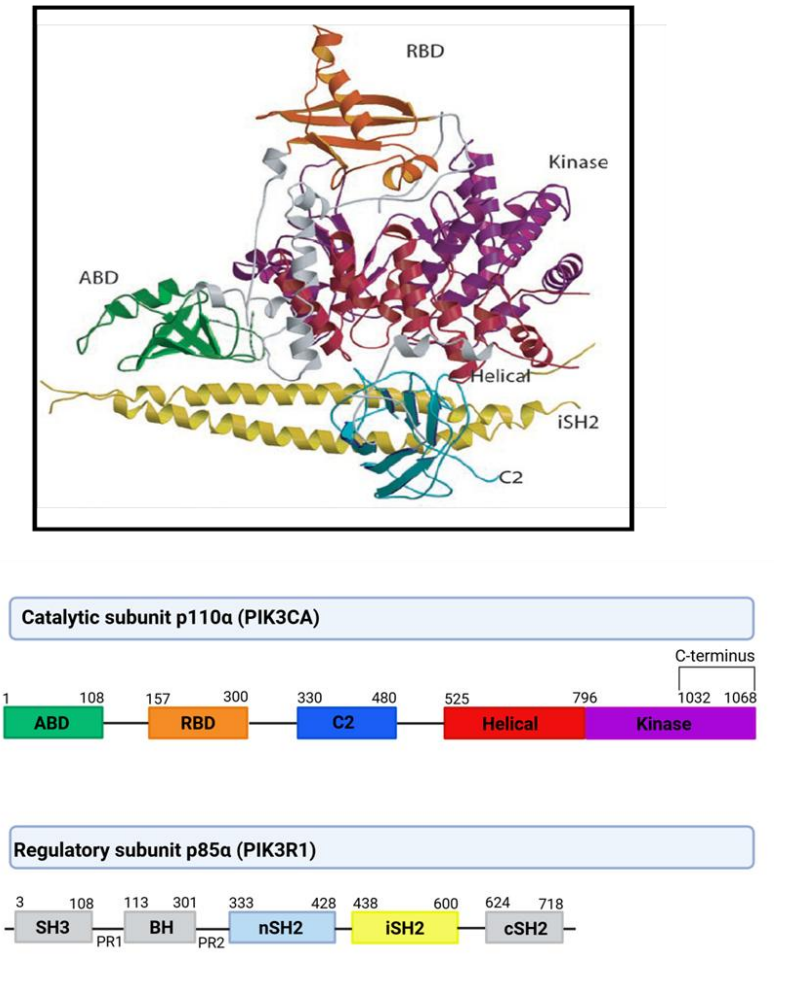
Επιπλέον, η AKT επηρεάζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη δυναμική των εστιακών προσκολλήσεων μέσω φωσφορυλίωσης υποστρωμάτων όπως η Girdin, ενισχύοντας την κυτταρική κινητικότητα και τη μεταστατική ικανότητα (46). Τέλος, ο άξονας PI3K/AKT έχει συσχετισθεί με τη διατήρηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, ενός κυτταρικού υποπληθυσμού με ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης που συμβάλλει στην υποτροπή και στη θεραπευτική αντοχή (47). Η εξάρτηση αυτών των κυττάρων από συνεχή σηματοδότηση μέσω PI3K/AKT υποδηλώνει ότι το μονοπάτι λειτουργεί όχι μόνο ως ογκογονικός εκκινητής αλλά και ως ρυθμιστής της μακροχρόνιας εξέλιξης και προσαρμοστικότητας του όγκου.

Συνολικά, ο άξονας PI3K/AKT/mTOR λειτουργεί ως κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης, του μεταβολισμού και του πολλαπλασιασμού, μετατρέποντας εξωκυτταρικά ερεθίσματα σε συντονισμένες ενδοκυτταρικές αποκρίσεις. Η γενετική ή επιγενετική απορρύθμισή του αποτελεί συχνό και καθοριστικό γεγονός στην καρκινογένεση, συμβάλλοντας στην εγκαθίδρυση και εξέλιξη του κακοήθους φαινοτύπου. Η κατανόηση των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων των βασικών συστατικών του μονοπατιού, και ιδιαίτερα της PI3Kα, είναι συνεπώς απαραίτητη για την αποσαφήνιση των μηχανισμών ενεργοποίησής του και για τον ορθολογικό σχεδιασμό στοχευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων.

1.5 Δομή της PI3Kα και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της καταλυτικής και της ρυθμιστικής υπομονάδας

Η κατανόηση της τρισδιάστατης διαμόρφωσης και των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων της PI3Kα είναι θεμελιώδης για την αποσαφήνιση των μηχανισμών ενεργοποίησης του ενζύμου τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η Εικόνα 1.5 απεικονίζει την πρώτη υψηλής ανάλυσης κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς p110α/p85α, η οποία δημοσιεύθηκε από τους Huang et al. (Science, 2007), και η οποία περιλαμβάνει τις πέντε δομικές περιοχές της καταλυτικής υπομονάδας p110α και τις περιοχές nSH2 και iSH2 της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α. Η συνολική αρχιτεκτονική του συμπλόκου έχει παρομοιαστεί με ιστιοφόρο, όπου η iSH2 σχηματίζει τον κεντρικό «σκελετό», ενώ οι υπόλοιπες δομικές περιοχές το «ιστίο». Ο δομικός πυρήνας συγκροτείται από την

ελικοειδή και την καταλυτική περιοχή, ενώ οι ABD, RBD και C2 καταλαμβάνουν περιφερειακές θέσεις.

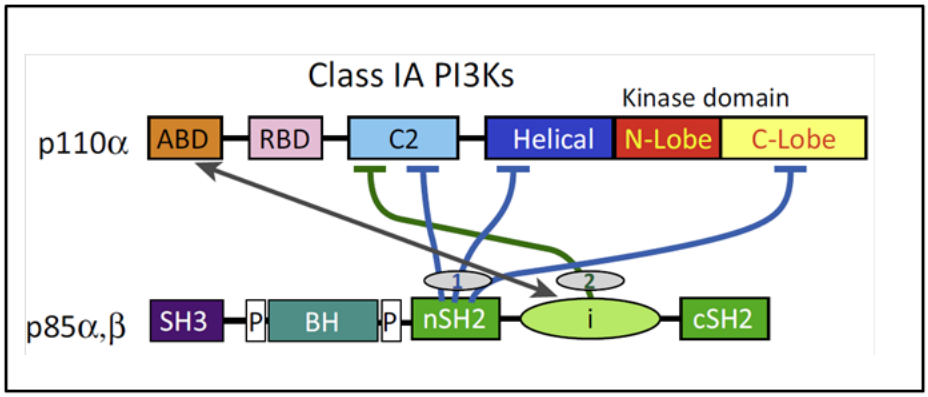


Εικόνα 1.5: Κρυσταλλική δομή και δομικές περιοχές του ετεροδιμερούς PI3Kα (p110α/p85α). *Απεικονίζονται οι βασικές δομικές περιοχές της καταλυτικής υπομονάδας p110α: ABD (πράσινο), RBD (πορτοκαλί), C2 (μπλε), ελικοειδής περιοχή (helical domain, κόκκινη) και καταλυτική περιοχή (kinase domain, μοβ), καθώς και η περιοχή iSH2 (κίτρινο) της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α. Με γκρι χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές σύνδεσης (linker) ανάμεσα στις δομικές περιοχές της κινάσης. Η διάταξη των δομών υποδεικνύει τη συνεργασία μεταξύ των υπομονάδων για τη ρύθμιση της ενζυμικής ενεργότητας. Αναπαραγωγή από Huang et al.*(48)

Η ABD (res. 1–108) σχηματίζει δομή α/β και συνδέεται με τη RBD μέσω εύκαμπτου συνδέσμου (~109–153). Η RBD (res. 157–300) υιοθετεί δομή τύπου ubiquitin-like fold και μεσολαβεί στη σύνδεση με την ενεργή, GTP-δεσμευμένη μορφή της Ras, συμβάλλοντας στη μεμβρανική στόχευση του συμπλόκου (49). Η περιοχή C2 (res. 330–480) έχει χαρακτηριστική δομή β-sandwich και συμμετέχει σε εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις τόσο με την p110α όσο και με την iSH2 της p85α, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση του συμπλόκου (50). Η ελικοειδής περιοχή (res. 525–796), αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι αποτελεί τον κεντρικό κορμό του μορίου (51), έχει πλέον αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως δομική γέφυρα μεταξύ της C2 και της

καταλυτικής περιοχής και αποτελεί κρίσιμο κόμβο αλληλεπίδρασης με την nSH2 της p85α (48,52). Η καταλυτική περιοχή (res. 796–1068) εμφανίζει την κλασική α/β τοπολογία δύο λοβών. Ο αμινοτελικός λοβός (796–833) αποτελείται κυρίως από β-πτυχωτές δομές, ενώ ο καρβοξυτελικός λοβός (884–1068) είναι κυρίως α-ελικοειδής. Ανάμεσά τους σχηματίζεται κοιλότητα (cleft) που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (50).

Όπως έχει αναφερθεί, η ενεργότητα της καταλυτικής υπομονάδας p110α αναστέλλεται από την ρυθμιστική υπομονάδα p85α της κινάσης. Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω συγκεκριμένων ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες σταθεροποιούν το ένζυμο σε ανενεργή κατάσταση και αποτρέπουν την ανεξέλεγκτη σηματοδότηση. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή nSH2 της p85α διαδραματίζει κομβικό ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση, καθώς αλληλεπιδρά με τρεις βασικές περιοχές της p110α: την C2, την ελικοειδή (helical) και την καταλυτική περιοχή (Εικόνα 1.6) (53). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ανασταλτικό χαρακτήρα και εμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος ή τη διαμόρφωση της κινάσης στην ενεργό τρισδιάστατη δομή της. Παράλληλα, η iSH2 αλληλεπιδρά με την περιοχή C2, συνεισφέροντας στη σταθερότητα του συμπλόκου, ενώ η ισχυρή σύνδεση μεταξύ ABD (p110α) και iSH2 (p85α) φαίνεται να έχει κυρίως δομικό ρόλο, χωρίς να επηρεάζει άμεσα την κατασταλτική λειτουργία της p85α (54). Κατά την ενεργοποίηση κυτταρικών υποδοχέων, φωσφορυλιωμένα μοτίβα pYXXM των υποδοχέων ή προσαρμογέων προσδένονται στις περιοχές SH2 της p85α, ιδιαίτερα στην nSH2, με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή της από τις ανασταλτικές θέσεις. Η άρση των ανασταλτικών αυτών αλληλεπιδράσεων οδηγεί στην ενεργοποίηση της p110α, επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση των λιπιδικών υποστρωμάτων της PI3Kα στη μεμβράνη, μια διαδικασία με καθοριστικό ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος (3,55).



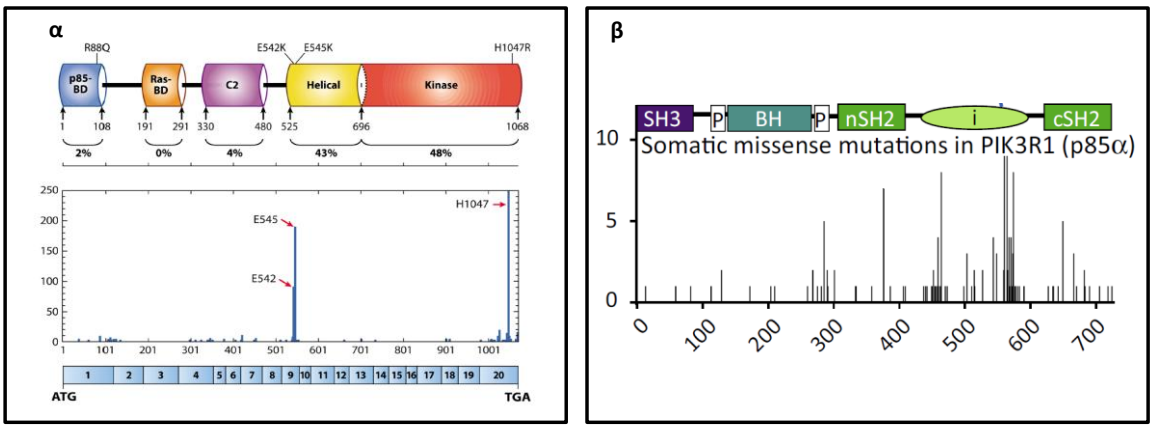
Εικόνα 1.6: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών περιοχών της PI3Kα. *Η εικόνα παρουσιάζει τις δομικές περιοχές της καταλυτικής υπομονάδας p110α και της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α/β της PI3Kα κλάσης IA, καθώς και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η p110α περιλαμβάνει τις δομικές περιοχές ABD, RBD, C2, Helical, και την καταλυτική περιοχή κινάσης (N-Lobe και C-Lobe). Η p85α/β αποτελείται από τις δομικές περιοχές SH3, BH, nSH2, iSH2 και cSH2. Τα βέλη υποδεικνύουν τις λειτουργικές και ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ*

των συγκεκριμένων περιοχών, οι οποίες συμβάλλουν στη σταθερότητα και στη ρύθμιση της ενεργότητας της PI3Kα. Αναπαραγωγή από Burke et al. (53)

1.6 Οι ενεργοποιητικές μεταλλαγές της PI3Kα

Η PI3Kα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ισομορφές της οικογένειας των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, με καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του μεταβολισμού και της επιβίωσης, ενώ η παθολογική της ενεργοποίηση έχει συσχετιστεί στενά με την ογκογένεση (4,56).

Το γονίδιο *PIK3CA*, που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3Kα, είναι ένα από τα συχνότερα μεταλλαγμένα γονίδια στον ανθρώπινο καρκίνο, ενώ οι ενεργοποιητικές μεταλλαγές του προσδίδουν ογκογόνες ιδιότητες (57,58). Σωματικές μεταλλαγές του γονιδίου αυτού ανιχνεύονται με συχνότητα που μπορεί να προσεγγίζει το 30% σε ορισμένους κοινούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη και του ενδομήτριου (14,57). Ογκογόνες μεταλλαγές του γονιδίου *PIK3CA* έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν σε όλες τις δομικές περιοχές της p110α, με εξαίρεση την RBD, όπου οι περισσότερες από αυτές οδηγούν σε αυξημένη ενζυμική ενεργότητα της κινάσης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (48,59,60). Η κατανομή των μεταλλαγών αυτών φαίνεται ότι δεν είναι τυχαία αφού σχεδόν το 80% συναντάται σε τρία σημεία (mutation hotspots) (57). Δύο σημειακές μεταλλαγές εντοπίζονται στο εξόνιο 9 (E542K και E545K), στην ελικοειδή περιοχή, και μία στο εξόνιο 20 (H1047R) στην καταλυτική περιοχή της κινάσης (Εικόνα 1.5α) (57,61). Οι μεταλλαγές αυτές δρουν συνεργιστικά, όταν συνυπάρχουν, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της κινάσης μέσω όμως διαφορετικών και ανεξάρτητων μηχανισμών (54,62).



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση των σημειακών μεταλλαγών της PI3Kα. *α) Κατανομή και συχνότητα των ογκογόνων μεταλλαγών στην καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3Kα. Οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονται κυρίως σε κρίσιμες περιοχές της πρωτεΐνης που επηρεάζουν τη ρύθμιση και την ενζυμική της δραστικότητα Αναπαραγωγή από* Chalhoub et al.(56).

β) Εντοπισμός σημειακών μεταλλαγών στη ρυθμιστική υπομονάδα p85α της PI3Kα, οι οποίες διαταράσσουν τη σταθερότητα του συμπλόκου και συμβάλλουν στη απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K/AKT. Αναπαραγωγή από Burke and Williams (53)

Μεταλλαγές στην περιοχή C2 της καταλυτικής υπομονάδας p110α της PI3Kα έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ενεργότητα της κινάσης, πιθανώς μέσω διαταραχής της αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής C2 και της περιοχής iSH2 της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α. Η επαφή αυτή θεωρείται σημαντική για τη σταθεροποίηση της αναστολής που ασκεί η p85α στην p110α, επομένως η εξασθένισή της μπορεί να οδηγεί σε άρση της αναστολής της καταλυτικής ενεργότητας (48,50). Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλαγές, όπως η C420R, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη συγγένεια της C2 για την iSH2, υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό ενεργοποίησης της PI3Kα (63).

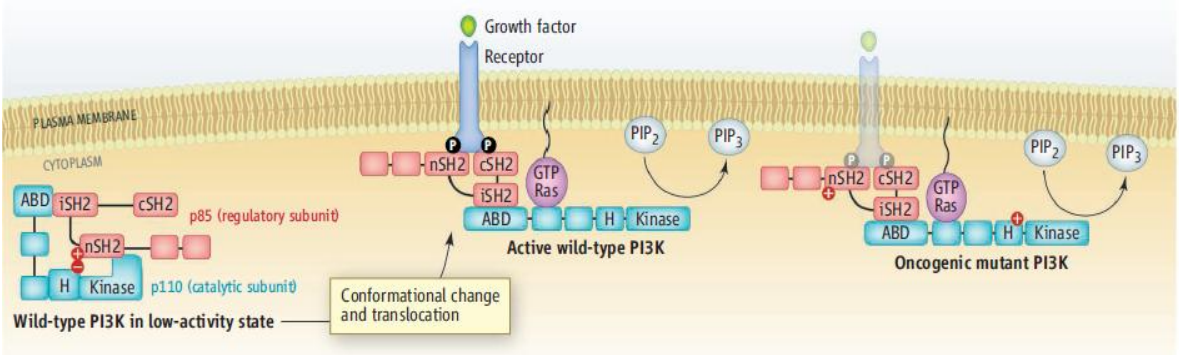
Παράλληλα, ενεργοποιητικές μεταλλαγές έχουν περιγραφεί και στην περιοχή ABD της p110α, όπως R88Q και G106V. Οι μεταλλαγές αυτές έχουν συσχετιστεί με αυξημένη καταλυτική ενεργότητα λιπιδικής κινάσης της πρωτεΐνης και θεωρείται ότι δρουν μέσω διαταραχής των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν την ανενεργή διαμόρφωση της p110α. Δομικές και βιοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η ABD συμμετέχει σε κρίσιμες επαφές τόσο με την ελικοειδή όσο και με την καταλυτική περιοχή, συμβάλλοντας στη διατήρηση αυτοαναστολτικής διαμόρφωσης της p110α (48,50). Η αποσταθεροποίηση αυτών των εσωτερικών αλληλεπιδράσεων ενδέχεται να προάγει μια διαμόρφωση της p110α πιο ευνοϊκή για την πρόσδεση στο υπόστρωμα ή/και για τη φωσφορυλίωση του PIP_2 σε PIP_3 (64). Συνολικά, οι δομικές μεταλλαγές στις περιοχές C2 και ABD της p110α φαίνεται να ενεργοποιούν την PI3Kα είτε μέσω απορρύθμισης της αναστολής από την p85α είτε μέσω εσωτερικής αναδιάταξης που ευνοεί την ενεργή διαμόρφωσή της.

Σωματικές μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί και στη ρυθμιστική υπομονάδα p85α της PI3Kα σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους, συμβάλλοντας σε αυξημένη ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα (65). Οι περισσότερες αφορούν τις περιοχές nSH2 και iSH2 (Εικόνα 1.7β) (53), οι οποίες συμμετέχουν στη σταθερή σύνδεση με την καταλυτική υπομονάδα p110α και στην ανασταλτική ρύθμισή της. Ενδεικτικά, μεταλλαγές σε κρίσιμες θέσεις όπως οι D560 και N564 στην περιοχή iSH2 διαταράσσουν την αλληλεπίδραση με την περιοχή C2 της p110α, με αποτέλεσμα την απώλεια της ανασταλτικής λειτουργίας της p85α και την υπερενεργοποίηση της PI3Kα (63). Επιπλέον, έχει καταγραφεί ένας μικρός αριθμός ογκογόνων μεταλλάξεων, των οποίων ο μηχανισμός δράσης δεν φαίνεται να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με την p110α, υποδεικνύοντας ότι επηρεάζουν μη καταλυτικές λειτουργίες της p85α, όπως η σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού ή η σταθερότητα του συμπλόκου (53). Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν τον πολυδιάστατο ρόλο της p85α στη ρύθμιση της σηματοδότησης

PI3K/AKT, τόσο μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την p110α όσο και μέσω εναλλακτικών μηχανισμών.

1.7 Η μεταλλαγή E545K στην ελικοειδή περιοχή της PI3Kα

Η μεταλλαγή E545K είναι μία από τις δύο πιο συχνά εμφανιζόμενες ογκογόνες μεταλλαγές της PI3Kα (*PIK3CA*) και εντοπίζεται στην ελικοειδή περιοχή της καταλυτικής υπομονάδας p110α. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στη θέση 545 της p110α βρίσκεται ένα γλουταμινικό οξύ (E), το οποίο φέρει αρνητικό φορτίο και συμμετέχει σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη θετικά φορτισμένη λυσίνη (K) που βρίσκεται στη θέση 379 της nSH2 περιοχής της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α. Αυτή η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υπομονάδων αποτελεί βασικό μηχανισμό αναστολής της καταλυτικής ενεργότητας της PI3Kα (66,67).



Εικόνα 1.8: Απώλεια ανασταλτικής ρύθμισης της PI3Kα λόγω της μεταλλαγής E545K. *Το σχήμα παρουσιάζει τόσο την ενεργοποίηση της PI3Kα μέσω πρόσδεσης της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α στην πλασματική μεμβράνη όσο και την ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας p110α λόγω της ογκογόνου μεταλλαγής E545K στην ελικοειδή περιοχή. Η μεταλλαγή προκαλεί μείωση της ανασταλτικής δράσης της p85α, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της κινάσης. Αναπαραγωγή από Lee et al.*(67)

Η σημειακή μεταλλαγή E545K οδηγεί στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από λυσίνη, μεταβάλλοντας το φορτίο από αρνητικό σε θετικό (Εικόνα 1.8). Η αλλαγή αυτή διαταράσσει την ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ της ελικοειδούς περιοχής της p110α και της nSH2 της p85α, με αποτέλεσμα η p110α να ενεργοποιείται ιδιοσυστατικά, δηλαδή ανεξάρτητα από την πρόσδεση της p85α σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης (53,66,68,69). Η ενεργοποιητική αυτή μεταλλαγή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή PIP_3, οδηγεί στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3Kα/AKT προάγοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την καρκινογένεση και τη μετάσταση (57,70).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που η μεταλλαγή E545K αρκεί για την ενζυμική απορρύθμιση της p110α, η μέγιστη ογκογόνος δραστικότητα της E545K-

μεταλλαγμένης PI3Kα απαιτεί πρόσθετες μοριακές αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η E545K-μεταλλαγμένη p110α εξακολουθεί να εξαρτάται από την πρόσδεσή της στην πλασματική μεμβράνη μέσω ενεργοποιημένων πρωτεϊνών Ras**,** προκειμένου να επιτύχει τη μέγιστη ενζυμική της ενεργότητα. Η αλληλεπίδραση με τις ενεργές, GTP-δεσμευμένες μορφές Ras ενισχύει την πρόσδεση της μεταλλαγμένης κινάσης στη μεμβράνη και συμβάλλει στη σταθεροποίηση της ενεργής διαμόρφωσής της, επιτρέποντας αποδοτικότερη μετατροπή του PIP_2 σε PIP_3. Με αυτόν τον τρόπο, η συνεργασία της μεταλλαγής E545K με τη σηματοδότηση μέσω Ras ενισχύει περαιτέρω την ογκογόνο ικανότητα της PI3Kα, προάγοντας έντονη ενεργοποίηση των καθοδικών μονοπατιών όπως το AKT/mTOR**,** που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση (62).

1.8 Η μεταλλαγή H1047R στην καταλυτική (kinase) περιοχή της PI3Kα

Η H1047R αποτελεί τη συχνότερη ογκογόνο σημειακή μεταλλαγή του γονιδίου *PIK3CA*. Η μεταλλαγή συνίσταται στην υποκατάσταση της ιστιδίνης (His) στη θέση 1047 από αργινίνη (Arg)**,** στο καρβοξυτελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής (kinase domain) του ενζύμου. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η αργινίνη στη θέση αυτή αποτελεί το φυσιολογικό κατάλοιπο στην ομόλογη καταλυτική υπομονάδα p110γ, υποδηλώνοντας ότι η συγκεκριμένη θέση μπορεί να ανεχθεί θετικό φορτίο χωρίς να διαταράσσεται η βασική δομική ακεραιότητα της κινάσης (8).

Παρά τη συχνότητα και τη σημασία της μεταλλαγής H1047R σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου και του πνεύμονα (64,71–73), ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησής της δεν είναι πλήρως κατανοητός. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενζυμική ενεργότητα της H1047R-μεταλλαγμένης PI3Kα είναι υψηλότερη σε σχέση με την ενεργότητα της πρωτεΐνης φυσιολογικού τύπου (8,61,64,74) και ότι υπόκειται σε περαιτέρω αύξηση κατά τη πρόσδεση της πρωτεΐνης σε υποδοχείς κινασών τυροσίνης (74). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίησή της είναι ανεξάρτητη από τη σύνδεση με πρωτεΐνες Ras, ενώ παραμένει εξαρτώμενη από την αλληλεπίδραση της καταλυτικής υπομονάδας με τη ρυθμιστική p85α (62).

Η θέση 1047 βρίσκεται μέσα στην έλικα Κα12, η οποία αποτελεί τμήμα του καρβοξυτελικού λοβού της καταλυτικής περιοχής της κινάσης. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται κοντά στον βρόχο ενεργοποίησης (activation loop res 938-958) του καρβοξυτελικού άκρου, μιας κρίσιμης δομής που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας. Χωρικά, η κα12 βρίσκεται κοντά τόσο στο σημείο πρόσδεσης του ATP (ATP-binding pocket) όσο και στην περιοχή αλληλεπίδρασης του φωσφολιπιδικού υποστρώματος PIP_2. Η στρατηγική αυτή θέση υποδηλώνει ότι μεταβολές στη συγκεκριμένη περιοχή μπορούν να επηρεάσουν έμμεσα τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου, τον προσανατολισμό του ATP και την ορθή τοποθέτηση του υποστρώματος στη μεμβρανική διεπιφάνεια.

Ο καθορισμός της κρυσταλλικής δομής της PI3Kα H1047R το 2009 (8), και η δυνατότητα σύγκρισης της με τη δομή της PI3Kα φυσιολογικού τύπου έδειξαν ότι η μεταλλαγή H1047R προκαλεί λεπτές τοπικές αναδιατάξεις που ενισχύουν τη χωρική εγγύτητα του καταλυτικού βρόγχου (catalytic loop res. 909-920) με τα φωσφολιπιδικά υποστρώματα. Η αντικατάσταση της ιστιδίνης από αργινίνη (H1047R) εισάγει θετικό φορτίο στην συγκεκριμένη θέση, το οποίο ενισχύει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης, αυξάνοντας τη μεμβρανική συγγένεια της p110α και ευνοώντας τη σταθεροποίηση της ενεργής διαμόρφωσης του ενζύμου (64,75). Η H1047R μετατοπίζει τη σχετική θέση του καταλυτικού βρόγχου (catalytic loop res. 909-920) σε σχέση με τη μεμβράνη, διευκολύνοντας την ταυτόχρονη και αποτελεσματική πρόσβαση τόσο στο ATP όσο και στο PIP_2 (64,75).

Μια πρόσφατη μελέτη των Jenkins et al. (2023, *Nature Communications*), αξιοποιώντας την τεχνική της κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) κατόρθωσε να απεικονίσει με λεπτομέρεια τη θέση της μεταλλαγής H1047R στην PI3Kα και τις επιπτώσεις της στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη μεμβράνη. Η μελέτη τους αποκάλυψε ότι η μεταλλαγή H1047R προσανατολίζει το καρβοξυτελικό άκρο της PI3Kα σε διαμόρφωση που ευνοεί την πρόσδεσή της στη μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, η μεταλλαγή ενεργοποιεί την PI3Kα μέσω δύο διακριτών μηχανισμών: πρώτον, αναδιατάσσει το δομικό μοτίβο WIF (membrane-binding **W**ater-**I**nteracting **F**ingerprint) έτσι ώστε να στραφεί προς την επιφάνεια πρόσδεσης της μεμβράνης, αυξάνοντας τη συγγένεια του ενζύμου για τη μεμβράνη· και δεύτερον, προάγει μια καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση του βρόχου ενεργοποίησης (activation loop res. 938-958), ενισχύοντας έτσι τη συνολική ενζυμική δραστικότητα.

Συνολικά, οι δομικές και λειτουργικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεταλλαγή H1047R ενισχύει τη μεμβρανική πρόσδεση και σταθεροποιεί την καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση της PI3Kα, οδηγώντας σε αυξημένη και παρατεταμένη παραγωγή PIP_3 (48,59,60). Η συσσώρευση του PIP_3 προάγει την υπερενεργοποίηση του μονοπατιού της AKT, μετατοπίζοντας την ισορροπία της οδού υπέρ της σηματοδότησης ακόμη και παρουσία φυσιολογικής ρύθμισης από την PTEN, η οποία αποφωσφορυλιώνει το PIP_3 σε PIP_2 (35,36). Η παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT ενισχύει την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, συμβάλλοντας στον ογκογόνο μετασχηματισμό (48,59,60).

1.9 Στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR στον καρκίνο. Ανάπτυξη αναστολέων έναντι των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης

Οι 3-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης αποτελούν έναν από τους πλέον σημαντικούς ρυθμιστές βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός και η αγγειογένεση. Το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR είναι ένα από τα πιο συχνά απορρυθμισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια στον ανθρώπινο καρκίνο, καθώς εμπλέκεται στην ανάπτυξη και πρόοδο

όγκων σε ποσοστό 30–50% των περιπτώσεων (57,76,77). Η παθολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού μπορεί να προκύψει μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν συνιστώσες του μονοπατιού (όπως το *PIK3CA*), μέσω αυξημένης έκφρασης των γονιδίων αυτώνλόγω ενισχύσεων του αριθμού αντιγράφων ή άλλων μεταγραφικών μηχανισμών, καθώς και λόγω απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το PTEN.

Επι

πλέον, η απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση αντοχής σε συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες, όπως ορμονοθεραπεία, αναστολείς κινασών τυροσίνης και ακτινοθεραπεία (76,77). Ως εκ τούτου, το μονοπάτι αυτό έχει αναδειχθεί σε σημαντικό θεραπευτικό στόχο, οδηγώντας στην ανάπτυξη αναστολέων μικρού μοριακού βάρους που στοχεύουν διαφορετικά επίπεδα της οδού. Οι αναστολείς της PI3K χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τους αναστολείς ευρέως φάσματος (pan-PI3K), τους αναστολείς με εξειδίκευση έναντι των διαφόρων ισομορφών της καταλυτικής υπομονάδας p110 της PI3K, και τους διπλούς αναστολείς PI3K/mTOR.

Οι αναστολείς ευρέως φάσματος στοχεύουν μη εκλεκτικά όλες τις ισομορφές της κλάσης I PI3K. Οι ενώσεις Wortmannin και LY294002 είναι οι πιο γνωστοί αναστολείς αυτής της κατηγορίας και οι οποίοι λόγω της μεγάλης τους δραστικότητας σε χαμηλές συγκεντρώσεις (IC_{50}=2,3nM και 1,8 μM αντίστοιχα) (78) αποτελούσαν για αρκετά χρόνια ένα σημαντικό εργαλείο στη μελέτη της λειτουργίας της PI3K. Οι ενώσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση σε διάφορα καρκινικά κυτταρικά μοντέλα (79,80). Λόγω όμως της αστάθειας τους σε υδατικά διαλύματα, των κακών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους, της απουσίας εξειδίκευσης και της μεγάλης τοξικότητας που επέδειξαν όταν χρησιμοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα, η χρήση τους περιορίστηκε σε προκλινικές μελέτες (81). Άλλος ένας γνωστός αναστολέας ευρέως φάσματος είναι η ένωση GDC-0941 (IC_{50}=3nM), ο πρώτος PI3K αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές. Η θεραπευτική ικανότητα των αναστολέων ευρέως φάσματος περιορίζεται από την έλλειψη εξειδίκευσης καθώς αναστέλλουν όλες τις ισομορφές της PI3K ανεξαρτήτως της επιμέρους συμμετοχής τους στην ογκογένεση, ενώ παράλληλα εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα (5,81).

Η καλύτερη κατανόηση του διαφορετικού βιολογικού ρόλου των ισομορφών της καταλυτικής υπομονάδας p110 (α, β, γ, δ), καθώς και η αποκάλυψη των κρυσταλλικών δομών τους, οδήγησαν στην ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων. Οι ενώσεις αυτές στοχεύουν συγκεκριμένες ισομορφές, βελτιώνοντας τη θεραπευτική εκλεκτικότητα και περιορίζοντας την τοξικότητα (82). Ο αναστολέας GDC-0032 (taselisib) εμφανίζει υψηλή ισχύ σε υπονανομοριακές συγκεντρώσεις και εκλεκτικότητα για τις ισομορφές p110α, γ και δ. Η ένωση BYL719 (alpelisib) είναι ένας επιλεκτικός αναστολέας της p110α, ο οποίος έχει εγκριθεί για τη θεραπεία PIK3CA-μεταλλαγμένου, HR-θετικού/HER2-αρνητικού προχωρημένου ή

μεταστατικού καρκίνου του μαστού, σε συνδυασμό με ενδοκρινική θεραπεία (83,84). Το μόριο Idelalisib είναι εκλεκτικός αναστολέας της p110δ, ο οποίος έχει εγκριθεί για χρήση σε αιματολογικές κακοήθειες και επιδεικνύει 240–2.500 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την p110δ σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές (76). Ωστόσο, ακόμη και οι εκλεκτικοί αναστολείς δεν διακρίνουν μεταξύ φυσιολογικής και μεταλλαγμένης PI3K. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε παρενέργειες λόγω αναστολής της φυσιολογικής σηματοδότησης. Χαρακτηριστικά, η αναστολή της p110α σχετίζεται με δυσμενείς μεταβολές στον μεταβολισμό της γλυκόζης και στην απάντηση στην ινσουλίνη (5). Παρόλα αυτά, μελέτες δείχνουν ότι ο GDC-0032 έχει αυξημένη δραστικότητα έναντι κυτταρικών σειρών με μεταλλαγές στο *PIK3CA*, προσφέροντας έναν βαθμό επιλεκτικότητας για τις ογκογόνες μορφές (85). Ενθαρρυντικά δεδομένα έχουν επίσης προκύψει από πρώιμες κλινικές δοκιμές με BYL719 και GDC-0032 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που φέρουν μεταλλαγές στο *PIK3CA* (86,87).

Δεδομένης της δομικής ομολογίας μεταξύ των καταλυτικών περιοχών των p110 υπομονάδων και του mTOR, έχουν αναπτυχθεί μόρια που αναστέλλουν τόσο τις ισομορφές της PI3K όσο και τα σύμπλοκα mTORC1/2. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη παρεμπόδιση του μονοπατιού σε πολλαπλά επίπεδα και την αποτροπή μηχανισμών ανάδρασης που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα μονοθεραπειών με αναστολείς του mTORC1 (82). Ο πιο γνωστός αναστολέας αυτής της κατηγορίας είναι η ένωση BEZ-235 (NVP-BEZ235), ένας διπλός αναστολέας με ισχυρή δράση (nanomolar) τόσο για τις ισομορφές p110α, -β, -γ και -δ της PI3K όσο και για τα σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές φάσης I (81,82). Η απόδοση των αναστολέων αυτής της κατηγορίας, σαν μεμονωμένοι θεραπευτικοί παράγοντες στις μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές, υπήρξε περιορισμένη. Η αποτελεσματικότητα τους στις διάφορες κακοήθειες ήταν μέτρια και συνοδεύτηκε από σημαντική τοξικότητα (77).

Η ανάπτυξη αναστολέων της PI3K παραμένει ένα από τα πλέον ενεργά πεδία στον σχεδιασμό αντικαρκινικών θεραπειών. Αν και πολλές ενώσεις έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η πολυπλοκότητα του μονοπατιού και η φυσιολογική σημασία των PI3Ks σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες περιορίζουν τις θεραπευτικές επιλογές. Η ερευνητική κατεύθυνση τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί στην ανάπτυξη νέας γενιάς εκλεκτικών και αλλοστερικών αναστολέων. Στο επίκεντρο αυτής της προσπάθειας βρίσκονται μικρά μόρια εμφανίζουν αυξημένη εκλεκτικότητα έναντι μεταλλαγμένων μορφών της PI3Kα, διατηρώντας παράλληλα την ακεραιότητα της φυσιολογικής σηματοδότησης (88). Ένα τέτοιο μόριο είναι ο inavolisib (GDC-0077), ένας εκλεκτικός αναστολέας της p110α, ο οποίος εμφάνισε βελτιωμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και καλύτερο προφίλ ασφάλειας σε σχέση με παλαιότερους αναστολείς (89). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν και οι συνδυαστικές θεραπευτικές στρατηγικές, όπου αναστολείς PI3K ενσωματώνονται σε πρωτόκολλα με άλλους στόχους (π.χ. CDK4/6, ορμονικούς αναστολείς κ.ά.) ώστε

να αντιμετωπιστούν μηχανισμοί αντίστασης και να μεγιστοποιηθεί η αντικαρκινική ανταπόκριση (90).

Οι παραπάνω εξελίξεις σηματοδοτούν τη σταδιακή μετάβαση από τους ευρέως φάσματος αναστολείς προς πιο εξειδικευμένες και εξατομικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές, με έμφαση στον σχεδιασμό μικρών μορίων που στοχεύουν επιλεκτικά τις μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης PI3K, διατηρώντας ανέπαφη τη φυσιολογική κυτταρική σηματοδότηση. Η προσέγγιση αυτή, προσαρμοσμένη στο μοριακό προφίλ κάθε όγκου, δημιουργεί προοπτικές για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και λιγότερο τοξικών αντικαρκινικών θεραπειών.

1.10 Οι μέθοδοι μέτρησης της δραστικότητας της PI3Kα

Η αποτελεσματική ανάπτυξη στοχευμένων φαρμακολογικών αναστολέων έναντι της PI3Kα προϋποθέτει εις βάθος κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της. Η αποκωδικοποίηση αυτών των μηχανισμών αποτελεί αναγκαίο βήμα για τον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων με ειδικότητα ως προς συγκεκριμένες μεταλλαγές. Προς αυτή την κατεύθυνση, η ανάπτυξη αξιόπιστων ενζυμικών δοκιμασιών, ικανών να αποτυπώνουν με ποσοτική ακρίβεια τη δραστικότητα της PI3Kα, είναι κρίσιμη τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για την προκλινική αξιολόγηση υποψήφιων φαρμάκων.

Οι πιο κλασικές και άμεσα ποσοτικές προσεγγίσεις βασίζονται στη χρήση ραδιοσημασμένου [γ-^{32}P]ATP ως δότη φωσφορικής ομάδας για τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος PIP_2 προς PIP_3. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συνθήκες in vitro με την παρουσία συνθετικών λιποσωμάτων που περιέχουν PIP_2 και άλλα φωσφολιπίδια, όπως φωσφατιδυλοσερίνη, ενώ το προϊόν της αντίδρασης διαχωρίζεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Η ανίχνευση του PIP_3 επιτυγχάνεται είτε μέσω αυτοραδιογραφίας είτε με φασματομετρική καταγραφή της ραδιενέργειας (phosphorimaging) (91). Η μέθοδος αυτή αποτελεί το σημείο αναφοράς για in vitro βιοχημικές αναλύσεις, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς της. Παρ' όλα αυτά, η απαίτηση χρήσης ραδιενεργών υλικών, η ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό και η αδυναμία εφαρμογής σε αυτοματοποιημένα ή υψηλής απόδοσης πρωτόκολλα περιορίζουν τη χρηστικότητά της σε ευρύτερα πλαίσια.

Ως παραλλαγή της ραδιομετρικής προσέγγισης, η μέθοδος «membrane capture», όπως περιγράφεται από τον Knight και συνεργάτες (92), επιτρέπει τη σύλληψη των φωσφολιπιδικών προϊόντων της αντίδρασης (συμπεριλαμβανομένου του ραδιοσημασμένου PIP_3) επάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το φίλτρο πλένεται για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων νουκλεοτιδίων, και η ραδιενέργεια που κατακρατείται αντιστοιχεί στην παραχθείσα ποσότητα PIP_3. Η προσέγγιση αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την απλοποίηση του χειρισμού και τη δυνατότητα προσαρμογής σε φορμάτ 96-θέσεων, καθιστώντας την κατάλληλη για ημι-αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα μέσης απόδοσης.

Προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που επιβάλλει η χρήση ραδιοϊσοτόπων, έχουν αναπτυχθεί νεότερες, μη ραδιομετρικές μέθοδοι μέτρησης της δραστικότητας της PI3Kα, κατάλληλες για εφαρμογές υψηλής απόδοσης. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνεται μέθοδος HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence), η οποία βασίζεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης GRP1 με το PIP_3 και στην αξιοποίηση φθορίζοντων δεικτών, επιτρέποντας την ανίχνευση του παραγόμενου PIP_3 μέσω ομοιογενούς φθορισμομετρίας χρονικής ανάλυσης. Η μέθοδος αυτή, όπως αναπτύχθηκε από τους Sugita και συνεργάτες (93), προσφέρει αυξημένη ασφάλεια, καθώς δεν απαιτεί χρήση ραδιενέργειας. Επιπλέον, δεν απαιτεί διαχωρισμό προϊόντων και είναι πλήρως συμβατή με αναλύσεις υψηλής απόδοσης (high-throughput).

Εναλλακτικά, η μέθοδος ADP-Glo™ επιτρέπει την έμμεση μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας μέσω της ποσοτικοποίησης του ADP που παράγεται κατά τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ATP στο PIP_2. Το ADP που παράχθηκε μετατρέπεται ενζυμικά σε ATP, το οποίο ανιχνεύεται λουμινομετρικά, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και δυνατότητα αυτοματοποίησης χωρίς την ανάγκη χρήσης ραδιενεργών αντιδραστηρίων ή εκχύλισης λιπιδίων (94). Παραλλαγές τεχνολογιών TR-FRET, στις οποίες ανήκει και το HTRF, καθώς και μέθοδοι φθορίζουσας πόλωσης (FP), έχουν αξιοποιηθεί σε πλατφόρμες υψηλής απόδοσης, τον έλεγχο μεγάλων βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων με αξιοπιστία και ταχύτητα (94). Παρόλο που οι τεχνικές αυτές είναι ασφαλείς, ευαίσθητες και ιδιαίτερα αποδοτικές, ενέχουν σημαντικό κόστος λόγω των απαιτούμενων εξειδικευμένων αντιδραστηρίων και της ανάγκης για προηγμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.

Παρόλο που οι ραδιομετρικές μέθοδοι εξακολουθούν να αποτελούν μεθόδους αναφοράς για την *in vitro* μελέτη της PI3Kα, τα λειτουργικά τους μειονεκτήματα - όπως η χρήση ραδιενέργειας, η δυσκολία αυτοματοποίησης και οι αυξημένες απαιτήσεις ασφάλειας - έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη νεότερων, μη ραδιομετρικών τεχνολογιών. Οι τελευταίες προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία και δυνατότητα εφαρμογής σε αναλύσεις υψηλής απόδοσης, συνοδεύονται όμως από περιορισμούς, όπως αυξημένο κόστος, τεχνική πολυπλοκότητα και ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό.

2. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η PI3Kα αποτελεί βασικό ρυθμιστή κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και ο μεταβολισμός. Ογκογόνες μεταλλαγές, όπως η H1047R, οδηγούν σε υπερενεργοποίηση της οδού PI3K/AKT και συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του κακοήθους φαινοτύπου. Η πλήρης κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ενεργοποίησης και ρύθμισης της PI3Kα είναι επομένως απαραίτητη για τον ορθολογικό σχεδιασμό στοχευμένων φαρμακολογικών αναστολέων. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητη η χρήση αξιόπιστων μεθόδων μέτρησης της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα, σε συνθήκες που να προσομοιάζουν το φυσικό της μεμβρανικό περιβάλλον.

Παρά την σαφή πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην κατεύθυνση αυτή, η έλλειψη μεθόδων μέτρησης της ενεργότητας της PI3Kα που να συνδυάζουν αξιοπιστία, ποσοτική ακρίβεια και πρακτική εφαρμοσιμότητα παραμένει εμπόδιο τόσο για τη θεμελιώδη έρευνα όσο και για την προκλινική φαρμακολογική αξιολόγηση. Οι υφιστάμενες μέθοδοι, αν και ευαίσθητες, περιορίζονται από τεχνικές δυσκολίες όπως η χρήση ραδιενεργών υλικών και η αδυναμία αυτοματοποίησης σε πλατφόρμες υψηλής απόδοσης ή από το υψηλό κόστος, την τεχνική πολυπλοκότητα και την ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας αξιόπιστης, *in vitro* μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της PI3Kα χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα λιπιδιακό PIP_2 (ℓPIP_2) ενσωματωμένο σε λιποσώματα, προσομοιώνοντας έτσι το φυσιολογικό μεμβρανικό περιβάλλον του ενζύμου. Ένας ακόμη στόχος ήταν η αξιοποίηση της μεθόδου αυτής, σε συνδυασμό με πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR), για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που συμβάλλουν στην υπερενεργοποίηση της H1047R-μεταλλαγμένης PI3Kα, αναδεικνύοντας την πρόσδεση στην μεμβράνη ως καθοριστικό παράγοντα στην ογκογόνο λειτουργία της PI3Kα. Επιπλέον, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο (screening) ενώσεων, με στόχο την ταυτοποίηση αναστολέων με εκλεκτικότητα έναντι της H1047R-μεταλλαγμένης μορφής, συμβάλλοντας στον ορθολογικό σχεδιασμό στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Οι πλάκες 96 φρεατίων επικαλυμμένες με γλουταθειόνη, καθώς και το Streptavidin poly-HRP αγοράστηκαν από την PIERCE/ThermoFisher Scientific. Το ATP, η DMSO, η BSA, το OPD (o-Phenylenediamine), καθώς και οι αναστολείς Wortmannin και LY294002 προήλθαν από τη Sigma–Aldrich/Merck, ενώ προμηθευτήκαμε το IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) από την ThermoFisher Scientific. Οι πρωτεΐνες PI3Kα WT, PI3Kα H1047R και PI3Kα E545K προήλθαν από την Millipore/Merck. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό της GST-GRP1 (Glutathione-Sepharose 4B) αγοράστηκαν από την Amersham Pharmacia.

Το λιπίδιο PIP_2 [L-α-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Brain, Porcine) (ammonium salt)] (ℓPIP_2) καθώς και η υδατοδιαλυτή μορφή του PIP_2 [1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5-bisphosphate) (ammonium salt)] αγοράστηκαν από την Avanti Polar Lipids. Το PIP_3 [PtdIns-(3,4,5)-P3 (1-stearoyl, 2-arachidonoyl) (sodium salt)] καθώς και το βιοτινυλιωμένο PIP_3 [PtdIns-(3,4,5)-P3 biotin (sodium salt)] (b-PIP_3) προήλθαν από την Cayman Chemicals. Το διπλά φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο του PDGFR αγοράστηκε από την Cambridge Peptides Ltd.

Οι αναστολείς πρωτεασών PMSF, Pepstatin και Aprotinin προήλθαν από την Roche/Merck, ενώ η Leupeptin από τη Sigma-Aldrich/Merck. Από τη Sigma-Aldrich/Merck προήλθαν επίσης οι νουκλεάσες DNase και RNase.

3.2 Μέθοδοι

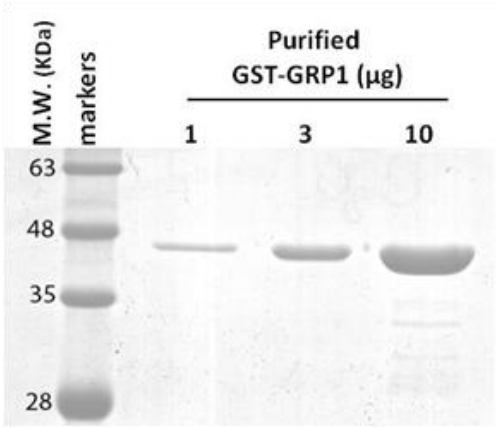
3.2.1 Έκφραση και καθαρισμός της GST-GRP1

Το cDNA της GST-GRP1 (ευγενική προσφορά του Dr. Nickolas Leslie, University of Dundee) χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους *Escherichia coli* BL21 (DE3). Καλλιέργεια όγκου 4 λίτρων των μετασχηματισμένων βακτηρίων επωάστηκε στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm να φτάσει σε τιμές 0,4–0,6. Στην καλλιέργεια προστέθηκε Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 200 μM για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GST-GRP1, και ακολούθησε επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 22°C. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μM Leupeptin, 1 μg/mL Aprotinin, 0,7 μg/mL Pepstatin, 5 μg/mL DNase και 5 μg/mL RNase. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση συσκευής French Press, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το

κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 100.000×g (37.000 rpm, Beckman 70Ti) προκειμένου να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και τα αδιάλυτα συστατικά, και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε περαιτέρω καθαρισμό για την απομόνωση της GST-GRP1 πρωτεΐνης.

Το υπερκείμενο που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο επεξεργασίας επωάστηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης (4% agarose) (Glutathione-Sepharose 4B Cytiva),. υπό ανάδευση, για 1,5 ώρα στους 4°C, σε στήλες χρωματογραφίας (Poly-Prep Chromatography Columns, Bio-Rad). Μετά την απομάκρυνση του μη προσδεδεμένου υλικού, οι στήλες υποβλήθηκαν σε έξι διαδοχικές πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) και 150 mM NaCl. Η έκλουση της GST-GRP1 πραγματοποιήθηκε σε έξι διαδοχικά κλάσματα με διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT και 15 mM αναγμένη γλουταθειόνη (L-Glutathione, Sigma-Aldrich).

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε κλάσμα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bio-Rad Protein Assay, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl και 0,1 mM EDTA. Η τελική παρασκευή περιείχε 1,3 mL διαλύματος με συγκέντρωση 6,2 mg/mL GST-GRP1. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Εικόνα 3.1)



Εικόνα 3.1: Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-GRP1 (PH). *Η GST-GRP1 (PH) εκφράστηκε σε Escherichia coli του στελέχους BL21 (DE3) και καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας σφαιρίδια γλουταθειόνης (Glutathione-Sepharose 4B, Cytiva), ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η καθαρότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) και χρώση με Coomassie Blue.).*

3.2.2 Παρασκευή λιποσωμάτων

Για την παρασκευή λιποσωμάτων που περιέχουν PIP_2 (***ℓ***PIP_2 λιποσώματα***)***, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HCT116, μία καρκινική σειρά του παχέος εντέρου, στην οποία το γονίδιο *PIK3CA* φέρει τη μεταλλαγή H1047R στο exon 20. Από καλλιέργεια κυττάρων σε 45 τρυβλία διαμέτρου 10 cm απομονώθηκαν 14 mg μικτών λιπιδίων, τα οποία επαναδιαλύθηκαν σε 39 ml $CHCl_3$:EtOH:H_2O (20:9:1) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Folch (95).

Σε 560 μl του παραπάνω μείγματος, το οποίο περιείχε 200 μg λιπιδίων, προστέθηκαν 200 μg φυσικού PIP_2 (***ℓ***PIP_2) από εγκέφαλο χοίρου [L-α-phosphotidylinositol 4,5 – biphosphate (Brain Porcine), Avanti Polar Lipids], το οποίο είχε ήδη διαλυθεί σε 40 μl $CHCl_3$:EtOH:H_2O (20:9:1). Το μείγμα των λιπιδίων αποξηράνθηκε πλήρως υπό ροή αζώτου (N_2) και στη συνέχεια τέθηκε σε φυγοκεντρικό εξατμιστή (speed vacuum) για 1 ώρα, προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως οι οργανικοί διαλύτες.

Ακολούθως, προστέθηκαν 0,2 ml υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος (20 mM Tris pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8 και 1 mM EGTA) και το μείγμα λιπιδίων επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, με περιοδική ανακίνηση (vortex) κάθε 10 λεπτά.

Στη συνέχεια, το μείγμα υποβλήθηκε σε 5 κύκλους παγώματος/απόψυξης (freeze and thaw) (υγρό άζωτο / υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου), και ακολούθησε υπερηχητική επεξεργασία (sonication) σε υδατόλουτρο (VWR Ultrasonic Cleaner USC-TH), για 30 λεπτά. Τέλος, η παρασκευή υποβλήθηκε σε εξώθηση (extrusion), χρησιμοποιώντας τη συσκευή Avanti mini-Extruder, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με μεμβράνη πόρων διαμέτρου 100 nm. Η διαδικασία αυτή οδήγησε σε ομοιογενές μείγμα λιποσωμάτων μιας διπλοστοιβάδας (small unilamellar vesicles), με ενσωματωμένο ***ℓ***PIP_2, με διάμετρο μικρότερη των 100 nm.

Το τελικό παρασκεύασμα περιείχε συγκεντρώσεις 1 μg/μl ***ℓ***PIP_2 και 1 μg/μl μικτών λιπιδίων.



Εικόνα 3.2: Φωτογραφία της συσκευής mini-extruder (Avanti Polar Lipids)

3.2.3 Πρωτόκολλο της μεθόδου μέτρησης της δραστικότητας της PI3Kα

Για την ανάπτυξη της μεθόδου μέτρησης της ενεργότητας της PI3Kα χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 96 φρεατίων επικαλυμμένα με γλουταθιόνη (GSH) (Pierce Glutathione coated plates, Thermo Scientific), τα οποία επωάστηκαν για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με 220μl ενός blocking διαλύματος (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20 και 0,2% ζελατίνη) για την κάλυψη των κενών θέσεων στο πλαστικό έτσι ώστε να περιοριστούν οι μη ειδικές προσδέσεις. Στη συνέχεια προστέθηκαν στα πηγαδάκια 4 μg καθαρισμένης GST-GRP1 σε 100 μl διαλύματος blocking και συνεχίστηκε η επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να προσδεθεί η GST-GRP1 στα τοιχώματα των φρεατίων. Τέλος έγιναν 5 πλύσεις με 220 μl διαλύματος αποκλεισμού (blocking buffer).

Παράλληλα, οι αντιδράσεις της PI3Kα προετοιμάστηκαν σε μικροσωληνάρια με την προσθήκη 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (250 mM Tris pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$), 2,5 μl ATP (1 mM σε H_2O), 2 μl BSA (10 μg/μl σε H_2O), 1–5 μl PI3Kα (1 ng/μl σε 25 mM Hepes pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$ και 1 μg/μl BSA), 1 μl του υπό μελέτη αναστολέα (διαλυμένου σε DMSO), σε τελικές συγκεντρώσεις από 1 έως 100 μM, και απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί συνολικός όγκος 20 μl. Το μείγμα επωάστηκε για 10 λεπτά στους 25°C (στάδιο προεπώασης), προκειμένου να επιτραπεί η σύνδεση του αναστολέα με το ένζυμο. Μετά το στάδιο αυτό η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 5 μl του μείγματος λιποσωμάτων που περιείχαν το υπόστρωμα ℓPIP_2 (προετοιμασμένα όπως περιγράφεται παραπάνω), με συγκεντρώσεις 40 ng/μl ℓPIP_2 και 40 ng/μl μεικτών λιπιδίων. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 8 έως 16 λεπτά στους 25^oC, και τερματίστηκε με την προσθήκη 75 μl διαλύματος διακοπής, το οποίο περιείχε 5 mM EDTA, 1% BSA, 1% Tween-20 και 0,9 ng b-PIP_3, pH 8, σε TBS (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl).

Το μείγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε από τους μικροσωληνίσκους στα πηγαδάκια του πιάτου 96-φρεατίων, στα οποία είχε ήδη προσδεθεί η πρωτεΐνη GST-GRP1 (PH), όπως περιγράφηκε παραπάνω, και επωάστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση. Σε αυτό το στάδιο, το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης, δηλαδή το PIP_3, ανταγωνίζεται το b-PIP_3 για τη σύνδεση με την GST-GRP1 (PH). Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή PIP_3 (δηλαδή, η ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα), τόσο μικρότερη είναι η δέσμευση του b-PIP_3 στη GST-GRP1 (PH).

Στη συνέχεια, τα πηγαδάκια πλύθηκαν πέντε φορές με ρυθμιστικό διάλυμα blocking, 2 λεπτά η κάθε πλύση, και επωάστηκαν με 0,1 μg/ml σύμπλοκο στρεπταβιδίνης–HRP σε 1% BSA σε PBS για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανακίνηση. Τέλος έγιναν πέντε ακόμη πλύσεις (2 λεπτά η κάθε μια) και προστέθηκε το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης HRP (200 μl διάλυμα 0,04% OPD και 0,01% H_2O_2 σε ρυθμιστικό φωσφορικού/κιτρικού, pH 5,0), για 1–5 λεπτά, μέχρι την

ανάπτυξη κίτρινου χρώματος. Για τον τερματισμό της αντίδρασης της HRP και τη σταθεροποίηση του χρωμοφόρου προϊόντος, προστέθηκαν 50 μl διαλύματος H_2SO_4 1 M και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 492 nm, χρησιμοποιώντας αναγνώστη ELISA (TECAN, Infinite F50 Plus).

Στην περίπτωση των πειραμάτων με το φωσφορυλιωμένο PDGFR πεπτίδιο (Cambridge peptide, code 27609 ESDGGY*MDMSKDESIDY*VPMLDMKGDIKYADIE) 2μl διαφορετικών συγκεντρώσεων του φωσφοπεπτιδίου προστέθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης της κινάσης στο στάδιο της προεπώασης για 10 λεπτά στους 25°C, πριν την προσθήκη του λιπιδιακού υποστρώματος και την έναρξη της αντίδρασης. Το πεπτίδιο φυλάσσεται στους -80°C, σε αρχική συγκέντρωση 0,35mM.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του ATP στην ανασταλτική δράση ορισμένων ενώσεων, το ATP χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 2mM (αρχική συγκέντρωση 20mM), αντί για 100μM (αρχική 1mM) που χρησιμοποιήθηκε στα υπόλοιπα πειράματα.

Για την παρασκευή του υποστρώματος OPD αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα το οποίο αποτελείται από 24,3ml 2,1% κιτρικό οξύ και 25,7ml 2,87% όξινο φωσφορικό νάτριο και συμπληρώθηκε μέχρι τα 100ml με διπλά απεσταγμένο νερό. Σε 50 ml αυτού του διαλύματος προστέθηκαν 0,02gr OPD (o-phenylenediamine) και 0,02ml 30% H_2O_2 (υπεροξείου του υδρογόνου).

Τόσο η PI3Kα φυσικού τύπου όσο και οι δυο μεταλλαγμένες μορφές της PI3Kα E545K και PI3Kα H1047R αγοράστηκαν από τη Millipore και φυλάσσονται στους-80°C σε συγκέντρωση 0,1μg/μl σε διάλυμα 25mM Hepes pH=7,4, 10mM $MgCl_2$ και 1mg/ml BSA. Το βιοτινυλιωμένο PIP_3 φυλάσσεται και αυτό στους -80°C σε συγκέντρωση 0,05μg/μl σε DMSO.

3.2.4 Πειράματα Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Για τα πειράματα SPR χρησιμοποιήθηκε ο βιοαισθητήρας ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Το σύστημα αυτό βασίζεται σε μια μοναδική δισδιάστατη διάταξη 6×6 στο τσιπ, δημιουργώντας 36 σημεία αλληλεπίδρασης, επιτρέποντας την εκτέλεση των πειραμάτων σε μορφή πλέγματος. Για την προσκόλληση λιποσωμάτων στην επιφάνεια του τσιπ χρησιμοποιήθηκε το κιτ LCP memLayer (Bio-Rad), σχηματίζοντας δύο διαδοχικές στιβάδες (η μία επάνω στην άλλη), επιτυγχάνοντας συνολική απόκριση περίπου 4500 RU. Η συγκέντρωση του ενέσιμου δείγματος λιποσωμάτων ήταν 1 mg/ml. Ως μάρτυρες (blanks) χρησιμοποιήθηκαν κανάλια του ίδιου τσιπ, τα οποία υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία επικάλυψης χωρίς όμως την παρουσία λιποσωμάτων.

Τα ένζυμα WT ή H1047R PI3Kα αραιώθηκαν στον κατάλληλο ρυθμιστικό φορέα ροής SPR αμέσως πριν από την έγχυση στο τσιπ. Οι πρωτεΐνες WT και H1047R PI3Kα εγχύθηκαν μέσω των οριζόντιων καναλιών (A) σε εύρος

συγκεντρώσεων από 1.25 έως 80 nM. Για τη διατήρηση της πειραματικής συνέπειας και την αξιόπιστη σύγκριση των δεδομένων SPR, τα ένζυμα WT και H1047R εγχύθηκαν ταυτόχρονα σε διαφορετικά οριζόντια κανάλια. Η μη ειδική δέσμευση και τα φαινόμενα όγκου (bulk effects) διορθώθηκαν με χρήση των κενών καναλιών αναφοράς.

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές, κάθε φορά με φρέσκια φόρτιση λιποσωμάτων. Για την ανάλυση της κινητικής των δεσμεύσεων, εφαρμόστηκε το μοντέλο Langmuir 1:1 για την προσαρμογή των δεδομένων του WT PI3Kα, ενώ για το μεταλλαγμένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ετερογενούς προσδέτη, λόγω του διφασικού δεσμικού του προφίλ. Ο ρυθμιστικός φορέας ροής SPR περιείχε 10 mM φωσφορικό νάτριο (NaPi, pH 7.4), 150 mM NaCl και 0.1 mg/ml BSA.

3.2.5 Στατιστική Ανάλυση

Η απεικόνιση των δεδομένων, συμπεριλαμβανομένου του υπολογισμού των τιμών IC_{50}, καθώς και η στατιστική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism. Η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ ομάδων εξετάστηκε με ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Tukey, για τα Σχήματα 4.2, 4.3 (Α, Β και Γ), 4.4 (Α και Β) 4.7 (Β, Γ και Δ) και 4.8. Τα δεδομένα στα Σχήματα 4.6 (Α και Β) αναλύθηκαν μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης πρώτου βαθμού (ευθεία γραμμή), ενώ οι τιμές IC_{50} στα Σχήματα 4.6 (Γ και Δ) υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση ανταγωνιστικής δέσμευσης (binding-competitive). Οι τιμές που παρουσιάζονται στα σχήματα αντιστοιχούν σε μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (SD), υπολογισμένους από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα πειράματα για κάθε συνθήκη.

Η ανάλυση των δεδομένων SPR πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ProteOn Manager.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αρχή της νέας μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης *in vitro* δοκιμασίας, χωρίς την χρήση κυττάρων, για την εκτίμηση της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα, με σκοπό τη χρήση της στην μελέτη του μηχανισμού υπερενεργοποίησης των μεταλλαγμένων ογκογόνων μορφών του ενζύμου και στην ταυτοποίηση εκλεκτικών αναστολέων εναντίον των μορφών αυτών.

Η μέθοδος που αναπτύξαμε βασίστηκε στην ικανότητα της δομικής περιοχής pleckstrin homology (PH) της πρωτεΐνης GRP1 (General Receptor for Phosphoinositides) να αναγνωρίζει και να δεσμεύει με υψηλή εκλεκτικότητα το προϊόν της αντίδρασης της PI3Kα, δηλαδή το φωσφολιπίδιο PIP_3 (96–98). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η GRP1 (PH) συντηγμένη με τη γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST), επιτρέποντας τη σταθερή πρόσδεσή της σε πλάκες 96 θέσεων που έχουν επιστρωθεί με γλουταθειόνη. Η σταθερή αυτή πρόσδεση επιτρέπει τη δέσμευση φωσφολιπιδίων PIP_3 μέσω της ειδικής αναγνώρισής του από την περιοχή PH της GRP1. Η αρχή της μεθόδου απεικονίζεται γραφικά στην Εικόνα 4.1. Στο πάνω μέρος του σχήματος (Εικόνα 4.1A) παρουσιάζονται, σε μορφή πίνακα, τα βήματα της διαδικασίας απουσία και παρουσία της PI3Kα, ενώ στο κάτω μέρος (Εικόνα 4.1B), αποδίδεται σχηματικά η αλληλουχία των αλληλεπιδράσεων.

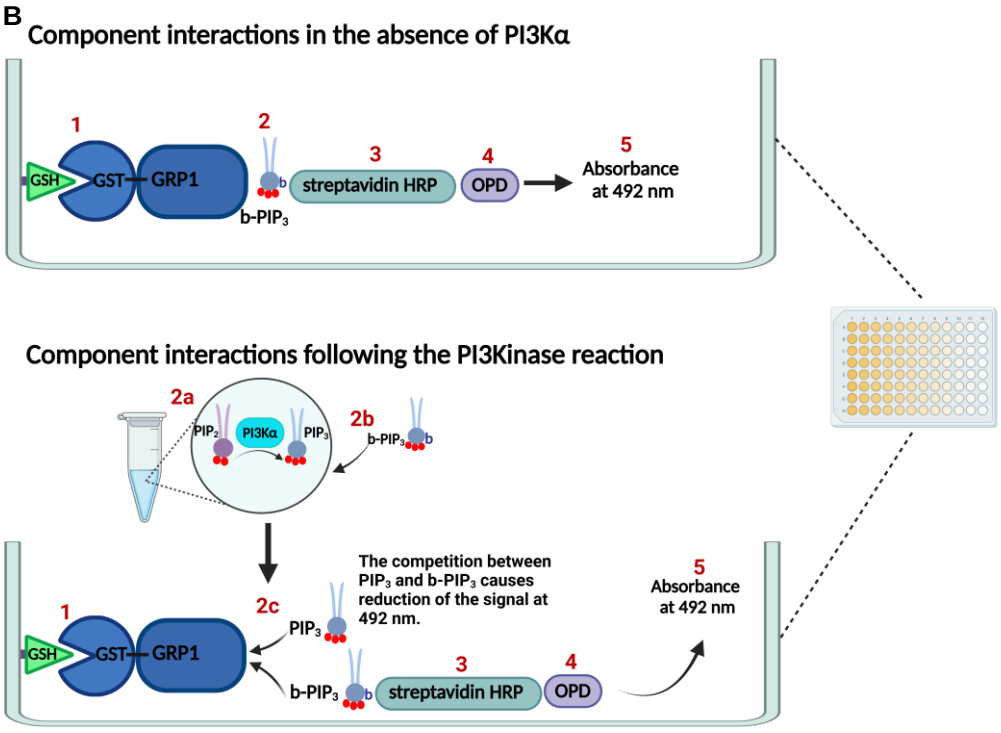
Στο πρώτο βήμα της μεθόδου, η πρωτεΐνη GST-GRP1 (PH) προσδένεται σε πιάτα 96 θέσεων επικαλυμμένα με γλουταθειόνη (βήμα 1 στις Εικόνες 4.1A και 4.1B). Στο δεύτερο βήμα (το οποίο αποτελείται από τρία επιμέρους βήματα), πραγματοποιείται η αντίδραση της PI3Kα σε μικροσωληνάρια, παρουσία των κατάλληλων υποστρωμάτων και για καθορισμένο χρονικό διάστημα (10 λεπτά) (βήμα 2α). Μετά την ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης, προστίθεται εξωγενώς στο μείγμα βιοτινυλιωμένο PIP_3 (b-PIP_3) (βήμα 2b). Το τελικό μείγμα, το οποίο περιέχει τόσο το παραγόμενο από την αντίδραση PIP_3 όσο και το b-PIP_3, μεταφέρεται στα πηγάδια των πλακών όπου έχει προσδεθεί το GST-GRP1 (βήμα 2c). Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ανταγωνιστική δέσμευση των δύο μορφών του PIP_3 από το GRP1: το ενζυμικά παραγόμενο (μη βιοτινυλιωμένο) PIP_3 ανταγωνίζεται το εξωγενές, βιοτινυλιωμένο b-PIP_3 για τη δέσμευση στις θέσεις αναγνώρισης του GRP1. Όσο μεγαλύτερη είναι η ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα, τόσο περισσότερη ποσότητα PIP_3 παράγεται, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη δέσμευση του b-PIP_3. Το επόμενο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει την προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (streptavidin-HRP) (βήμα 3), η οποία προσδένεται στη βιοτίνη του b-PIP_3, επιτρέποντας την ανίχνευσή του. Για την ανάπτυξη χρωμοφόρου σήματος, προστίθεται το υπόστρωμα της HRP, ο-

φαινυλενοδιαμίνη (OPD) (βήμα 4), το οποίο ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης μετατρέπεται σε ένα διαλυτό προϊόν με χαρακτηριστική απορρόφηση στα 492 nm. Η ένταση του σήματος που καταγράφεται στο φασματοφωτόμετρο (βήμα 5) είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας του PIP_3 που έχει παραχθεί από την PI3Kα. Συγκεκριμένα, αυξημένη παραγωγή PIP_3 οδηγεί σε μειωμένη δέσμευση b-PIP_3 και συνεπώς σε χαμηλότερη απορρόφηση, ενώ η παρουσία αποτελεσματικού αναστολέα μειώνει τη δραστικότητα της PI3Kα, επιτρέποντας την αυξημένη πρόσδεση του b-PIP_3 στο GRP1 και, κατά συνέπεια, την ενίσχυση του σήματος απορρόφησης. Συνεπώς, η απορρόφηση στα 492 nm μεταφράζεται σε αντίστροφη ένδειξη της ενζυμικής δραστηριότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της ανασταλτικής ικανότητας υποψηφίων μορίων.

A

Steps of the assay		
	In the absence of PI3Kα	**In the presence of PI3Kα**
1	GST-GRP1 is added to glutathione coated wells	
2	Biotin-PIP_3 (b-PIP_3) is added to the wells	2a PI3Kα reactions are prepared in microtubes and run for 10 min.
		2b Biotin-PIP_3 (b-PIP_3) is added in the microtubes
		2c Produced PIP_3 and b-PIP_3 is added to wells and compete for binding to GRP1
3	Streptavidin-HRP is added to wells and interacts with b-PIP3	
4	OPD, an HRP substrate is added to wells	
5	Measurement at 492 nm corresponds to the amount of b-PIP_3, bound to GRP1	

B



Εικόνα 4.1: Αρχή της μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της PI3Kα ***A.*** *Πίνακας με τα βασικά στάδια της μεθόδου (βήματα 1 έως 5).* ***B.*** *Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου. Κάθε αριθμημένο βήμα στο (B) αντιστοιχεί στο αντίστοιχο βήμα του πίνακα (A) (οι αριθμοί σημειώνονται με κόκκινη γραμματοσειρά και στα δύο). Στο βήμα 1, το GST-GRP1 (PH) προσδένεται στη γλουταθειόνη που καλύπτει τα φρεάτια. Στο βήμα 2, απουσία PI3Kα (αρνητικός μάρτυρας), το πιάτο επωάζεται μόνο με b-PIP_3. Παρουσία PI3Kα, η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται αρχικά σε σωληνάρια (βήμα 2a), προστίθεται το b-PIP_3 μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (βήμα 2b), και το μείγμα τοποθετείται στα πηγαδάκια (βήμα 2c), όπου το παραγόμενο PIP_3 (από την PI3Kα) ανταγωνίζεται το b-PIP_3 (εξωγενώς προστιθέμενο) για τη δέσμευση στο GST-GRP1. Στη συνέχεια προστίθεται streptavidin-HRP (βήμα 3) για την ανίχνευση του δεσμευμένου b-PIP_3, και έπειτα προστίθεται το OPD (βήμα 4), υπόστρωμα της HRP, το οποίο παράγει χρωμοφόρο που μετριέται στα 492 nm (βήμα 5). Δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com.*

4.2 Βελτιστοποίηση της δοκιμασίας προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα

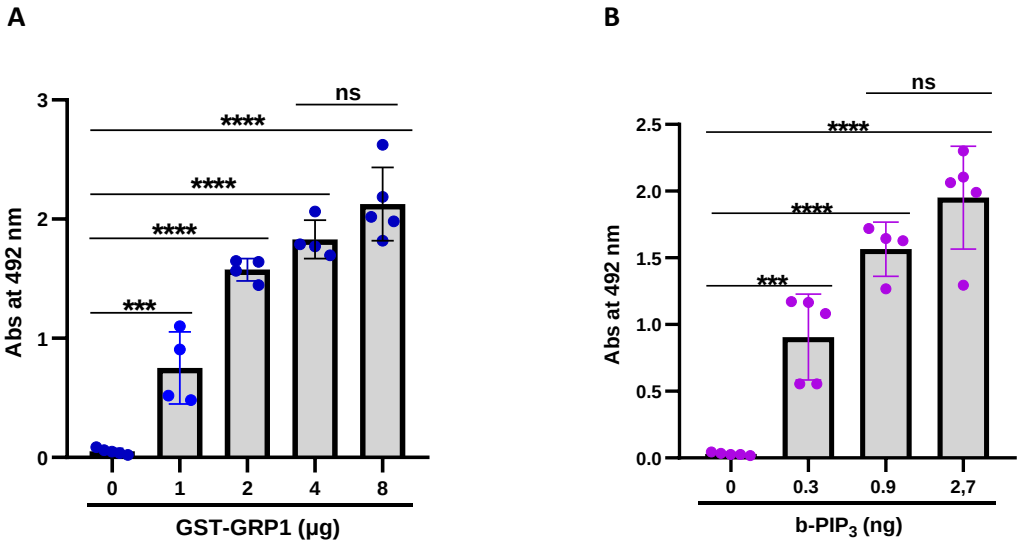
Για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση όλων των απαραίτητων αντιδραστηρίων και βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, με στόχο την ελαχιστοποίηση του θορύβου, τη μεγιστοποίηση της δυναμικής περιοχής απόκρισης (dynamic range) και την υψηλή εξειδίκευση.

Αρχικά, παρασκευάστηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη GST-GRP1 (PH), η οποία φέρει την περιοχή πρόσδεσης με το PIP_3, μέσω έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3), και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε σφαιρίδια γλουταθειόνης (Εικόνα 3.1). Η καθαρότητα της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με SDS-PAGE και χρώση Coomassie Blue, ενώ η μέση απόδοση ήταν περίπου 2 mg ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

Η βέλτιστη ποσότητα GST-GRP1 (PH) που απαιτείται για αξιόπιστη φασματοφωτομετρική ανίχνευση προσδιορίστηκε πειραματικά με δοκιμή αυξανόμενων ποσοτήτων πρωτεΐνης στα πηγαδάκια των πλακών, ακολουθούμενη από επωάσεις με b-PIP_3, streptavidin-HRP και μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας της HRP στα 492 nm. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2A (αριστερό γράφημα), η προσθήκη 4 μg GST-GRP1 ανά πηγαδάκι οδήγησε σε μέγιστο σήμα, ενώ περαιτέρω αύξηση σε 8 μg δεν συνδυάστηκε με στατιστικά σημαντική ενίσχυση του σήματος. Ως εκ τούτου, για όλα τα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 4 μg GST-GRP1 ανά πηγαδάκι.

Ακολούθως, αξιολογήθηκε η βέλτιστη ποσότητα του b-PIP_3, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή σήματος μέσω της αλληλεπίδρασής του με το GRP1. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.2B (δεξί γράφημα), η συνεχώς αυξανόμενη συγκέντρωση του b-PIP_3 προκάλεσε αύξηση της απορρόφησης, με τιμή κορεσμού να εμφανίζεται μεταξύ 0,9 και 2,7 ng. Η ποσότητα των 0,9 ng επιλέχθηκε ως βέλτιστη, καθώς εξασφαλίζει υψηλό και αναπαραγόμενο σήμα (~1,5), δεν υπερβαίνει τα όρια κορεσμού του αναγνώστη ELISA που χρησιμοποιήθηκε και δεν

παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών 0,9 και 2,7 ng. Επιπλέον, δεδομένου ότι η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ ενδογενούς (παραγόμενου από την PI3Kα) και εξωγενούς b-PIP_3 για πρόσδεση με το GRP1, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του b-PIP_3 θα απαιτούσε αναλογική αύξηση των υπολοίπων αντιδραστηρίων της αντίδρασης (PI3Kα και PIP_2), γεγονός που θα αύξανε σημαντικά το κόστος της δοκιμασίας, χωρίς να βελτιώνει ουσιαστικά την αποδοτικότητα ή ευαισθησία της.

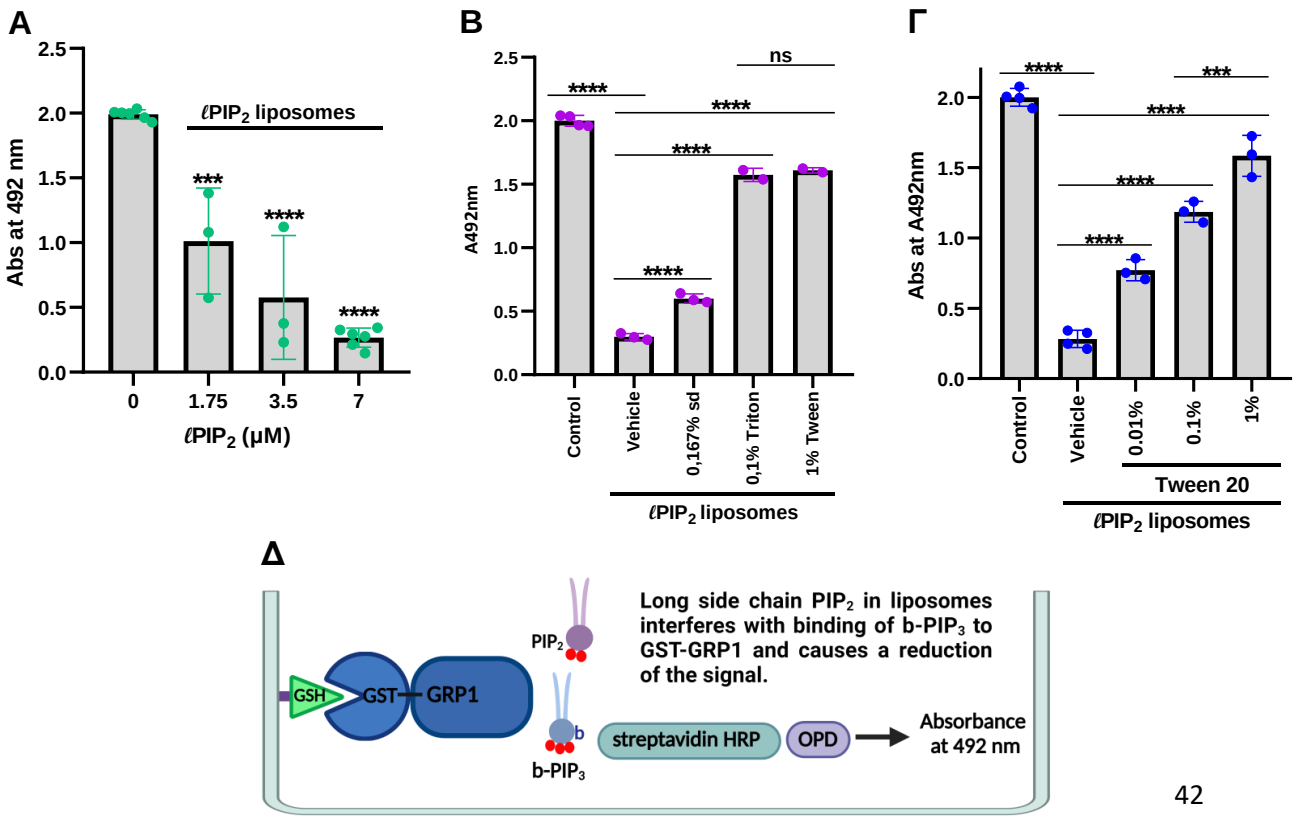


Εικόνα 4.2: Βελτιστοποίηση της ποσότητας GST-GRP1 και b-PIP_3 για τη μέγιστη δυναμική απόκριση της δοκιμασίας.
A. *Η βέλτιστη ποσότητα της πρωτεΐνης GST-GRP1 για τη δοκιμασία προσδιορίστηκε με δοκιμή αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αυτής, ακολουθούμενη από προσθήκη 0,9 ng b-PIP_3. Έγιναν συνολικά 5 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***B.*** *Η βέλτιστη ποσότητα του b-PIP_3 προσδιορίστηκε με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του φωσφολιπιδίου σε πηγάδια επικαλυμμένα με γλουταθειόνη, στα οποία είχε προηγηθεί επώαση με 4 μg GST-GRP1. Έγιναν συνολικά 5 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα. Τα επιμέρους σημεία στο διάγραμμα αντιστοιχούν στον μέσο όρο των διπλών δειγμάτων για κάθε ανεξάρτητο πείραμα. Η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ ομάδων εξετάστηκε με ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) και στη συνέχεια με δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey. ns: μη στατιστικά σημαντικό, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD).*

Στη συνέχεια επικεντρωθήκαμε στη βελτιστοποίηση του υποστρώματος της PI3Kα, το φωσφολιπίδιο PIP_2. Στις περισσότερες *in vitro* μελέτες χρησιμοποιείται η υδατοδιαλυτή του μορφή ($sPIP_2$), με κοντές πλευρικές αλυσίδες υδρογονανθράκων (diC8PtdIns(4,5)P_2) (74,99), καθώς είναι συμβατή με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Ωστόσο, θεωρήσαμε πως η προσομοίωση του φυσιολογικού μικροπεριβάλλοντος της ενζυμικής αντίδρασης - δηλαδή η παρουσία φωσφολιπιδίων ενσωματωμένων σε κυτταρικές μεμβράνες - θα προσέφερε μεγαλύτερη βιολογική εγκυρότητα. Για τον σκοπό αυτό, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ως υπόστρωμα τη λιπιδική μορφή του PIP_2 (ℓPIP_2), ενσωματωμένη σε ανασυσταθέντα λιποσώματα (ℓPIP_2 λιποσώματα). Τα λιποσώματα αυτά παρασκευάστηκαν με προσθήκη καθαρού ℓPIP_2

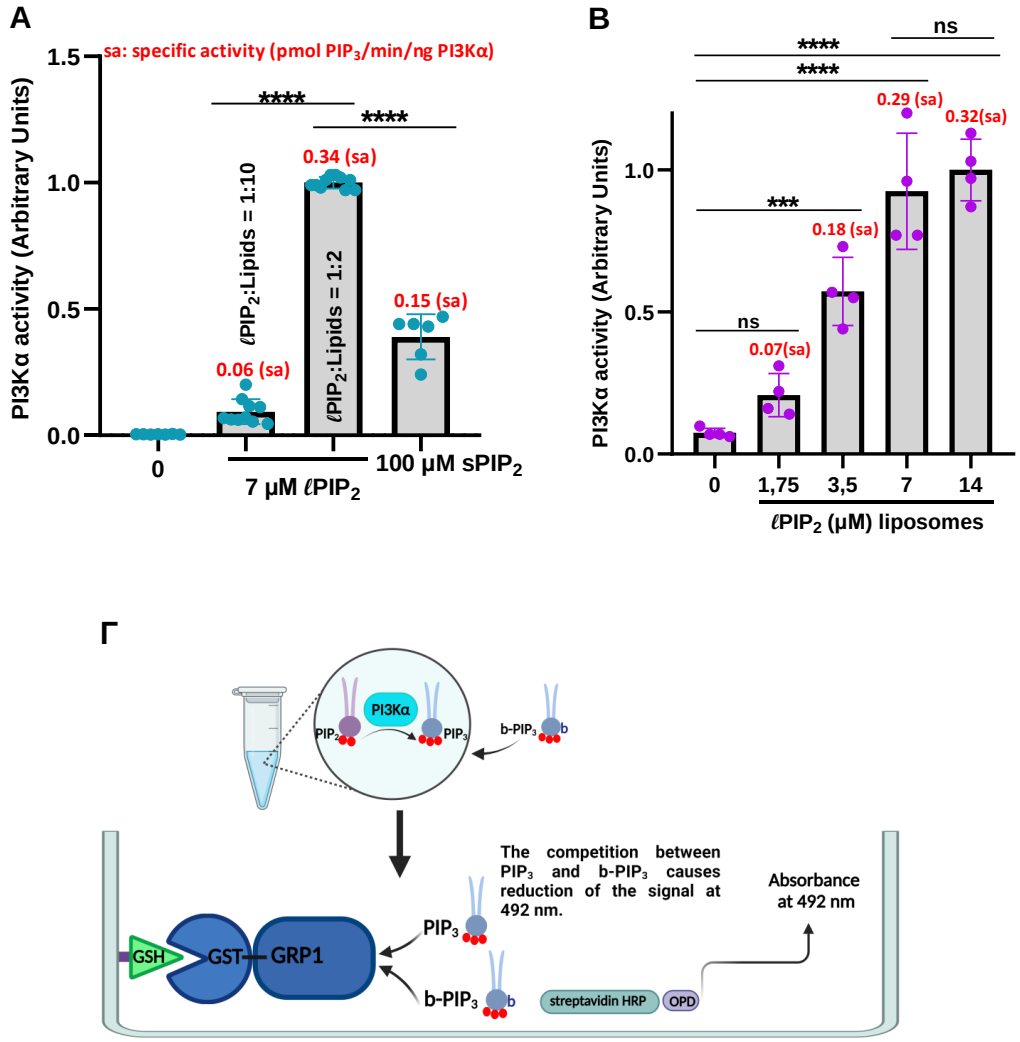
σε ολικά κυτταρικά λιπίδια που απομονώθηκαν από κύτταρα HCT116, μια καρκινική κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου που φέρει τη μεταλλαγή H1047R στο γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας της PI3Kα (*PIK3CA*) (100). Τα ℓPIP$_2$ λιποσώματα παρασκευάστηκαν υπό μορφή μικρών μονοστιβαδιακών κυστιδίων (small unilamellar vesicles SUVs), με τελική αναλογία ℓPIP$_2$ συνολικά λιπίδια είτε 1:10 είτε 1:2.

Αρχικά αξιολογήσαμε κατά πόσο το λιποσωμικό υπόστρωμα επηρεάζει τη δοκιμασία δέσμευσης του PIP$_3$ στην GRP1. Αν και η GRP1 έχει ~60 φορές υψηλότερη συγγένεια για το PIP$_3$ σε σύγκριση με το PIP$_2$ (96,97,101), το PIP$_2$ μπορεί επίσης να προσδεθεί στη GRP1 (101,102). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3Α, η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων ℓPIP$_2$ λιποσωμάτων προκάλεσε σημαντική δοσοεξαρτώμενη αναστολή του σήματος, γεγονός που υποδηλώνει παρεμβολή στην πρόσδεση του b-PIP$_3$ στην GST-GRP1 (PH). Για την άρση αυτής της παρεμβολής, εξετάσαμε την προσθήκη τριών απορρυπαντικών, πριν από την επώαση του μείγματος PIP$_3$/b-PIP$_3$, με το πιάτο στο οποίο είχε συνδεθεί η GST-GRP1 (PH): του ιοντικού (ανιονικού) sodium deoxycholate, καθώς και των μη ιοντικών Triton X-100 και Tween 20. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3Β, το sodium deoxycholate αποδείχθηκε αναποτελεσματικό, ενώ το Triton X-100 και το Tween 20 εξουδετέρωσαν πλήρως την ανασταλτική δράση των ℓPIP$_2$ λιποσωμάτων, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση (βλ. Εικόνα 4.3Γ). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, σε όλες τις επόμενες ενζυμικές δοκιμασίες για την PI3Kα προσθέταμε 1% Tween 20, μετά την ολοκλήρωση της ενζυμικής αντίδρασης, μαζί με την προσθήκη του b-PIP$_3$ και στη συνέχεια το μείγμα επωαζόταν με τις πλάκες που περιείχαν την GST-GRP1, όπως απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 4.3Δ.



Εικόνα 4.3: Τα ℓPIP$_2$ λιποσώματα παρεμποδίζουν τη πρόσδεση του b-PIP$_3$ με την GRP1.
A. *Η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ℓPIP$_2$ λιποσωμάτων (1.75 έως 7 μM) οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση του σήματος απορρόφησης στα 492 nm, υποδηλώνοντας παρεμβολή στη δέσμευση του b-PIP$_3$ στην GST-GRP1. Έγιναν συνολικά 6 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***B.*** *Τρία απορρυπαντικά — 0,1% Triton X-100, 1% Tween-20 ή 0,167% sodium deoxycholate — χρησιμοποιήθηκαν για την εξουδετέρωση της αναστολής του ℓPIP$_2$ στη δοκιμασία. Κάθε απορρυπαντικό προστέθηκε στο μείγμα ℓPIP$_2$/b-PIP$_3$, και στη συνέχεια επωάστηκε με τα φρεάτια που περιείχαν την GST-GRP1. Η δοκιμασία συνεχίστηκε με την προσθήκη HRP και OPD, όπως περιγράφεται στο (Δ). Σημειώνεται ότι από τα τρία απορρυπαντικά, το πολικό sodium deoxycholate ήταν αναποτελεσματικό, ενώ τα μη πολικά Triton X-100 και Tween-20 εξουδετέρωσαν την ανασταλτική επίδραση του ℓPIP$_2$. Έγιναν συνολικά 4 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***Γ.*** *Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του Tween-20, ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη ποσότητα που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ανασταλτικής δράσης του υποστρώματος ℓPIP$_2$. Έγιναν συνολικά 4 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***Δ.*** *Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε στα (Α), (Β) και (Γ) (δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com).*
*Τα επιμέρους σημεία που εμφανίζονται αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των διπλών δειγμάτων σε κάθε πείραμα. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων εξετάστηκε με ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) και επακόλουθη δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey. ns: μη σημαντικό, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD).*

Στη συνέχεια, με στόχο την βελτιστοποίηση της σύστασης των λιποσωμάτων, διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών αναλογιών μεταξύ του ℓPIP$_2$ και των συνολικών λιπιδίων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι αναλογίες 1:2 και 1:10, διατηρώντας την ίδια τελική συγκέντρωση ℓPIP$_2$ (7 μM) στο μείγμα των αντιδράσεων, ώστε να καταστεί δυνατή η άμεση σύγκριση μεταξύ των δύο συνθηκών. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.4Α, η ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη όταν χρησιμοποιήθηκε η χαμηλότερη αναλογία ℓPIP$_2$ σε σχέση με τα λιπίδια (1:10), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ενεργότητας όταν χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1:2.



Εικόνα 4.4: Προσδιορισμός και τιτλοδότηση της βέλτιστης μορφής του υποστρώματος PIP₂.

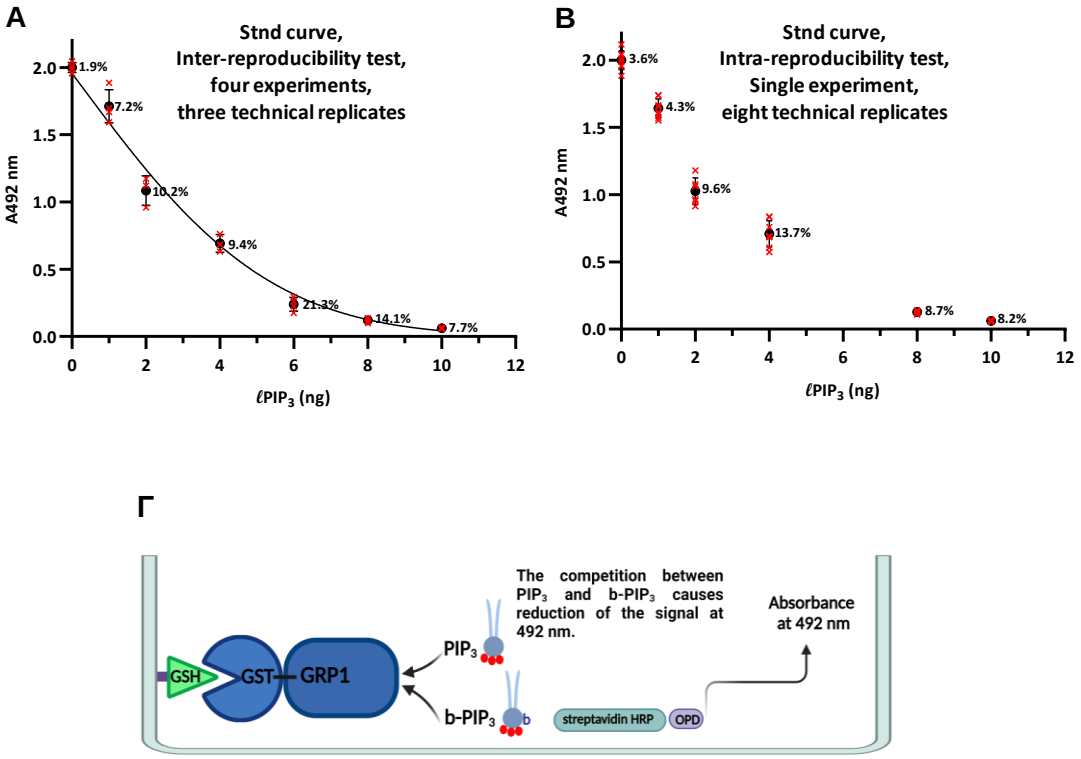
Α. *Η βέλτιστη μορφή του υποστρώματος προσδιορίστηκε συγκρίνοντας δύο διαφορετικές αναλογίες του ℓPIP₂ προς τα συνολικά λιπίδια, 1:10 και 1:2, με κοινή τελική συγκέντρωση ℓPIP₂ 7 μM. Επίσης, δοκιμάστηκε και η υδατοδιαλυτή μορφή του PIP₂ (sPIP₂) σε συγκέντρωση 100 μM. Επιλέχθηκαν τα λιποσώματα με αναλογία 1:2 μεταξύ ℓPIP₂ και συνολικών λιπιδίων. Έγιναν συνολικά 10 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***Β.*** *Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ℓPIP₂ (με αναλογία 1:2 ως προς τα συνολικά λιπίδια). Παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας, έως τα 7 μM, πέραν των οποίων το σήμα παρουσιάζει τάση κορεσμού χωρίς στατιστικά σημαντική περαιτέρω αύξηση. Έγιναν συνολικά 4 ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***Γ.*** *Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε στα (Α) και (Β) (δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com).*

*Τα επιμέρους σημεία που απεικονίζονται στα γραφήματα αντιστοιχούν στους μέσους όρους των διπλών δειγμάτων κάθε πειράματος. Οι τιμές ειδικής ενεργότητας της PI3Kα υπολογίστηκαν ως pmol PIP₃ που παράγονται ανά λεπτό ανά νανογραμμάριο (ng) ενζύμου και επισημαίνονται με κόκκινη γραμματοσειρά στο σχήμα. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ ομάδων αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) και επακόλουθη δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων του Tukey. ns: μη στατιστικά σημαντικό, ****$p < 0.0001$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD.*

Για λόγους σύγκρισης, εξετάστηκε επιπλέον η ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα με χρήση της υδατοδιαλυτής μορφής του PIP_2 ($sPIP_2$). Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση $sPIP_2$ δεκατετραπλάσια εκείνης του ℓPIP_2, η καταλυτική δραστικότητα ήταν σημαντικά μειωμένη, γεγονός που υποδεικνύει ότι το $sPIP_2$ αποτελεί σαφώς υποδεέστερο υπόστρωμα. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την άποψη ότι η αλληλεπίδραση της PI3Kα με τη μεμβράνη είναι κρίσιμη για την ενζυμική της απόδοση, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (103). Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα, επιλέχθηκε η αναλογία ℓPIP_2:λιπίδια = 1:2 για όλα τα επόμενα πειράματα.

Προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη τελική συγκέντρωση του ℓPIP_2 στην αντίδραση, μελετήθηκε η δράση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του υποστρώματος (1.75, 3.5, 7 και 14 μM). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.4B, παρατηρήθηκε δοσοεξαρτώμενη αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας μέχρι και τα 7 μM. Σε υψηλότερη συγκέντρωση (14 μM), η αύξηση του σήματος παρουσίασε τάση κορεσμού και δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την τιμή των 7 μM. Συνεπώς, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 7 μM ως η βέλτιστη, δεδομένου ότι προσφέρει ικανοποιητικό σήμα με σαφή καταγραφή της ενζυμικής δραστικότητας.

Τέλος, για την ποσοτική εκτίμηση της σχετικής δραστικότητας της PI3Kα, κατασκευάσαμε μια πρότυπη καμπύλη «απορρόφηση έναντι PIP_3» (Εικόνα 4.5A), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική εκτίμηση του προϊόντος PIP_3 και τον υπολογισμό της ενεργότητας της PI3Kα σε όλα τα πειράματα. Η καμπύλη εμφανίζει υπερβολικό προφίλ, χαρακτηριστικό των μεθόδων ανταγωνισμού, όπου ο ανταγωνιστής PIP_3 εκτοπίζει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο τον αγωνιστή b-PIP_3 από το GST-GRP1 (Εικόνα 4.5A και B). Για την περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου εκτιμήσαμε την επαναληψιμότητα της, ενδο- και δια-πειραματικά, καθώς και την ευαισθησία της, υπολογίζοντας τον συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient of Variation). Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV% = SD/μέση τιμή × 100) είναι ένα μέτρο που καταδεικνύει πόσο μεγάλη είναι η διασπορά των δεδομένων σε σχέση με τη μέση τιμή και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας και της μεταβλητότητας μιας μεθόδου, τόσο μεταξύ πειραμάτων (δια-πειραματικά) όσο και εντός του ίδιου πειράματος (ενδο-πειραματικά). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.5A–B, οι τιμές του %CV παραμένουν εντός των αποδεκτών ορίων (%CV ≤ 20% δια-πειραματικά και %CV ≤ 15% ενδο-πειραματικά), γεγονός που καταδεικνύει ότι η μέθοδος είναι αξιόπιστη και επαναλήψιμη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων PIP_3. Επιπλέον, η ανάλυση ευαισθησίας έδειξε κατώτερο όριο ανίχνευσης 1 ng PIP_3, αναδικνύοντας την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η μέθοδος είναι τόσο επαναλήψιμη όσο και ευαίσθητη, καθιστώντας την κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικότητας της λιποκινάσης PI3Kα.



Εικόνα 4.5. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση του PIP_3 και αξιολόγηση της επαναληψιμότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου:

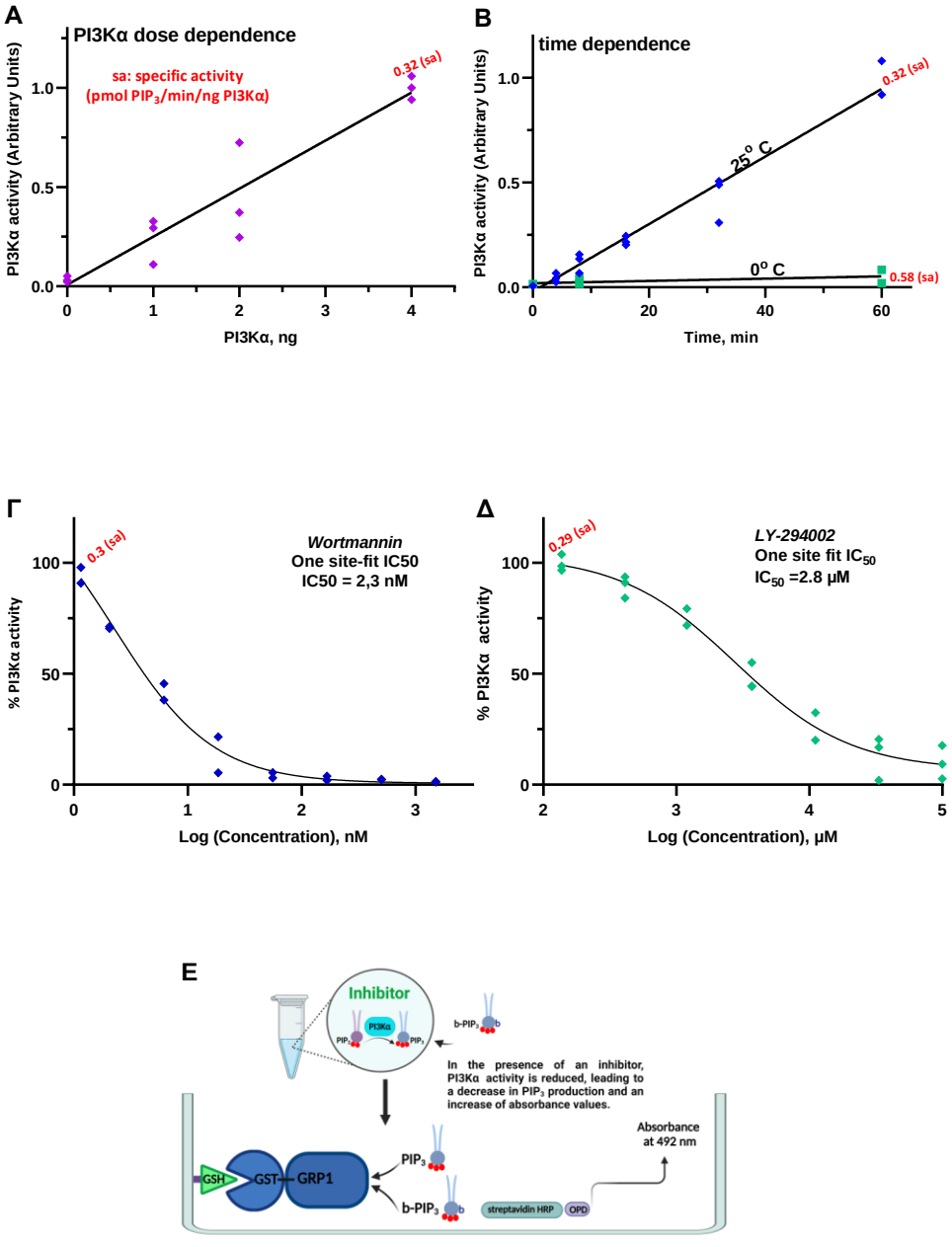
Α. *Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας μεταξύ δοκιμασιών (inter-assay) και της ευαισθησίας της μεθόδου, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (Abs έναντι ng PIP_3) από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα, με τρεις τεχνικές επαναλήψεις ανά συγκέντρωση PIP_3. Για κάθε σημείο υπολογίστηκε ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV% = SD/μέση τιμή × 100), ο οποίος είναι μέτρο σχετικής διασποράς που εκφράζει την τυπική απόκλιση ως ποσοστό της μέσης τιμής και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας και της μεταβλητότητας μεταξύ πειραμάτων ή μεταξύ τεχνικών επαναλήψεων. Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε με υπολογισμό της απορρόφησης (Abs) της ελάχιστης ανιχνεύσιμης ποσότητας PIP_3 σύμφωνα με τον τύπο: Abs = μέση τιμή blank − 3 × SD blank, που έδωσε την τιμή Abs = 1,73. Βάσει της πρότυπης καμπύλης, η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε 1 ng PIP_3, το οποίο ορίζεται ως το κατώτερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD) μεταξύ των ανεξάρτητων πειραμάτων. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του PIP_3 που παράγεται στις δοκιμασίες ενεργότητας της PI3Kα. Η ανάλυση των σημείων πραγματοποιήθηκε με μη γραμμική παλινδρόμηση (Gaussian).*

Β. *Η επαναληψιμότητα εντός του ίδιου πειράματος (intra-assay) αξιολογήθηκε με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης βασισμένη από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα, με οκτώ τεχνικές επαναλήψεις ανά συγκέντρωση PIP_3. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) υπολογίστηκε για κάθε σημείο και απεικονίζει τη διακύμανση εντός του ίδιου πειράματος. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD) των επαναλήψεων. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από συνολικά τρία ανεξάρτητα πειράματα.*

Γ. *Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στα (Α) και (Β), όπου απεικονίζεται ο ανταγωνισμός μεταξύ μη επισημασμένου (καθαρού) PIP_3 και βιοτινυλιωμένου PIP_3 (b-PIP_3) για τη πρόσδεση με το GST-GRP1 (δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com).*

4.3 Επαλήθευση της εξειδίκευσης της μεθόδου

Για την επαλήθευση της εξειδίκευσης της μεθόδου, αρχικά επιβεβαιώθηκε ότι αυτή εμφανίζει τα βασικά χαρακτηριστικά που διέπουν τις ενζυμικές αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, επιβεβαιώσαμε ότι η αντίδραση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου (βλέπε Εικόνα 4.6Α), καθώς και από τον χρόνο και τη θερμοκρασία της αντίδρασης (βλέπε Εικόνα 4.6Β). Επιπλέον, αξιολογήθηκε η ανασταλτική ικανότητα δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων αναστολέων της PI3Kα, των Wortmannin και LY-294002 (104,105). Πράγματι, οι τιμές IC_{50} προσδιορίστηκαν σε 2,3 nM και 2,8 μM, αντίστοιχα (Εικόνες 4.6Γ και 4.6Δ), σε συμφωνία με προηγουμένως δημοσιευμένα δεδομένα (78). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την αξιοπιστία και εξειδίκευση της μεθόδου για την ποσοτικοποίηση της ενζυμικής δραστικότητας της PI3Kα.



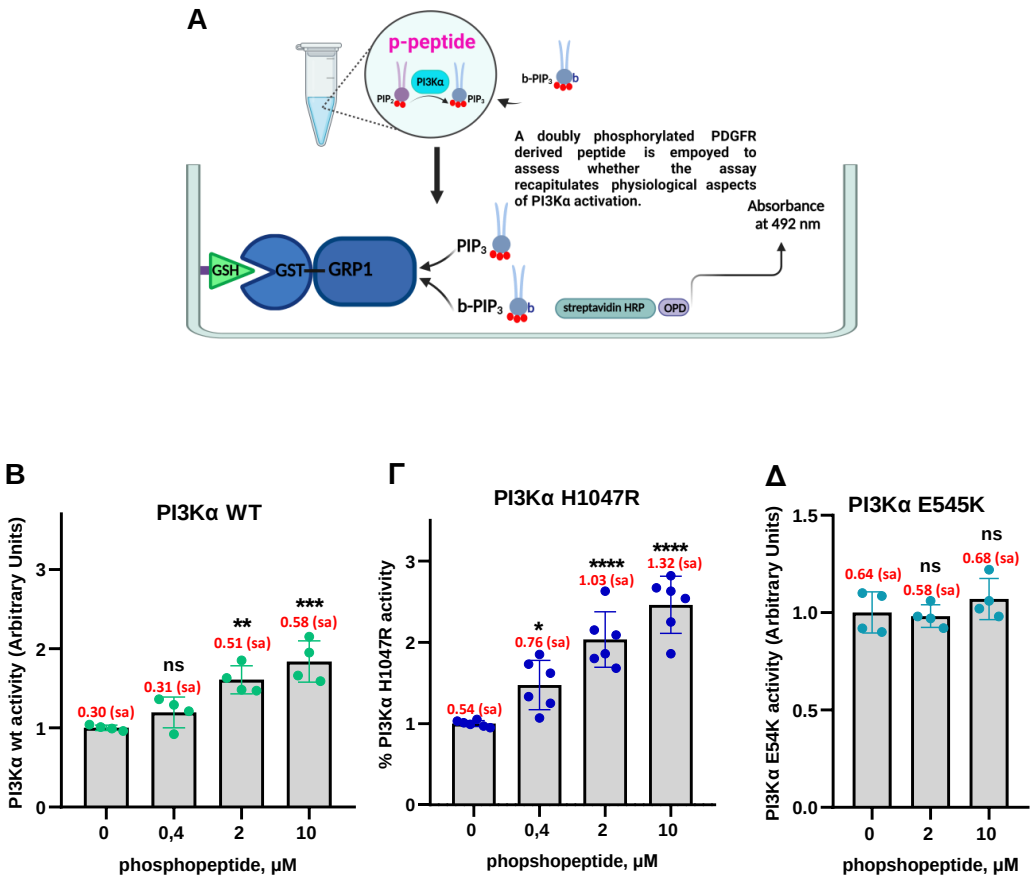
Εικόνα 4.6 Επαλήθευση της εξειδίκευσης της μεθόδου.
Α*. Για την αξιολόγηση της εξάρτησης της καταλυτικής αντίδρασης από την ποσότητα του ενζύμου, τα μείγματα της αντίδρασης της PI3Kα παρασκευάστηκαν με επώαση διαφορετικών ποσοτήτων του ενζύμου με 7 μM d-PIP_2, στους 25°C για 16 λεπτά. Το τελικό μίγμα προστέθηκε σε πιάτα 96-πηγαδιών μαζί με b-PIP_3 και υποβλήθηκε σε περαιτέρω επεξεργασία όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.*
Β. *Για τη μελέτη της χρονικής εξάρτησης της ενζυμικής αντίδρασης, το μείγμα παρασκευάστηκε όπως στο (Α), με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση του ενζύμου παρέμεινε σταθερή (4 ng), ενώ ο χρόνος επώασης μεταβλήθηκε από 4 έως 60 λεπτά. Εξετάστηκε επίσης η εξάρτηση της αντίδρασης από τη θερμοκρασία, συγκρίνοντας την πρόοδό της στους 25°C και στους 0°C. Έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.* ***Γ και Δ.*** *Προσδιορισμός των τιμών IC_{50} για τους καθιερωμένους αναστολείς της PI3Kα, Wortmannin (**Γ**) και LY294002 (**Δ**). Τα επιμέρους στάδια της αντίδρασης απεικονίζονται σχηματικά στο (**Ε**). Έγιναν δύο ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα στο (Γ), και τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα στο (Δ). Τα επιμέρους σημεία των διαγραμμάτων αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των επαναλήψεων για κάθε ανεξάρτητο πείραμα. Οι τιμές ειδικής ενεργότητας της PI3Kα υπολογίστηκαν ως pmol PIP_3 που παράγονται ανά λεπτό ανά νανογραμμάριο (ng) ενζύμου και επισημαίνονται με κόκκινη γραμματοσειρά στο σχήμα.* ***Ε.*** *Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους βημάτων της ενζυμικής αντίδρασης της PI3Kα παρουσία αναστολέα (δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com). Ο πιθανός αναστολέας επωάζεται πρώτα με το ένζυμο PI3Kα για 10 λεπτά στους 25°C. Στη συνέχεια, ξεκινά η αντίδραση με την προσθήκη d-PIP_2 λιποσωμάτων και το μείγμα επωάζεται για επιπλέον 10 λεπτά στους 25°C, πριν τερματιστεί η αντίδραση. Η περαιτέρω επεξεργασία ακολουθεί όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα δεδομένα στα (Α) και (Β) αναλύθηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση (πολυώνυμο πρώτης τάξης – ευθεία γραμμή). Οι τιμές IC_{50} στα (C) και (D) υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση (μοντέλο ανταγωνιστικής πρόσδεσης).*

Τέλος, διερευνήσαμε κατά πόσο οι πειραματικές συνθήκες της μεθόδου που αναπτύξαμε αναπαριστούν τον φυσιολογικό μηχανισμό ενεργοποίησης της PI3Kα μέσω φωσφορυλιωμένων υποδοχέων κινασών τυροσίνης. Στο σύμπλοκο της PI3Kα, η ρυθμιστική υπομονάδα p85α αναστέλλει τη δράση της καταλυτικής υπομονάδας p110α μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης. Μετά τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων κινασών τυροσίνης, αυτοί αλληλεπιδρούν με την δομική περιοχή nSH2 της p85α, γεγονός που διαταράσσει τη σύνδεσή της με την p110α και οδηγεί στην καταλυτική ενεργοποίηση του ενζύμου (7).

Ο μηχανισμός αυτός ισχύει τόσο για τον φυσιολογικό (WT) τύπο της PI3Kα (106), όσο και για τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R, ενώ δεν παρατηρείται στη μεταλλαγή E545K. Η διαφορετική συμπεριφορά των δύο μεταλλαγμένων μορφών της PI3Kα είναι γνωστή στη βιβλιογραφία (74,106) και αντανακλά διαφορετικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης. Συγκεκριμένα, τόσο η φυσιολογικού τύπου PI3Kα όσο και η μεταλλαγμένη μορφή H1047R απαιτούν τη πρόσδεση με φωσφορυλιωμένους υποδοχείς κινασών τυροσίνης για την πλήρη ενεργοποίησή τους. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της μορφής E545K δεν εξαρτάται από αυτή τη πρόσδεση, καθώς η συγκεκριμένη μεταλλαγή αναιρεί την ανασταλτική δράση της p85α, οδηγώντας σε ιδιοσυστατική (constitutive) ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας(63,66,67,74).

Για να εξετάσουμε αν οι πειραματικές μας συνθήκες αποτυπώνουν αυτόν τον ρυθμιστικό μηχανισμό για τις διάφορες μορφές της PI3Kα (WT και μεταλλαγμένες), μελετήσαμε την επίδραση ενός διπλά φωσφορυλιωμένου πεπτιδίου, προερχόμενου από τον υποδοχέα αιμοπεταλικού αυξητικού παράγοντα (PDGFR) με αλληλουχία **ESDGGY*MDMSKDESIDY*YPMLDMKGDIKYADIE.** Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7Β-Δ, η αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφοπεπτιδίου του PDGFR οδήγησε σε ενίσχυση της ενζυμικής δραστικότητας τόσο της φυσιολογικής όσο και της H1047R μορφής της PI3Kα. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη μορφή E545K, όπως αναμενόταν (63,66,74).

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η μέθοδος που αναπτύξαμε αναπαράγει με πιστότητα τη φυσιολογική ενζυμική λειτουργία της PI3Kα στις κυτταρικές μεμβράνες (107).



Εικόνα 4.7 Η μέθοδος αναπαράγει τη φυσιολογική, εξαρτώμενη από υποδοχείς ενεργοποίηση της PI3Kα.

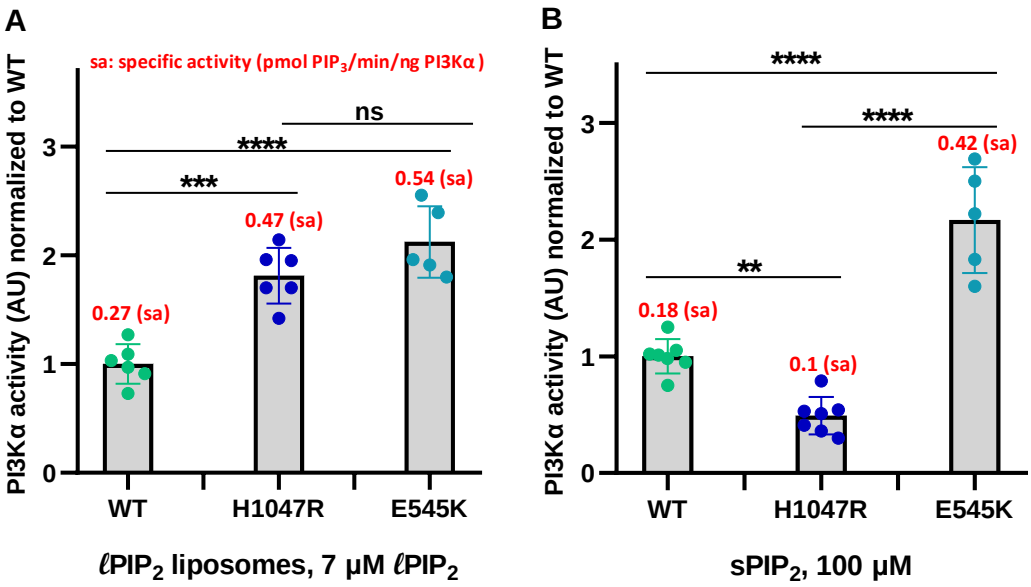
*Α. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της ενζυμικής αντίδρασης της PI3Kα παρουσία ενός πεπτιδίου προερχόμενου από τον PDGFR, το οποίο φέρει δύο φωσφορυλιωμένες τυροσίνες: ESDGGY*MDMSKDESIDY*YPMLDMKGDIKYADIE (ο αστερίσκος δηλώνει τις φωσφορυλιωμένες θέσεις) (δημιουργήθηκε με τη χρήση του BioRender.com). Διάφορες ποσότητες του φωσφοπεπτιδίου προ-επωάστηκαν για 10 λεπτά στους 25°C με τις διαφορετικές μορφές της PI3Kα· τη φυσιολογική (WT) στο (**Β**), τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R στο (**Γ**), και τη μεταλλαγμένη μορφή E545K στο (**Δ**), πριν την εκκίνηση των αντιδράσεων της PI3Kα, οι*

*οποίες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Έγιναν τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα στο (Β) και (Δ) και έξι ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα στο (Γ). Τα επιμέρους σημεία δεδομένων που απεικονίζονται αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των τριπλών δειγμάτων για κάθε ανεξάρτητο πείραμα. Οι τιμές ειδικής ενεργότητας της PI3Kα υπολογίστηκαν ως pmol PIP_3 που παράγονται ανά λεπτό ανά νανογραμμάριο (ng) ενζύμου και επισημαίνονται με κόκκινη γραμματοσειρά στο σχήμα. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων εξετάστηκε με ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey.ns: μη σημαντικό, *p < 0.05, **p < 0.01. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (SD).*

4.4 Ο ρόλος της μεμβράνης στην υπερενεργοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της PI3Kα

Στη συνέχεια αξιοποιήσαμε την πιο πάνω μεθοδολογία για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της PI3Kα. Αν και είναι αδιαμφισβήτητο ότι το ογκογόνο δυναμικό των μεταλλάξεων σε "hot-spot" θέσεις αποδίδεται στην ικανότητά τους να ενισχύουν τη καταλυτική δραστικότητα της PI3Kα (48,59,60), η συμβολή της λιπιδικής μεμβράνης σε αυτήν την υπερενεργοποίηση δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί.

Για να διερευνήσουμε αυτό το ερώτημα, αξιοποιήσαμε τη μέθοδό μας, προκειμένου να εξετάσουμε εάν οι μεμβράνες καθαυτές συμβάλλουν στην υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της PI3Kα. Συγκεκριμένα, συγκρίναμε την καταλυτική δραστικότητα της φυσιολογικής (WT) PI3Kα και των δύο συχνότερων ογκογόνων παραλλαγών της, H1047R και E545K, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα είτε ℓPIP_2 ενσωματωμένο σε μεμβρανικά λιποσώματα υπόστρωμα (λιποσώματα ℓPIP_2) είτε υδατοδιαλυτό PIP_2 ($sPIP_2$).



Εικόνα 4.8. Ο ρόλος των μεμβρανών στην υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών H1047R και E545K

*Συγκρίνεται η ενζυμική δραστικότητα της PI3Kα για τις μορφές H1047R, E545K και την WT (φυσιολογική), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα είτε 7 μM μεμβρανικό PIP_2 (ℓPIP_2) (**A**) είτε*

*100 μM υδατοδιαλυτό PIP_2 (sPIP_2) (**B**). Οι τιμές δραστικότητας των μεταλλαγμένων μορφών κανονικοποιήθηκαν ως προς τη WT, η οποία τέθηκε ως αναφορά (τιμή "1"). Παρατηρείται ότι η E545K εμφανίζει σημαντικά αυξημένη δραστικότητα συγκριτικά με τη WT τόσο παρουσία μεμβρανικού όσο και υδατοδιαλυτού PIP_2, ενώ η H1047R παρουσιάζει αύξηση μόνο όταν χρησιμοποιείται μεμβρανικό υπόστρωμα. Στο (A) πραγματοποιήθηκαν έξι ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα και στο (B) επτά. Τα επιμέρους σημεία δεδομένων αντιστοιχούν στους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων στα γραφήματα (A) και (B) αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Tukey. ns: μη στατιστικά σημαντικό, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD).*
Οι τιμές ειδικής δραστικότητας της PI3Kα, εκφρασμένες ως pmol PIP_3 που παράγονται ανά λεπτό ανά νανογραμμάριο ενζύμου, αναγράφονται με κόκκινη γραμματοσειρά στο σχήμα.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.8A, όταν χρησιμοποιήθηκαν **ℓ**PIP_2 λιποσώματα ως υπόστρωμα, και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της PI3Kα εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με την WT. Αντίθετα, παρουσία του υδατοδιαλυτού sPIP_2, μόνο η E545K παρουσίασε αυξημένη δραστικότητα συγκριτικά με την φυσιολογική μορφή του ενζύμου, ενώ, αξιοσημείωτα, η H1047R εμφάνισε μειωμένη δραστικότητα υπό τις ίδιες συνθήκες (ίση ποσότητα ενζύμου) (Εικόνα 4.8B). Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η λιπιδική διπλοστιβάδα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην υπερενεργοποίηση της μεταλλαγμένης μορφής H1047R, ενώ δεν φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αντίστοιχη υπερενεργοποίηση της E545K.

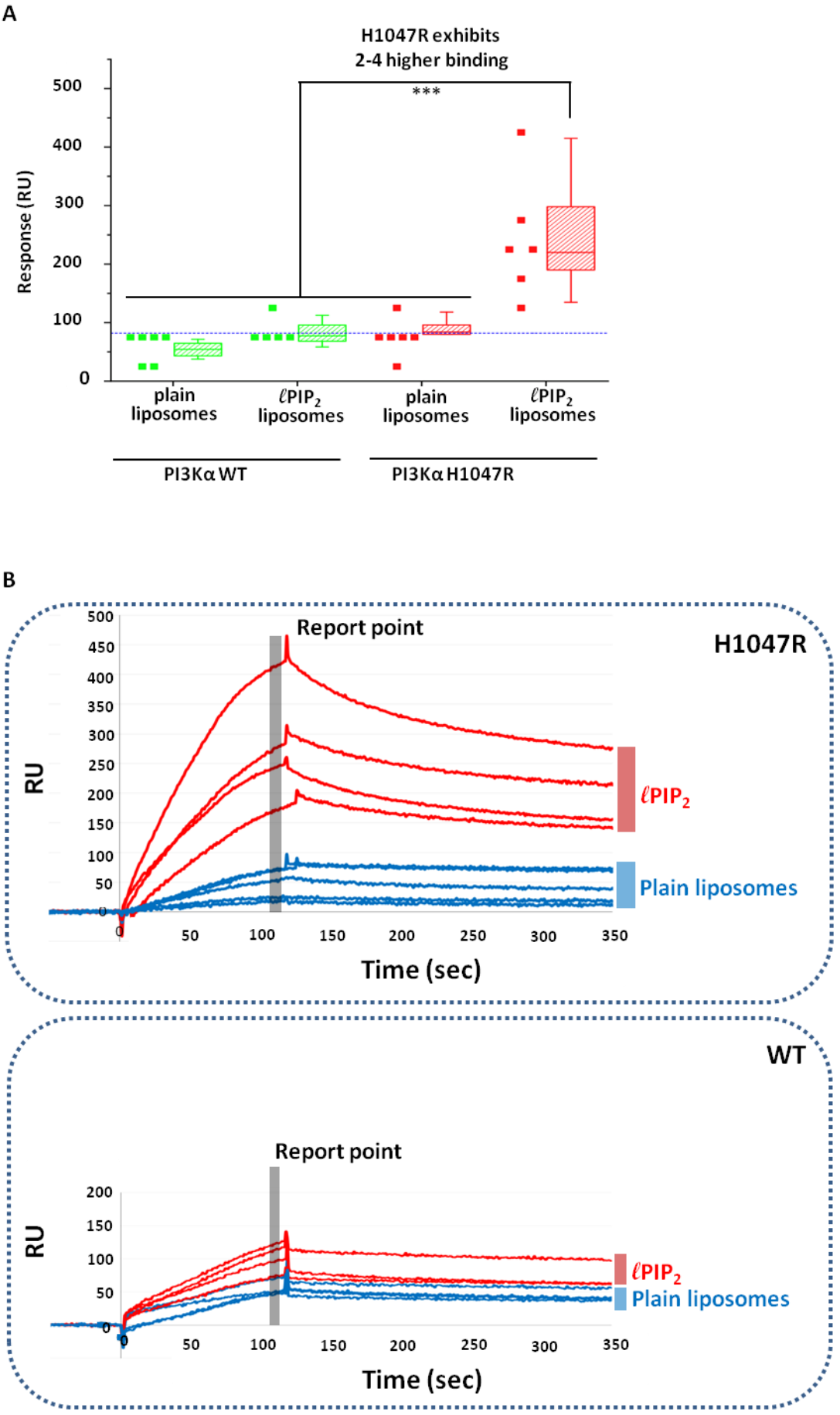
4.5 Η μεταλλαγή H1047R αυξάνει τον ρυθμό πρόσδεσης της PI3Kα στη μεμβράνη, σύμφωνα με πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο η ογκογόνος μεταλλαγή H1047R της PI3Kα επηρεάζει την αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη μεμβράνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (**S**urface **P**lasmon **R**esonance, SPR). Συγκεκριμένα, συγκρίθηκε η κινητική πρόσδεσης της φυσιολογικής (WT) και της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της PI3Kα σε λιποσώματα παρασκευασμένα από λιπιδικά εκχυλίσματα κυττάρων HCT116, παρουσία ή απουσία του φωσφολιπιδίου **ℓ**PIP_2. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο σύστημα βιοαισθητήρα, επιτρέποντας την άμεση και αξιόπιστη σύγκριση των δύο πρωτεϊνικών μορφών υπό πανομοιότυπες πειραματικές συνθήκες.

Η ποσοτικοποίηση των μονάδων απόκρισης (RU) στο τέλος της φάσης πρόσδεσης (association phase) έδειξε ότι η μεταλλαγμένη μορφή H1047R παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη μεμβρανική πρόσδεση συγκριτικά με τη WT PI3Kα, εμφανίζοντας 2–4 φορές υψηλότερα επίπεδα πρόσδεσης για ισομοριακές συγκεντρώσεις ενζύμου (Εικόνα 4.9A). Επιπλέον, κινητική ανάλυση της αλληλεπίδρασης με λιποσώματα εμπλουτισμένα σε **ℓ**PIP_2 αποκάλυψε πως η H1047R

παρουσιάζει περίπου διπλάσια σταθερά ταχύτητας πρόσδεσης (K_{on}) συγκριτικά με τη φυσιολογική μορφή (Σχήμα 4.9B, Πίνακας 4.1). Ειδικότερα, η τιμή K_{on} για τη H1047R προσδιορίστηκε σε $2.44 \pm 0.46 \times 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, έναντι $1.13 \pm 0.05 \times 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ για τη WT PI3Kα, διαφορά που κρίθηκε στατιστικά σημαντική βάσει ανάλυσης ANOVA ($p < 0.0103$).

Παρότι η αυξημένη τιμή K_{on} υποδηλώνει ενισχυμένη ικανότητα αρχικής πρόσδεσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στη μεμβράνη, παρατηρήθηκε ταυτόχρονα και αύξηση της σταθεράς αποδέσμευσης (K_{off}) της H1047R σε σχέση με τη WT μορφή (9.41×10^{-4} s^{-1} έναντι 3.6×10^{-4} s^{-1}, αντίστοιχα). Ως αποτέλεσμα, οι τιμές της σταθεράς ισορροπίας διάστασης (K_D) παρέμειναν παρόμοιες μεταξύ των δύο μορφών της PI3Kα, με τιμές 3.99 ± 0.75 nM για τη H1047R και 3.19 ± 0.15 nM για τη WT πρωτεΐνη (Πίνακας 4.1).



Σχήμα 4.9. Ανάλυση SPR της αλληλεπίδρασης των PI3Kα H1047R και WT με τη μεμβράνη.

A. *Ποσοτικοποίηση των μονάδων απόκρισης (RU) στο σημείο καταγραφής (φάση πρόσδεσης) καταδεικνύει ότι η H1047Rπαρουσιάζει κατά μέσο όρο 2-4 φορές υψηλότερη πρόσδεση με λιποσώματα, σε σύγκριση με το φυσιολογικό ένζυμο (WT), με την αλληλεπίδραση να εξαρτάται από την παρουσία* PIP_2

B. *Αντιπροσωπευτικά αισθηγράμματα (sensorgrams) από πειράματα SPR καταγράφουν τη πρόσδεση του H1047R και του WT PI3Kα με λιποσώματα παρουσία και απουσία* PIP_2*. Τα δεδομένα αποκτήθηκαν υπό ίδιες πειραματικές συνθήκες και με χρήση των ίδιων αντιδραστηρίων, στον ίδιο αισθητήρα βιοτσίπ.*

Πίνακας 4.1. Κινητικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης PI3Kα με λιποσώματα εμπλουτισμένα σε PIP_2

Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων (K_{on}*,* K_{off} *και* K_D*) προέκυψαν από ποσοτική ανάλυση των καμπυλών πρόσδεσης (sensorgrams) των πειραμάτων SPR, τα οποία αξιολογούν τη δέσμευση της PI3Kα (WT και H1047R) σε λιποσώματα που περιέχουν* PIP_2*. Η προσαρμογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε βάσει του μοντέλου 1:1 αλληλεπίδρασης, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι».*

Protein	**K_{on} ± SEM (10^5 M^{-1} s^{-1})**	**K_{off} ± SEM (10^{-4} s^{-1})**	**Rmax ± SEM (RU)**	**K_D ± SEM (10^{-9} M)**
PI3Kα WT	1.13 ± 0.05*	3.6 ± 0.1	144 ± 21.4	3.19 ± 0.15
PI3Kα H1047R	2.44 ± 0.46*	9.41 ± 0.01	296 ± 38.0	3.99 ± 0.75

Για να εκτιμηθεί η λειτουργική σημασία των παραπάνω κινητικών διαφορών ως προς την ενζυμική απόδοση της PI3Kα, συσχετίστηκε η καταλυτική αποδοτικότητα του ενζύμου (K_{cat}/K_m) με τις κινητικές παραμέτρους πρόσδεσης και αποδέσμευσης, με βάση την παρακάτω σχέση:

$$\frac{\mathbf{K}\text{cat}}{\mathbf{K}\text{m}} = \frac{\mathbf{K}\text{cat}}{\left(\frac{\mathbf{K}\text{off} + \mathbf{K}\text{cat}}{\mathbf{K}\text{on}}\right)} \qquad \text{(Εξίσωση 1)}$$

Για την απλοποίηση στην πιο πάνω εξίσωσης, υπολογίσαμε την τιμή της K_{cat} χρησιμοποιώντας τις τιμές της ειδικής ενεργότητας που προσδιορίστηκαν πειραματικά. Δεδομένου ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες κορεσμού του υποστρώματος, η ειδική ενεργότητα (specific activity) θεωρήθηκε ότι αντιστοιχεί σε τιμές μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Οι τιμές του K_{cat} υπολογίστηκαν μετά από μετατροπή της ποσότητας του ενζύμου από ng σε mol ενεργού ενζύμου, σύμφωνα με τη σχέση:

$$\mathbf{K}\text{cat} = \frac{\mathbf{V}\text{max}}{[\mathbf{E}]T} \qquad \text{(Εξίσωση 2)}$$

Με βάση τις ειδικές ενεργότητες που προσδιορίστηκαν πειραματικά (0.3 ± 0.02 pmol PIP_3/min/ng ενζύμου για τη WT και 0.51 ± 0.05 pmol PIP_3/min/ng ενζύμου για τη H1047R), οι τιμές K_{cat} υπολογίστηκαν σε 1 ± 0.03 s^{-1} και 1.7 ± 0.09 s^{-1}, αντίστοιχα, σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι πιο πάνω τιμές K_{cat} είναι περίπου τέσσερις τάξεις μεγέθους υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές K_{off} που προέκυψαν από την ανάλυση SPR. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι, μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου–υποστρώματος, η καταλυτική μετατροπή του PIP_2 σε PIP_3 πραγματοποιείται σημαντικά ταχύτερα από την αποδέσμευση του ενζύμου από τη μεμβράνη.

Υπό αυτές τις συνθήκες, όπου $K_{cat} \gg K_{off}$, η Εξίσωση 1 απλοποιείται ως εξής:

$$\frac{\mathbf{K}\mathrm{cat}}{\mathbf{K}\mathrm{m}} = \frac{\mathbf{K}\mathrm{cat}}{\left(\frac{\mathbf{K}\mathrm{off} + \mathbf{K}\mathrm{cat}}{\mathbf{K}\mathrm{on}}\right)} \approx \frac{\mathbf{K}\mathrm{cat}}{\left(\frac{\mathbf{K}\mathrm{cat}}{\mathbf{K}\mathrm{on}}\right)} \approx \mathbf{K}\mathrm{on} \qquad \text{(Εξίσωση 3)}$$

Συνεπώς η καταλυτική απόδοση της PI3Kα, όπως εκφράζεται από την παράμετρο K_{cat}/K_m, καθορίζεται κυρίως από τον ρυθμό πρόσδεσης του ενζύμου με τη μεμβράνη (K_{on}), ενώ η συμβολή της σταθεράς αποδέσμευσης K_{off} είναι πρακτικά αμελητέα (Εξίσωση 2 Πίνακας 4.1). Συνεπώς, η αυξημένη καταλυτική δραστικότητα της H1047R οφείλεται κατά βάση στην ενισχυμένη ικανότητα μεμβρανικής πρόσδεσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμασιών και των πειραμάτων SPR συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η ογκογονική μεταλλαγή H1047R ενισχύει τον ρυθμό πρόσδεσης της PI3Kα στη μεμβράνη, οδηγώντας τελικά σε ενισχυμένη καταλυτική απόδοση της PI3Kα. Τα αποτελέσματα αυτά δημοσιεύθηκαν πρόσφατα από την ομάδα μας (107)

4.6 Αξιολόγηση μορίων για την ανακάλυψη επιλεκτικών αναστολέων της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της κινάσης PI3Kα

Η μεταλλαγή H1047R του γονιδίου *PIK3CA*, όπως έχουμε αναφέρει, αποτελεί μία από τις συχνότερες ογκογονικές μεταλλαγές σε κακοήθειες όπως ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου και του ενδομήτριου(57,64,71–73), γεγονός που την καθιστά έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα στόχο για την ανάπτυξη εξειδικευμένων αναστολέων. Στο πλαίσιο αυτό, αξιοποιήσαμε την μεθοδολογία που αναπτύξαμε στην παρούσα διατριβή προκειμένου να ταυτοποιήσουμε νέους εκλεκτικούς αναστολείς εναντίον της μεταλλαγμένης μορφής H1047R, χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την αντίστοιχη φυσιολογική. Οι ενώσεις που ελέγχθηκαν πειραματικά προήλθαν από ένα αρχικό φιλτράρισμα που πραγματοποιήθηκε με *de novo* σχεδιασμό και εικονικό έλεγχο (virtual screening) ενώσεων βάσει της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης, όπως αναφέρεται αναλυτικά πιο κάτω.

4.6.1 *De novo* σχεδιασμός και επιλογή υποψήφιων αναστολέων της PI3Kα μέσω εικονικής αξιολόγησης και δομικής ανάλυσης

Για την υλοποίηση της παραπάνω στρατηγικής, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένος εικονικός έλεγχος ενώσεων στο εργαστήριο της Δρ. Κούρνια (IIBEAA). Η μεθοδολογία βασίστηκε στην αξιοποίηση των δομικών διαφορών μεταξύ της φυσιολογικής (WT) και της H1047R μορφής, με στόχο τον εντοπισμό μοναδικών θέσεων πρόσδεσης (binding pockets) που απαντώνται αποκλειστικά στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (53,108). Ο αρχικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες Maybridge (~24.000 ενώσεις) και ZINC (~2.000.000 ενώσεις) (109). Τα κριτήρια επιλογής των υποψηφίων μορίων περιλάμβαναν: (α) υψηλή προβλεπόμενη συγγένεια πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο ή σε νέες θέσεις δέσμευσης, (β) οπτική επιβεβαίωση της τοποθέτησης του μορίου στις θέσεις πρόσδεσης, (γ) απουσία δομικών στοιχείων με πιθανή τοξικότητα ή ανεπιθύμητη δραστικότητα (π.χ. κινόνες) και (δ) αξιολόγηση πιθανών μεταβολικών «ευάλωτων» περιοχών. Επιπλέον, δόθηκε προτεραιότητα σε ενώσεις με κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως υδατοδιαλυτότητα και καλή κυτταρική διαπερατότητα, σύμφωνα με καθιερωμένους κανόνες φαρμακοχημείας (110,111).

Για την καλύτερη κατανόηση της δυναμικής των θέσεων πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD) για τη WT και H1047R μορφή. Από τις MD τροχιές εξήχθησαν αντιπροσωπευτικές δομές, οι οποίες αποκάλυψαν πιθανές πρόσθετες θέσεις πρόσδεσης που εμφανίζονται αποκλειστικά στη μεταλλαγμένη μορφή (112). Σε αυτές εφαρμόστηκε επαναληπτική διαδικασία μοριακής αγκυροβόλησης (docking), με στόχο την πρόβλεψη της βέλτιστης γεωμετρίας και των αλληλεπιδράσεων των ενώσεων στις θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου οι ίδιες βιβλιοθήκες ενώσεων, ώστε να εντοπιστούν οι πιο εκλεκτικοί υποψήφιοι αναστολείς.

Οι ενώσεις με το πιο ευνοϊκό προφίλ υποβλήθηκαν σε περαιτέρω αξιολόγηση με το εργαλείο ChemBioServer για εκτίμηση τοξικότητας, φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (ADMET) και μοριακής διαφοροποίησης (Katsila et al. 2016 Bioinformatics). Μέσω των κριτηρίων αυτών επιλέχθηκαν οι ενώσεις-οδηγοί (lead compounds) και συντέθηκαν σε συνεργασία με την εταιρεία proACTINA, με στόχο την πειραματική επιβεβαίωση της δράσης τους αλλά και τη σύνθεση παραγώγων με βελτιωμένη εκλεκτικότητα και δραστικότητα. Όπου υπήρχαν διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκαν καθιερωμένα συνθετικά πρωτόκολλα· στις υπόλοιπες περιπτώσεις αναπτύχθηκαν τροποποιημένες διαδρομές βασισμένες σε συγγενείς χημικές δομές.

4.6.2 Πειραματική αξιολόγηση βιβλιοθήκης φυσικών προϊόντων

Παράλληλα με τον δομικό σχεδιασμό εκλεκτικών αναστολέων της PI3Kα μέσω εικονικής αξιολόγησης, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος φυσικών προϊόντων από τη

χημειοθήκη που έχει αναπτυχθεί στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Η βιβλιοθήκη περιλαμβάνει εκχυλίσματα από μικροβιακές, φυτικές και θαλάσσιες πηγές - με ιδιαίτερη έμφαση σε φυτά της μεσογειακής χλωρίδας - καθώς και καθαρές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (φυσικές, ημισυνθετικές και συνθετικές). Στόχος ήταν ο εντοπισμός μορίων με εκλεκτική ανασταλτική δράση έναντι της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της PI3Kα.

Η επιλογή ενώσεων βασίστηκε τόσο σε γνωστά ή προβλεπόμενα βιολογικά χαρακτηριστικά όσο και σε αποτελέσματα μοριακής αγκυροβόλησης (docking) σε διαφορετικές διαμορφώσεις του ενεργού κέντρου της PI3Kα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GLIDE, με σκοπό την ανεύρεση μορίων υψηλής συγγένειας πρόσδεσης και πιθανής εκλεκτικότητας έναντι της μεταλλαγμένης μορφής. Επιπρόσθετα, η επιλογή υποστηρίχθηκε από σχετική βιβλιογραφία σχετικά με τη φαρμακολογική δράση των υποψήφιων ενώσεων.

Τα μόρια που αναδείχθηκαν ως πιο υποσχόμενα ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, όπως ιντιρουμπίνες, βενζοφουράνια, κουμαρίνες και παράγωγα πουρινών. Η πειραματική αξιολόγηση της χημειοθήκης, και των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Ταμβακόπουλου (IIBEAA). Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των μορίων με τη μέθοδο MTT σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF-7, T47D, HCC1954, MDA-MB-231), ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε φαρμακοκινητική ανάλυση με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, LC-MS), με στόχο την ταυτοποίηση ενώσεων-οδηγών για περαιτέρω ανάπτυξη. (Σημ. ο συντακτικός τύπος των χημικών μορίων παρουσιάζονται στο παράρτημα που είναι επισυναπτόμενο της διδακτορικής διατριβής).

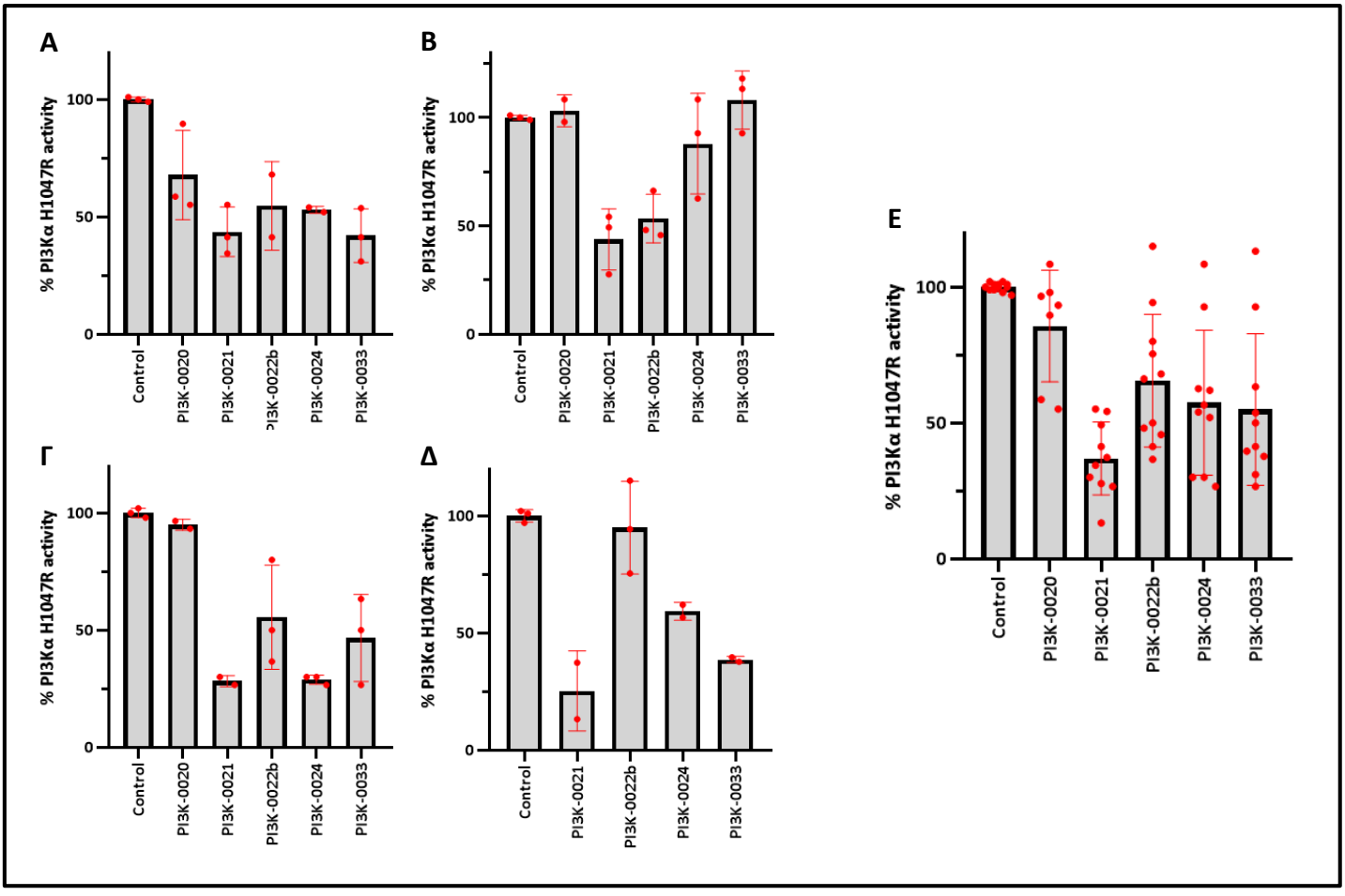
4.6.3 Προκλήσεις και στρατηγικές για αξιόπιστη εκτίμηση της δράσης των πιθανών αναστολέων της PI3Kα

Μετά την επιλογή υποψήφιων μορίων μέσω *de novo* σχεδιασμού, εικονικού ελέγχου, και της διερεύνησης φυσικών προϊόντων, κρίθηκε αναγκαία η πειραματική αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν εκλεκτικά τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R της PI3Kα. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της PI3Kα, με χρήση της μεθόδου που αναπτύχθηκε και περιγράφεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Η διαδικασία περιλάμβανε αρχικά τον έλεγχο της δράσης κάθε ένωσης έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της κινάσης. Σε περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση, η ίδια ένωση δοκιμάστηκε και έναντι της πρωτεΐνης φυσικού τύπου (WT), προκειμένου να καθοριστεί η ενδεχόμενη εκλεκτικότητά της. Για τις

ενώσεις που εμφάνισαν σχετική εξειδίκευση ή ισχυρή ανασταλτική δράση, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση μέσω υπολογισμού της τιμής IC_{50}, δηλαδή της συγκέντρωσης που απαιτείται για την επίτευξη 50% αναστολής της ενζυμικής ενεργότητας της PI3Kα.

Κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης διαπιστώθηκε ότι ορισμένες ενώσεις παρουσίαζαν σημαντική διακύμανση στη δράση τους μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων. Στην Εικόνα 4.10 απεικονίζεται η δράση μιας σειράς μορίων σε τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Σε κάθε πείραμα, η δράση κάθε μορίου μετρήθηκε σε τριπλά δείγματα και τα αποτελέσματα συνυπολογίστηκαν για τη δημιουργία συνολικού διαγράμματος. Όπως παρουσιάζεται, υπάρχουν μόρια με σαφώς καθορισμένο προφίλ δράσης. Ενδεικτικά, η ένωση 0020 δεν επηρεάζει την ενεργότητα της H1047R σε κανένα από τα τρία πειράματα, ενώ η ένωση 0021 παρουσιάζει σταθερή ανασταλτική δράση και στα τρία πειράματα. Συγκεκριμένα, η 0021 προκαλεί συνολικά ισχυρή αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας, της τάξης του ~63%, με αποτέλεσμα η ενεργότητα να μειώνεται από 100% σε περίπου 37%. Αντίθετα, οι ενώσεις 0022b, 0024 και 0033 εμφανίζουν λιγότερο συνεπή συμπεριφορά, με διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των ανεξάρτητων πειραμάτων όσο και μεταξύ των τριπλών δειγμάτων.



Εικόνα 4.10. Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης υποψήφιων ενώσεων στη μεταλλαγμένη PI3Kα (H1047R). *Η δράση των ενώσεων PI3K-0020, PI3K-0021, PI3K-0022b, PI3K-0024 και PI3K-0033 στην ενζυμική ενεργότητα της PI3Kα H1047R αξιολογήθηκε σε τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα (Α–Δ), με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη. Στο πάνελ (Ε) παρουσιάζεται η συνδυαστική ανάλυση όλων των πειραμάτων, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη συνολική εκτίμηση της ανασταλτικής δράσης των υποψήφιων αναστολέων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD.*

Οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται σε διάφορους παράγοντες που συνδέονται τόσο με τα ίδια τα μόρια όσο και με τη φύση της μεθόδου. Ένας πιθανός σημαντικός παράγοντας είναι η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα ορισμένων ενώσεων, η οποία δυσχεραίνει την ομοιόμορφη κατανομή τους στο υδατικό μέσο και, κατά συνέπεια, την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων. Η διαλυτότητα έχει ήδη ληφθεί υπόψη ως κριτήριο στον σχεδιασμό των υποψήφιων μορίων και αποτέλεσε κύριο στόχο βελτιστοποίησης των αρχικών ενώσεων-οδηγών μέσω κατάλληλων χημικών τροποποιήσεων. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι μόρια με ισχυρή ανασταλτική δράση εμφάνιζαν πιο σταθερά αποτελέσματα, ενώ η μεγαλύτερη μεταβλητότητα παρατηρήθηκε σε ενώσεις με μέτρια ή ασθενή δράση. Η ίδια η μέθοδος συνεισφέρει σε αυτή την πολυπλοκότητα, καθώς περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η πρόσδεση της κινάσης με το λιπιδιακό υπόστρωμα για τη φωσφορυλίωση του PIP_2 και ο ανταγωνισμός του παραγόμενου PIP_3 με το b-PIP_3 για πρόσδεση στη GRP1. Αυτές οι διεργασίες περιλαμβάνουν πολλαπλά στάδια και μπορούν να επηρεαστούν από λεπτές μεταβολές στις πειραματικές συνθήκες. Επιπλέον, η φύση της PI3Kα ως ενζύμου που δρα στη διεπιφάνεια λιπιδίων/νερού μπορεί από μόνη της να επηρεάσει την αξιοπιστία της μέτρησης, αφού είναι γνωστό ότι η προσθήκη ξένων μορίων μπορεί να μεταβάλει την ποιότητα της διεπιφάνειας ή τη φύση των φωσφολιπιδίων, με πιθανή επίδραση στα αποτελέσματα (103,113).

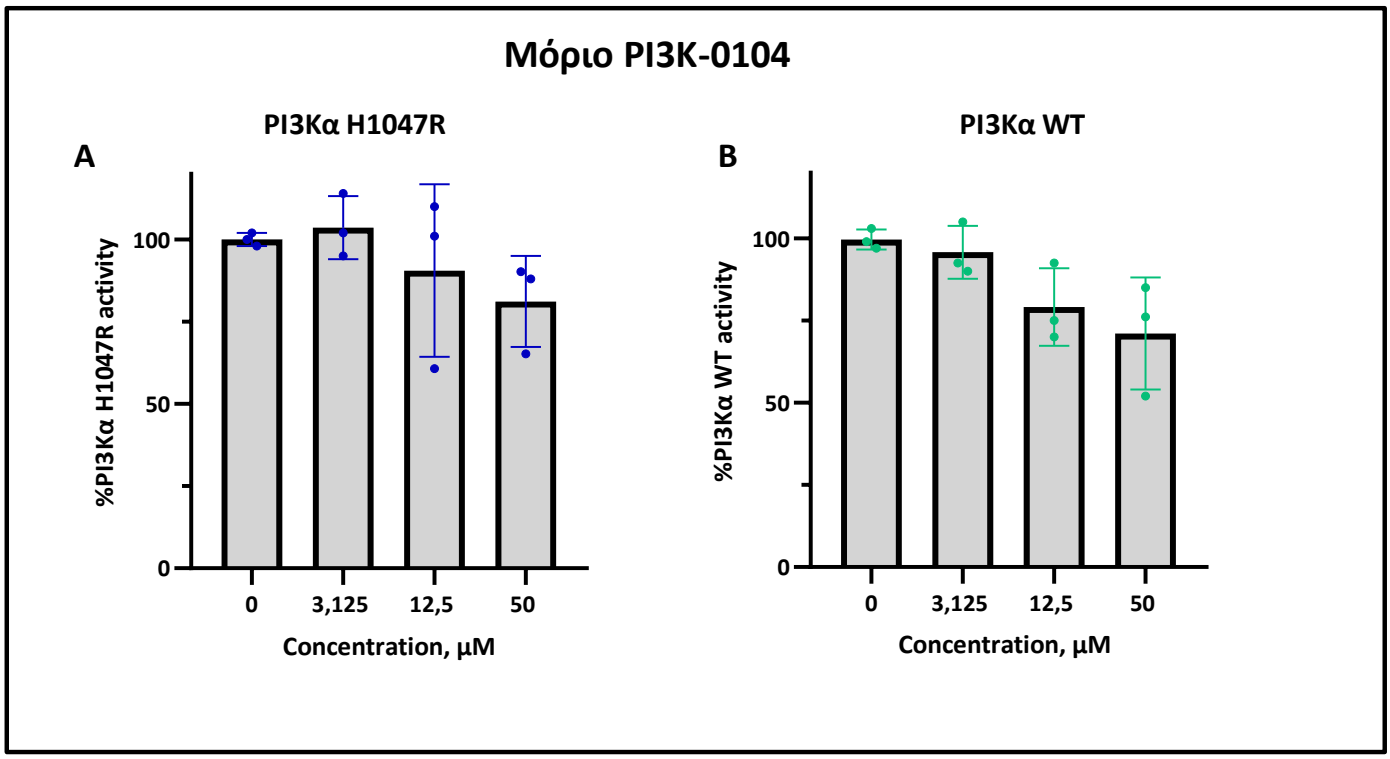
Για την ελαχιστοποίηση των παραπάνω πηγών μεταβλητότητας και την εξασφάλιση πιο αξιόπιστης εκτίμησης της δράσης των υποψήφιων αναστολέων, υιοθετήθηκε μια αυστηρή στρατηγική ελέγχου. Η δράση κάθε ένωσης εξετάζεται τουλάχιστον σε δύο ανεξάρτητα πειράματα έναντι της H1047R και, αν δεν παρατηρείται καμία ανασταλτική επίδραση, η ένωση θεωρείται μη δραστική. Σε περιπτώσεις θετικού αποτελέσματος, η ένωση επαναξιολογείται σε δύο επιπλέον ανεξάρτητα πειράματα, δοκιμαζόμενη παράλληλα και στη φυσικού τύπου κινάση ώστε να εκτιμηθεί η εκλεκτικότητά της. Όταν τα αποτελέσματα παραμένουν ασαφή μετά από δύο πειράματα, η δοκιμή επαναλαμβάνεται όσες φορές απαιτείται για την ασφαλή εξαγωγή συμπεράσματος. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιούνται τριπλά δείγματα για κάθε μόριο, καθώς και δείγματα ελέγχου, όπως δείγμα που περιέχει το 50% της συνήθως χρησιμοποιούμενης ποσότητας ενζύμου, για έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου, αλλά και δείγμα όπου περιέχεται γνωστός αναστολέας ως θετικός έλεγχος. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ασφαλέστερη και πιο συνεπή εκτίμηση της δράσης των υποψήφιων αναστολέων, μειώνοντας στο

μέγιστο δυνατό βαθμό τις ασυνέπειες που σχετίζονται με τη φύση της μεθόδου ή τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων.

4.6.4 Πειραματική αξιολόγηση της εκλεκτικότητας των υποψήφιων αναστολέων της PI3Kα (H1047R)

Με την μεθοδολογία που αναπτύξαμε πιο πάνω εξετάσαμε συστηματικά ένα μεγάλο σύνολο υποψήφιων αναστολέων της PI3Kα H1047R, με σκοπό να αποτιμήσουμε την εκλεκτικότητα και τη φαρμακολογική τους προοπτική. Συνολικά ελέγχθηκαν 168 ενώσεις για την ικανότητά τους να αναστέλλουν εκλεκτικά τη μεταλλαγμένη μορφή της PI3Kα H1047R. Από αυτές, οι 105 προήλθαν από εικονικό έλεγχο και *de novo* σχεδιασμό (αφού προηγήθηκε υπολογιστική σάρωση σε πάνω από 1 εκ. χημικές ενώσεις), ενώ οι υπόλοιπες 63 προήλθαν από βιβλιοθήκες χημικών και φυσικών προϊόντων. Τα αναλυτικά αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 4.2. Ένα από τα τεχνικά ζητήματα που προέκυψαν εξαρχής, όπως αναφέρθηκε, αφορούσε τη χαμηλή διαλυτότητα αρκετών ενώσεων, γεγονός που δυσχέραινε την ασφαλή εκτίμηση της δράσης τους. Η δυσκολία αυτή αντιμετωπίστηκε μέσω της σύνθεσης των αντίστοιχων αλάτων, τα οποία παρουσίασαν βελτιωμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.

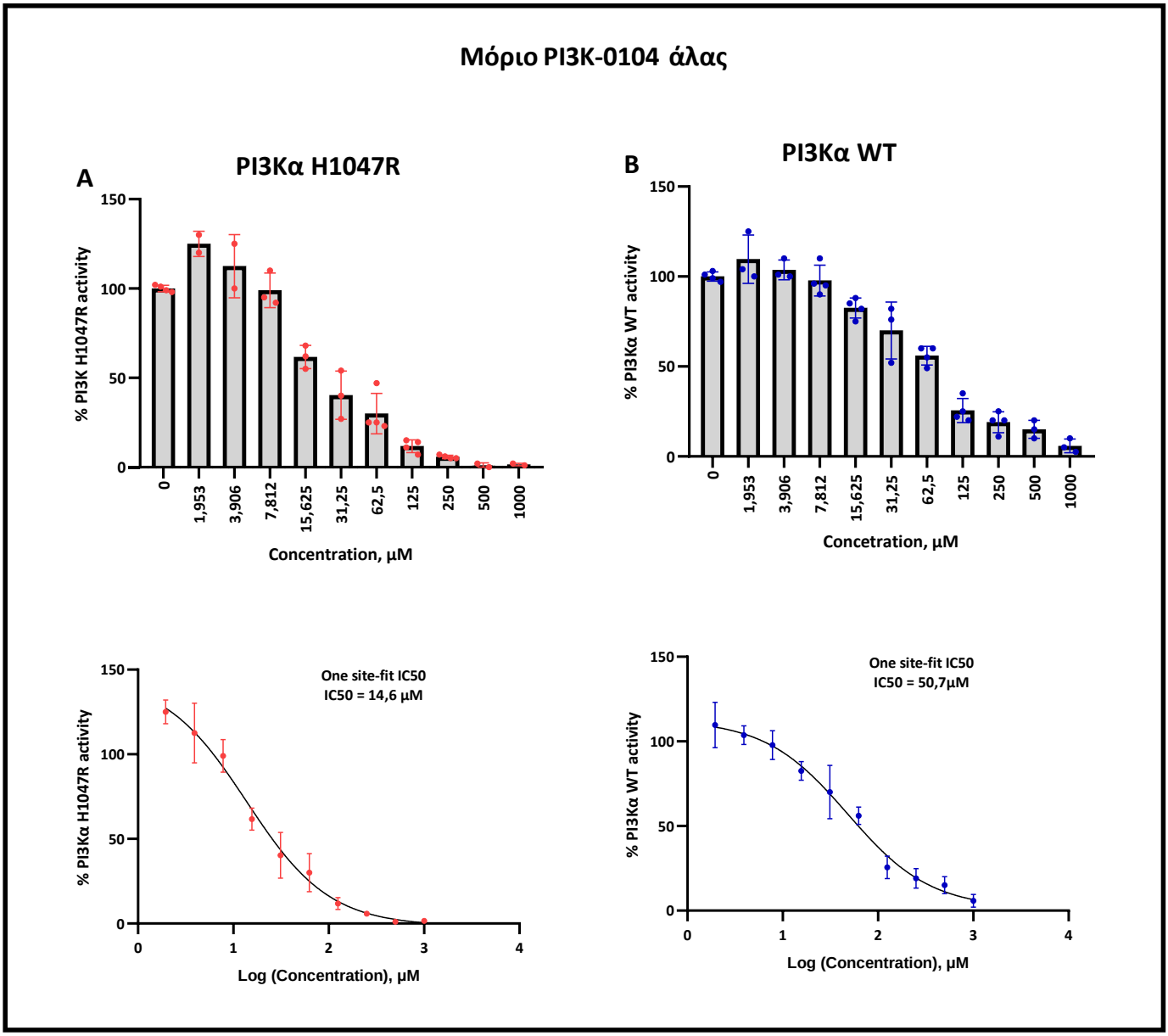
Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι το μόριο PI3K-0104. Όταν εξετάστηκε στην αρχική του μορφή, δεν παρουσίασε καμία ανασταλτική δράση στην ενεργότητα της PI3Kα (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Αξιολόγηση της δράσης της ένωσης PI3K-0104 έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Η ενζυμική ενεργότητα της PI3Kα H1047R (A) και WT*

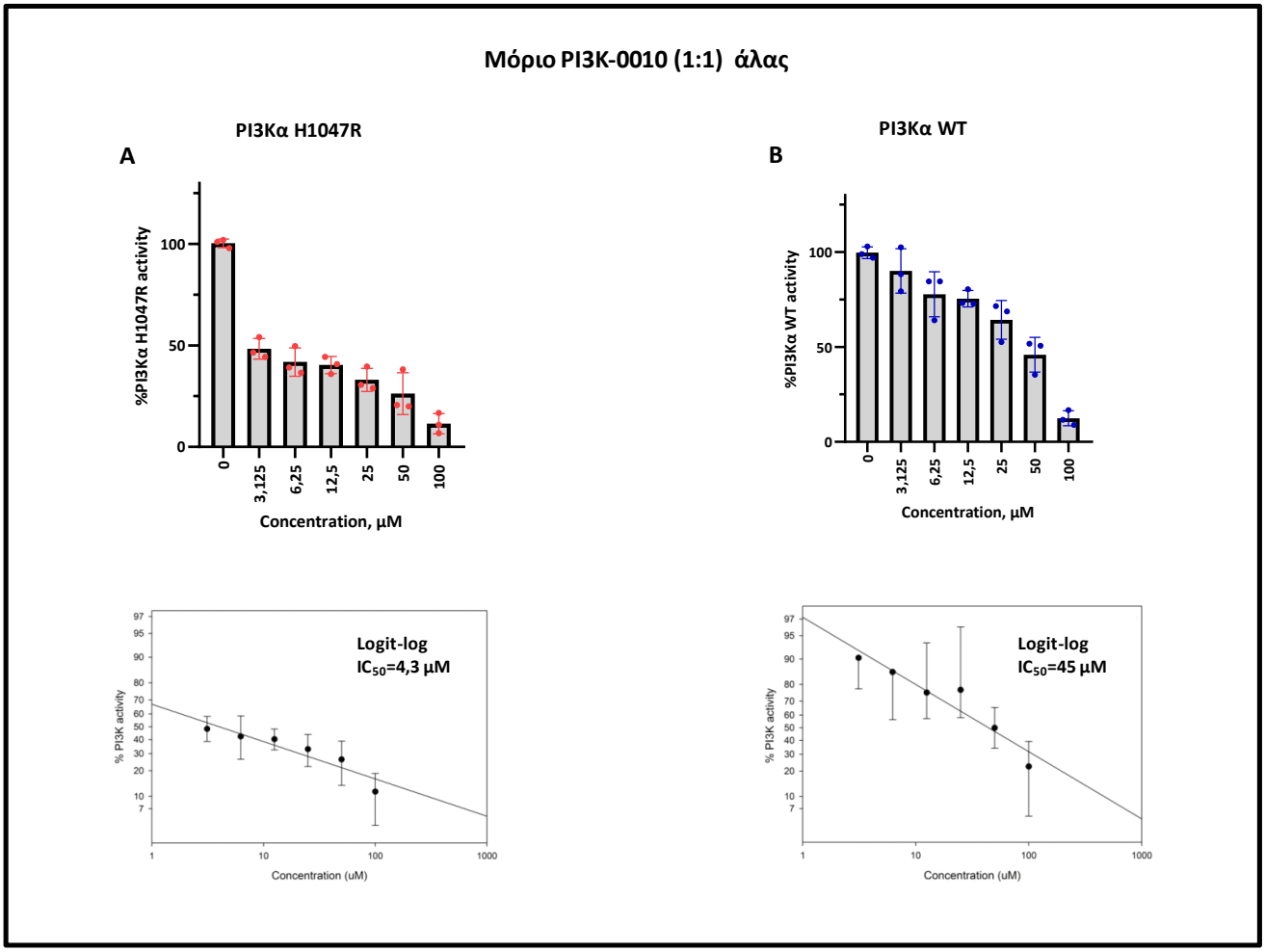
(Β) μετρήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης PI3K-0104 (3,125–50 μM). Η ένωση δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση τόσο στη μεταλλαγμένη μορφή, όσο και στη φυσικού τύπου πρωτεΐνη. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.

Αντίθετα, το ίδιο μόριο στη μορφή άλατος παρουσίασε αξιοσημείωτη αναστολή και μάλιστα με σχετική εκλεκτικότητα ως προς την H1047R. Οι τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν ήταν 14,6μM για τη H1047R και 50,7 μM για τη WT, δηλαδή περίπου τριπλάσια συγκέντρωση για την αναστολή της φυσικού τύπου κινάσης (Εικόνα 4.12). Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην ένωση PI3K-0048, η οποία στην αρχική μορφή ήταν πλήρως ανενεργή, αλλά ως άλας προκάλεσε ισχυρή μείωση της ενζυμικής ενεργότητας (Πίνακας 4.2). Ωστόσο, η επίδραση της αλατοποίησης δεν ήταν πάντα θετική. Για παράδειγμα, οι ενώσεις PI3K-0150 έως PI3K-0155 δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση ούτε στην αρχική τους μορφή ούτε μετά τη μετατροπή τους σε άλατα. (βλέπε Πίνακα 4.2).



Εικόνα 4.12. Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης της ένωσης PI3K-0104 άλας έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Παρουσιάζεται η επίδραση της ένωσης PI3K-0104 άλας στην ενεργότητα των μορφών PI3Kα H1047R (A) και PI3Kα WT (B), καθώς και ο υπολογισμός των τιμών IC50 για κάθε περίπτωση. Παρατηρείται δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ενεργότητας της PI3Kα, με υπολογιζόμενες τιμές IC50 ίσες με 14,6 μM για τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R και 50,7 μM για τη WT μορφή. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σχετική εκλεκτικότητα της ένωσης έναντι της μεταλλαγμένης μορφής PI3Kα H1047R. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*

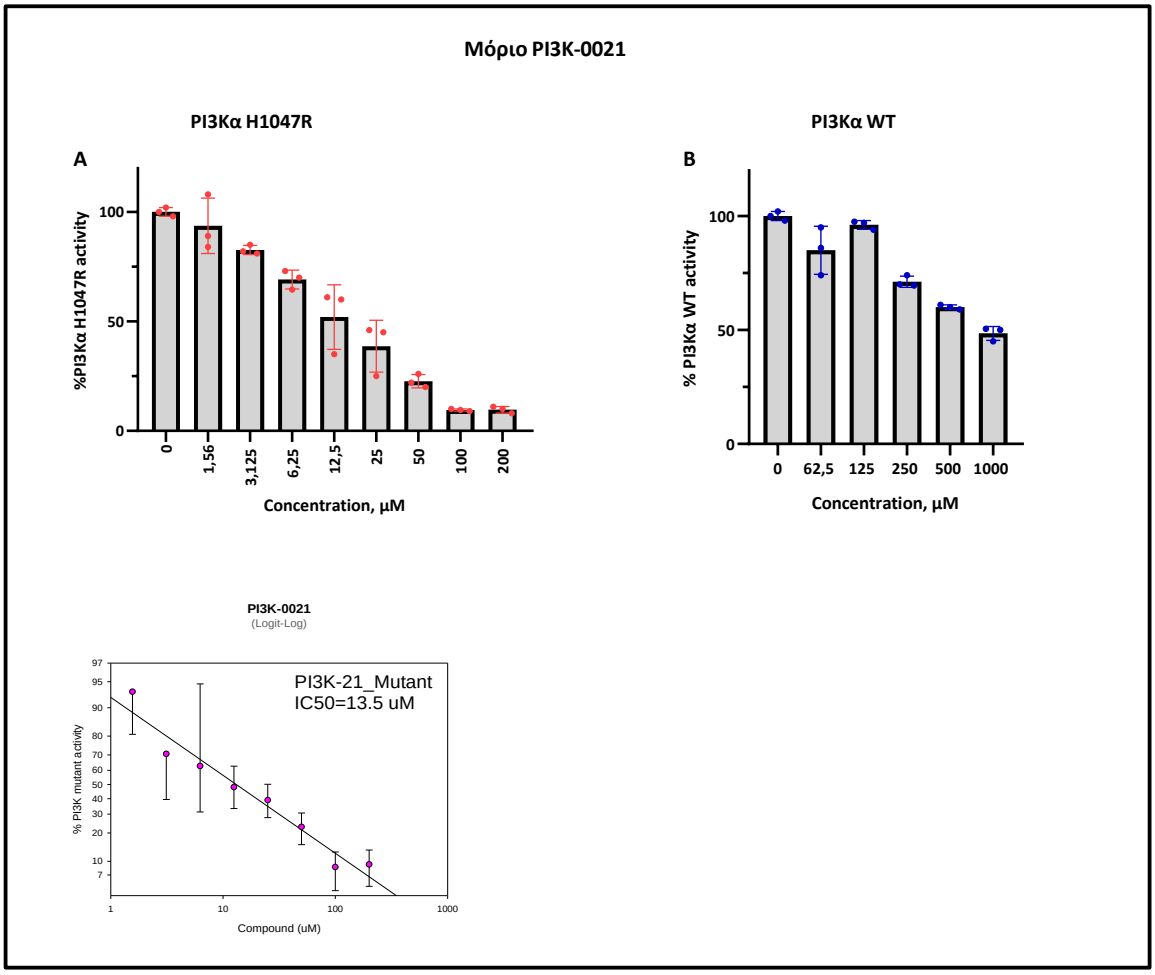
Ένα από τα πρώτα μόρια που ταυτοποιήθηκαν με αξιόλογη δράση ήταν το PI3K-0010 (άλας 1:1)**.** Η ένωση αυτή παρουσίασε ισχυρή αναστολή με αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα: η τιμή IC_{50} για την H1047R ήταν 4,3 μM**,** ενώ για τη WT κινάση ήταν 45 μM, δηλαδή δεκαπλάσια (Εικόνα 4.13). Η σημαντική αυτή διαφορά ανέδειξε την ένωση ως μόριο-οδηγό (lead compound) και αποτέλεσε τη βάση για το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αναλόγων με σκοπό τη βελτιστοποίηση της δραστικότητας και της εκλεκτικότητάς της.



Εικόνα 4.13. Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράση του μορίου PI3K-0010 (1:1) άλας έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Παρουσιάζεται η επίδραση*

του PI3K-0010 (1:1) άλας στην ενεργότητα των μορφών PI3Kα H1047R (A) και PI3Kα WT (B), καθώς και ο υπολογισμός των τιμών IC_{50} για κάθε περίπτωση. Παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη μείωση της ενεργότητας της κινάσης, υποδεικνύοντας ανασταλτική δράση της ένωσης. Οι υπολογιζόμενες τιμές IC_{50} ήταν 4,3 μM για τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R και 45 μM για τη WT μορφή, γεγονός που υποδηλώνει σημαντική εκλεκτικότητα της ένωσης έναντι της μεταλλαγμένης PI3Kα. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.

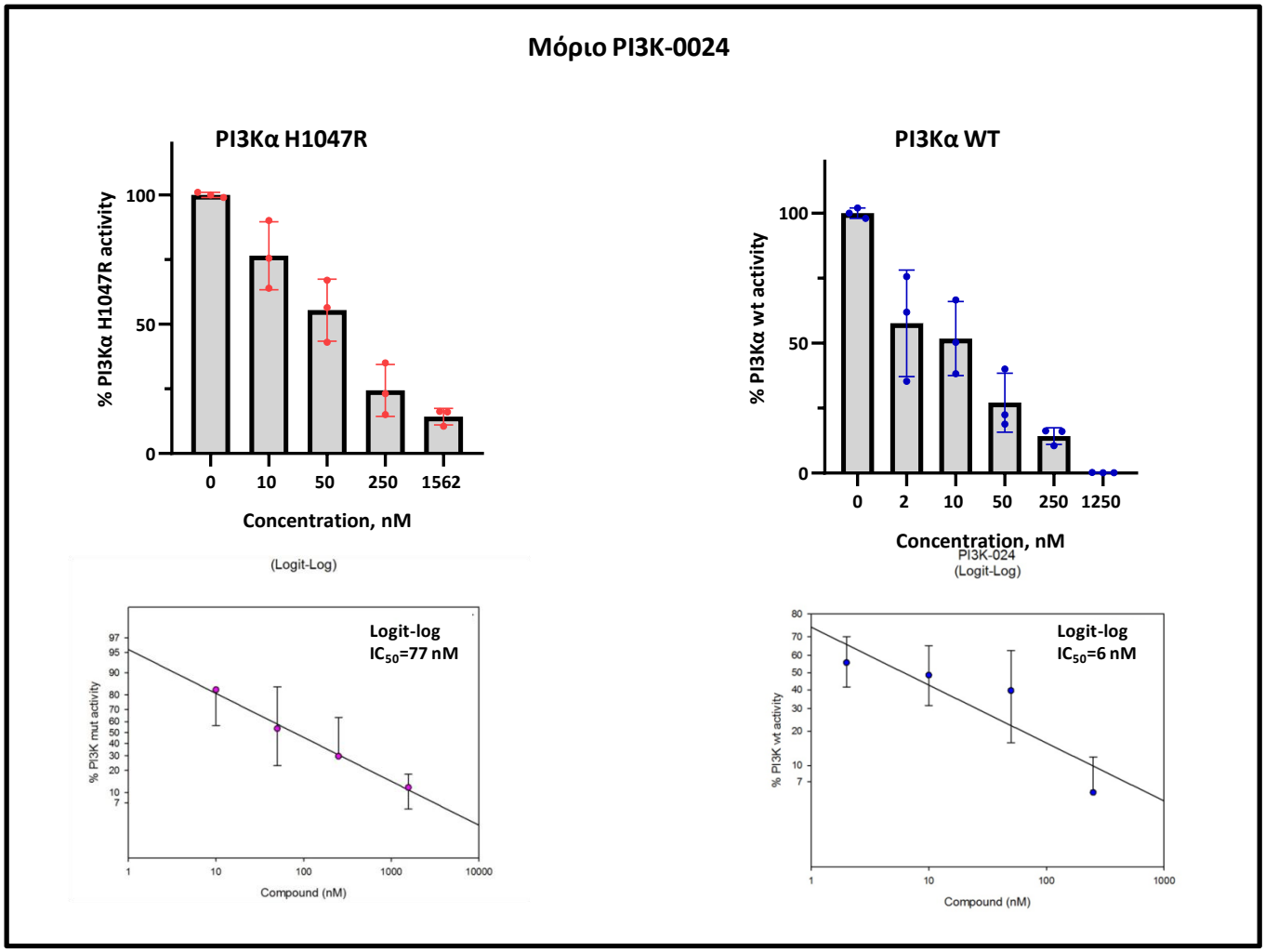
Ανάμεσα στα ανάλογα που αξιολογήθηκαν, ξεχώρισε το PI3K-0021 λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς του έναντι της μεταλλαγμένης μορφής PI3Kα H1047R. Η ένωση παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ενεργότητας της μεταλλαγμένης κινάσης, με τιμή IC_{50} ίση με 13,5 μM. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε επαρκής αναστολή έναντι της φυσικού τύπου PI3Kα (WT), ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, γεγονός που δεν επέτρεψε τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} για την φυσική μορφή. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν την έντονη εκλεκτικότητα του PI3K-0021 έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της PI3Kα (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.14. Αξιολόγηση της δράσης του μορίου PI3K-0021 έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *(A) Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ενεργότητας της PI3Kα*

H1047R από το PI3K-0021. (Β) Επίδραση του PI3K-0021 στην ενεργότητα της φυσικού τύπου PI3Kα (WT), όπου δεν παρατηρήθηκε επαρκής αναστολή για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50}. Η καμπύλη προσαρμογής για τη μεταλλαγμένη μορφή απέδωσε τιμή IC_{50} ίση με 13,5 μM. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με τριπλές τεχνικά επαναλήψεις ανά συνθήκη, και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιστοιχούν στους μέσους όρους κάθε ανεξάρτητου πειράματος.

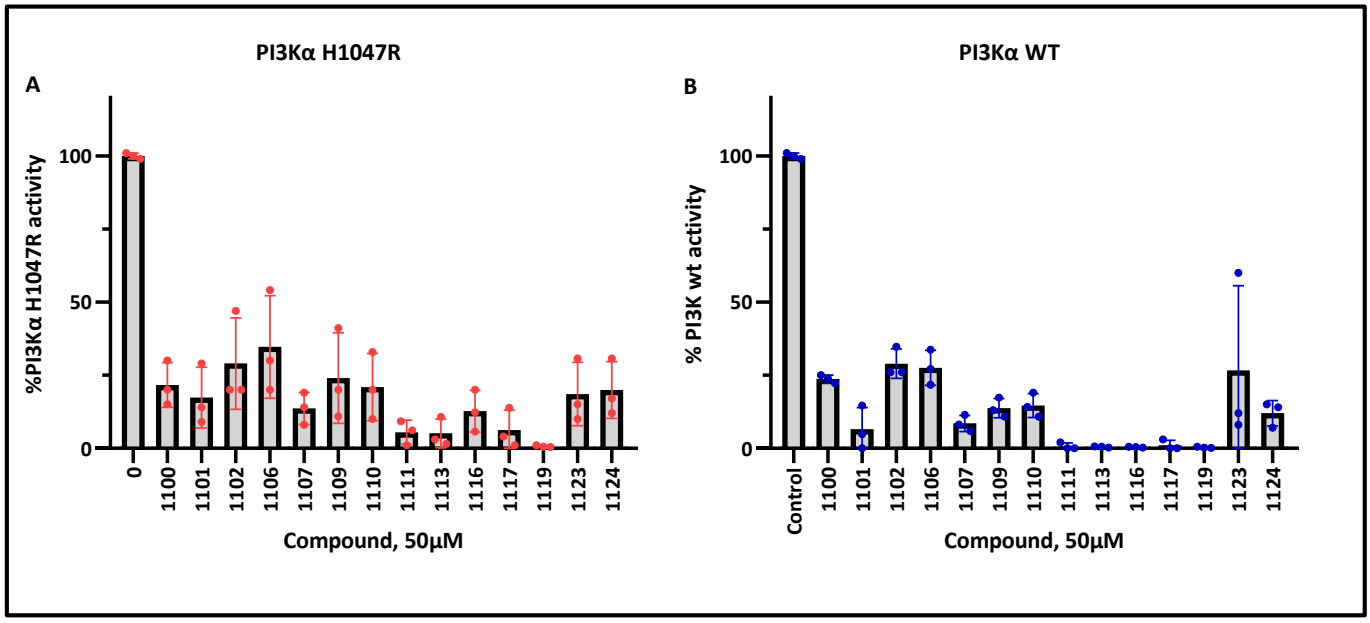
Ακόμη πιο εντυπωσιακή ήταν η δράση του PI3K-0024, ενός αναλόγου των ενώσεων 0010 και 0021. Η αναστολή της κινάσης εμφανίζεται ήδη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (εύρος nM). Η τιμή IC_{50} για τη H1047R ήταν 77 nM, ενώ για τη WT ήταν 6 nM (Εικόνα 4.15). Παρότι η ένωση αυτή εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ έναντι της WT μορφής παρά έναντι της H1047R, οι χαμηλές τιμές IC_{50} την καθιστούν ενδιαφέρον μόριο για περαιτέρω μελέτη και πιθανή τροποποίηση, ώστε να ενισχυθεί η εκλεκτικότητα χωρίς να χαθεί η δραστικότητα του.



Εικόνα 4.15. Αξιολόγηση της δράσης του μορίου PI3K-0024 έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Παρουσιάζεται η επίδραση του PI3K-0024 στην ενεργότητα των μορφών PI3Kα H1047R (Α) και PI3Kα WT (Β), καθώς και ο υπολογισμός των τιμών IC_{50} για κάθε περίπτωση. Παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη μείωση της ενεργότητας της κινάσης, υποδεικνύοντας ανασταλτική δράση της ένωσης. Οι υπολογιζόμενες τιμές IC_{50} ήταν 77 nM για τη μεταλλαγμένη μορφή H1047R και 6 nM για τη WT μορφή, γεγονός που υποδηλώνει*

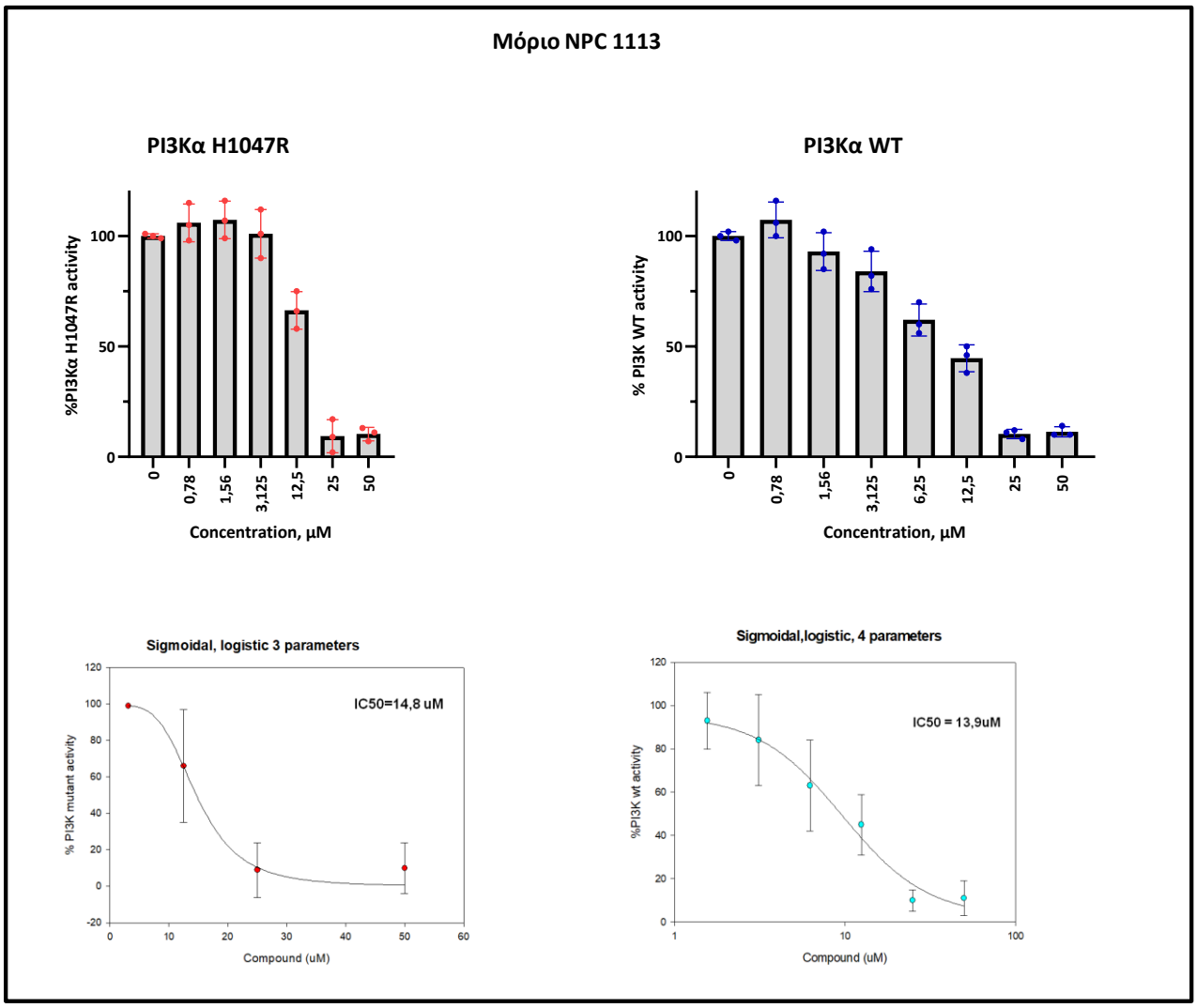
την ισχυρή ανασταλτική του ικανότητα. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.

Μέχρι το σημείο αυτό, η αξιολόγηση επικεντρώθηκε κυρίως σε συνθετικά μόρια και στα δομικά τους ανάλογα, με στόχο την ταυτοποίηση ενώσεων με υψηλή ανασταλτική ισχύ και εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης PI3Kα H1047R. Στη συνέχεια, η μελέτη επεκτάθηκε σε μία σειρά φυτοχημικών και άλλων φυσικών προϊόντων, τα οποία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τη βιολογική τους δράση ή την ικανότητά τους να αναστέλλουν κινάσες, προκειμένου να αξιολογηθεί η πιθανή ανασταλτική τους δράση έναντι της PI3Kα. Τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα μόρια εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση (Πίνακας 4.2, Εικόνα 4.16), χωρίς όμως να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα υπέρ της μεταλλαγμένης μορφής. Πράγματι, οι τιμές IC_{50} που υπολογίστηκαν ήταν συγκρίσιμες για τη φυσικού τύπου και τη μεταλλαγμένη μορφή της PI3Kα (Πίνακας 4.2), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενώσεις αυτές δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα έναντι της H1047R μορφής της PI3Kα.



Εικόνα 4.16. Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης σειράς φυτοχημικών ενώσεων έναντι της PI3Kα H1047R (A) και της φυσικού τύπου μορφής (WT) (B). *Κάθε ένωση αξιολογήθηκε σε τελική συγκέντρωση 50 μM και προσδιορίστηκε το ποσοστό της υπολειπόμενης ενζυμικής ενεργότητας. Αρκετές από τις εξεταζόμενες ενώσεις εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι τόσο της PI3Kα H1047R όσο και της PI3Kα WT, χωρίς εμφανή εκλεκτικότητα υπέρ της μεταλλαγμένης μορφής. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μόριο NPC-1113 (Εικόνα 4.17), το οποίο αν και παρουσιάζει σημαντική ανασταλτική δράση, δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της κινάσης. Συγκεκριμένα, το NPC-1113 ανέστειλε τη δραστικότητα της PI3Kα H1047R με IC_{50} 14.8 μM, ενώ για τη φυσικού τύπου μορφή (WT) η τιμή IC_{50} ήταν 13.9 μM.



Εικόνα 4.17. Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης του φυτοχημικού μορίου NPC-1113 έναντι της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Παρουσιάζεται η επίδραση του μορίου στη δραστικότητα των δύο ενζυμικών μορφών και ο υπολογισμός των τιμών IC_{50}. Το NPC-1113 εμφανίζει ανασταλτική δράση με IC_{50} 14.8 μM για την PI3Kα H1047R και 13.9 μM για τη WT, χωρίς να καταδεικνύεται εκλεκτικότητα προς τη μεταλλαγμένη κινάση. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*

Ωστόσο, η έντονη δραστικότητα που καταγράφεται για τις ενώσεις αυτές τις καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες για περαιτέρω μελέτη. Η διερεύνηση δομικά συγγενών ή παράγωγων μορίων θα μπορούσε να οδηγήσει στην ταυτοποίηση

αναλόγων με βελτιωμένο προφίλ εκλεκτικότητας, προσφέροντας έτσι προοπτικές για την ανάπτυξη πιο εξειδικευμένων αναστολέων της PI3Kα H1047R.

Πίνακας 4.2. Κατάλογος των μορίων που αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλουν τη δράση της PI3Kα H1047R και της φυσικού τύπου μορφής (WT). *Για κάθε ένωση αναφέρονται η συγκέντρωση δοκιμής και το ποσοστό υπολειπόμενης ενζυμικής δραστικότητας μετά την αναστολή. Επιπλέον, για τις ενώσεις που παρουσίασαν την πιο ισχυρή δράση υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50}, ώστε να εκτιμηθεί συγκριτικά η ανασταλτική τους ικανότητα έναντι των δύο μορφών του ενζύμου.*

	Μόριο	Συγκέντρωση (μM)	% ενεργότητα της PI3Kα		IC_{50} (μM)	
			Φυσικού τύπου (WT)	H1047R	WT	H1047R
1	PI3K-0001	50	Not tested	68		
2	PI3K-0002	50	Not tested	74		
3	PI3K-0003	50	Not tested	59		
4	PI3K-0004	50	Not tested	58		
5	PI3K-0005	50	Not tested	70		
6	PI3K-0006	50	Not tested	65		
7	PI3K-0007	50	Not tested	67		
8	PI3K-0008	50	Not tested	65		
9	PI3K-0009	50	Not tested	100		
10	**PI3K-0010 (1:1)**	50	50	25	**45**	**4.3**
11	PI3K-0010 (6:1)	50	60	60		
12	PI3K-0011	50	Not tested	67		
13	PI3K-0020	50	64	84		
14	**PI3K-0021**	50	98	37		**13.5**
15	PI3K-0022b	50	96	63		
16	**PI3K-0024**	50,**(50 nM*)**	48	53	**6 nM***	**77 nM***
17	PI3K-0025	50	Not tested	102		
18	PI3K-0026-2HCl	50	40	61		
19	PI3K-0027	50	Not tested	66		
20	PI3K-0028	12.5, 25, 50	81, 36, 26	105, 57, 20		
21	PI3K-0030	50	Not tested	77		
22	PI3K-0032	50	Not tested	108		
23	PI3K-0033	50	99	61		
24	PI3K-0035	50	Not tested	67		
25	PI3K-0037	50	Not tested	115		
26	PI3K-0038	50	Not tested	106		
27	PI3K-0041	50	Not tested	74		
28	PI3K-0042	50	Not tested	103		
29	PI3K-0044b	50	Not tested	105		
30	PI3K-0047	50	Not tested	123		
31	PI3K-0048	50	106	101		
32	PI3K-0048 **salt**	50	30	42		

33	PI3K-0050	50	Not tested	82		
34	PI3K-0051	50	Not tested	104		
35	PI3K-0052	50	Not tested	89		
36	PI3K-0053	50	Not tested	66		
37	PI3K-0054	50	Not tested	73		
38	PI3K-0055	50	79	59		
39	PI3K-0066	50, 200	Not tested	107, 107		
40	PI3K-0067	50, 200	Not tested	107, 121		
41	PI3K-0069	50, 200	Not tested	105, 113		
42	PI3K-0100	50	Not tested	78		
43	PI3K-0101	50	Not tested	85		
44	PI3K-0102	12.5, 25, 50	117, 126, 75	92, 97, 50		
45	PI3K-0103	50	Not tested	145		
46	PI3K-0104	50	100	85		
47	**PI3K-0104 salt**	50	50	30	**52**	**16**
48	PI3K-0105	50	Not tested	60		
49	PI3K-0106	50	100	75		
50	PI3K-0107	50	Not tested	82		
51	PI3K-0109	50	92	94,5		
52	PI3K-0110	50	110	81.5		
53	PI3K-0111	50	41	42		
54	PI3K-0112	50	49	91		
55	PI3K-0113	50	124	82		
56	PI3K-0114	50	78	67		
57	PI3K-0115	50	113	70		
58	PI3K-0116	50	85	76		
59	PI3K-0117	50	87	75		
60	PI3K-0118	50	94	61		
61	PI3K-0119	50	101	78		
62	PI3K-0120	50, 200	Not tested	96, 80		
63	PI3K-0121	50, 200	Not tested	72, 89		
64	PI3K-0122	50, 200	118, 43	88, 25		
65	PI3K-0123	50, 200	Not tested	81, 114		
66	PI3K-0124	50, 200	Not tested	83, 93		
67	PI3K-0125	50, 200	Not tested	100, 96		
68	PI3K-0126	50, 200	Not tested	83, 78		
69	PI3K-0127	50, 200	Not tested	105, 105		
70	PI3K-0128	50, 200	91, 82	87, 67		
71	PI3K-0129	50, 200	Not tested	79, 63		
72	PI3K-0130	50, 200	36, 23	79, 31		
73	PI3K-0131	50, 200	Not tested	95, 92		
74	PI3K-0132	50, 200	72, 57	93, 40		
75	PI3K-0133	50, 200	Not tested	95, 91		

76	PI3K-0134	50*, 200	38,5*	59, 75		
77	PI3K-0135	50, 200	Not tested	97, 103		
78	PI3K-0136	50, 200	Not tested	67, 66		
79	PI3K-0137	50, 200	Not tested	101, 69		
80	PI3K-0138	50, 200	110, 107	92, 52		
81	PI3K-0139	50, 200	Not tested	80, 70		
82	PI3K-0140	50, 200	Not tested	86, 69		
83	PI3K-0141	50, 200	110, 89	97, 74		
84	PI3K-0142	50, 200	Not tested	74, 71		
85	PI3K-0143	50, 200	Not tested	94, 80		
86	PI3K-0144	50, 200	Not tested	94, 94		
87	PI3K-0145	50, 200	Not tested	76, 92		
88	PI3K-0146	50, 200	120, 114	48, 90		
89	PI3K-0150	50	Not tested	95		
90	PI3K-0150 **salt**	25, 50, 100	117, 114, 51	101, 60, 19		
91	PI3K-0151	50	Not tested	92		
92	PI3K-0151 **salt**	25, 50, 100	150, 105, 101	116, 83, 72		
93	PI3K-0152	50	Not tested	99		
94	PI3K-0152 **salt**	50	115	114		
95	PI3K-0153	50	Not tested	101		
96	PI3K-0153 **salt**	50	Not tested	102		
97	PI3K-0154	50	Not tested	125		
98	PI3K-0154 **salt**	50	Not tested	122		
99	PI3K-0155	50	Not tested	92		
100	PI3K-0155 **salt**	50	94	96		
101	PI3-0156	200	46	67		
102	PI3K-157	200	43	36		
103	PI3K-158	200	18	23		
104	PI3K-159	200	43	83		
105	PI3K-160	200	62	72		
106	NPC-0692	100	61	42		
107	NPC-0713	100	103	85		
108	NPC-0719	100	56	20		
109	NPC-0738	100	No effect	No effect		
110	NPC-0741	100	No effect	No effect		
111	NPC-0742	100	No effect	No effect		
112	NPC-0754	100	No effect	No effect		
113	NPC-0780	100	No effect	No effect		
114	NPC-0825	100	No effect	No effect		
115	NPC-0859	3,125 - 200	No effect	No effect		
116	NPC-0861	12.5, 25, 50	60, 72, 34	100, 100, 32		
117	NPC-1026	100	10	10		
118	NPC-1030	50	Not tested	No effect		

119	NPC-1032	50	Not tested	No effect		
120	NPC-1033	100	Not tested	No effect		
121	NPC-1035	50	No effect	No effect		
122	NPC-1036	100	10	10		
123	NPC-1037	100	10	10		
124	NPC-1038	50	74,5	95		
125	NPC-1039	0,78 - 50	No effect	No effect		
126	**NPC-1043**	50	8,4	16,33	**26.5**	**22.5**
127	NPC-1056	100	No effect	No effect		
128	NPC-1058	100	Not tested	No effect		
129	NPC-1082	50	92	Not tested		
130	NPC-1084	50	91	Not tested		
131	NPC-1099	50	59	Not tested		
132	NPC-1100	50	24	22		
133	NPC-1101	50	7	17		
134	NPC-1102	50	29	29		
135	NPC-1106	50	28	33		
136	NPC-1107	50	9	14		
137	NPC-1109	50	14	24		
138	NPC-1110	50	15	20		
139	NPC-1111	12.5, 25, 50	24, 6, 2	40, 19, 2		
140	**NPC-1113**	12.5, 25, 50	44, 10, 10	71, 10, 10	**14**	**15**
141	**NPC-1116**	12.5, 25, 50	65, 58, 12	120, 100, 42	**18.6**	**-**
142	**NPC-1117**	12.5, 25, 50	12, 11, 11	91, 24, 15	**6**	**25**
143	**NPC-1119**	12.2, 25, 50	5, 5, 0	21, 2, 0	**1.3**	**7**
144	**NPC-1123**	50	8,5	17	**27**	**-**
145	**NPC-1124**	50	12	19	**15**	**-**
146	NPC-1143	12.5, 25, 50	63, 43, 28	79, 67, 58		
147	NPC-1144	11, 33, 100	107, 118, 20	Not tested		
148	NPC-1145	11, 33, 100	108, 122, 74	Not tested		
149	NPC-1153	12.5, 25, 50	No effect	No effect		
150	NPC-1158	33, 100	20.5, 5.8	Not tested		
151	NPC-1159	33, 100	103, 116	Not tested		
152	NPC-1160	11, 33, 100	92, 92, 40	Not tested		
153	NPC-1161	33, 100	59.5, 1.5	Not tested		
154	NPC-1162	11, 33, 100	121, 109, 5	Not tested		
155	NPC-1163	11, 33, 100	113, 96, 48	Not tested		
156	**NPC-1164**	11, 33, 100	59, 3, 0	Not tested	**6**	**-**
157	NPC-1170	33, 100	56, 2	Not tested		
158	NPC-1171	33, 100	112, 107	Not tested		
159	**NPC-1173**	11, 33, 100	18, 6, 0	Not tested	**6,5**	**-**
160	NPC-1215	12.5, 25, 50	No effect	No effect		
161	NPC-1289	50, 100	Not tested	84, 31		

162	NPC-1468	50, 100	Not tested	95, 99		
163	NPC-1485	50, 100	Not tested	76, 79		
164	NPC-1491	50, 100	Not tested	109, 89		
165	NPC-1492	50, 100	Not tested	109, 84		
166	NCI 331877	33, 100	96.5, 92.5	Not tested		
167	NCI 145667	33, 100	85.5, 93	Not tested		
168	NL-813	50, 100	Not tested	85, 84		

Συνολικά, η πειραματική αξιολόγηση των 168 υποψήφιων αναστολέων κατέδειξε ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε ήταν κατάλληλη για την αξιόπιστη εκτίμηση τόσο της ανασταλτικής τους δράσης όσο και της εκλεκτικότητάς τους έναντι της PI3Kα H1047R. Η αλατοποίηση ορισμένων ενώσεων βελτίωσε σημαντικά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, αποκάλυψε ανασταλτική δράση που δεν ήταν εμφανής στην αρχική τους μορφή. Μεταξύ των συνθετικών μορίων, οι ενώσεις PI3K-0010 και PI3K-0021 παρουσίασαν το πλέον ενδιαφέρον προφίλ εκλεκτικότητας έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της κινάσης, ενώ το PI3K-0024 διακρίθηκε για την εξαιρετικά υψηλή δραστικότητά του σε νανομοριακές συγκεντρώσεις, παρά την έλλειψη εκλεκτικότητας. Αντίθετα, τα περισσότερα φυσικά προϊόντα εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση και στις δύο μορφές της PI3Kα, υποδεικνύοντας ότι λειτουργούν κυρίως ως μη εκλεκτικοί αναστολείς. Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας επέτρεψαν την ιεράρχηση των πλέον υποσχόμενων ενώσεων και παρείχαν πολύτιμες πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ χημικής δομής, ανασταλτικής ισχύος και εκλεκτικότητας. Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν τη βάση για την επιλογή των καταλληλότερων μορίων προς περαιτέρω φαρμακολογική αξιολόγηση και βελτιστοποίηση. Καθώς τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται στη φάση της κατοχύρωσης πνευματικών δικαιωμάτων, δεν είναι εφικτό να δημοσιευθούν οι δομές των μορίων στην παρούσα διατριβή, λόγω δέσμευσης προς τους συνεργάτες που πραγματοποίησαν τα πρώτα στάδια της μελέτης, τα οποία περιλάμβαναν την ψηφιακή σάρωση και τη σύνθεση.

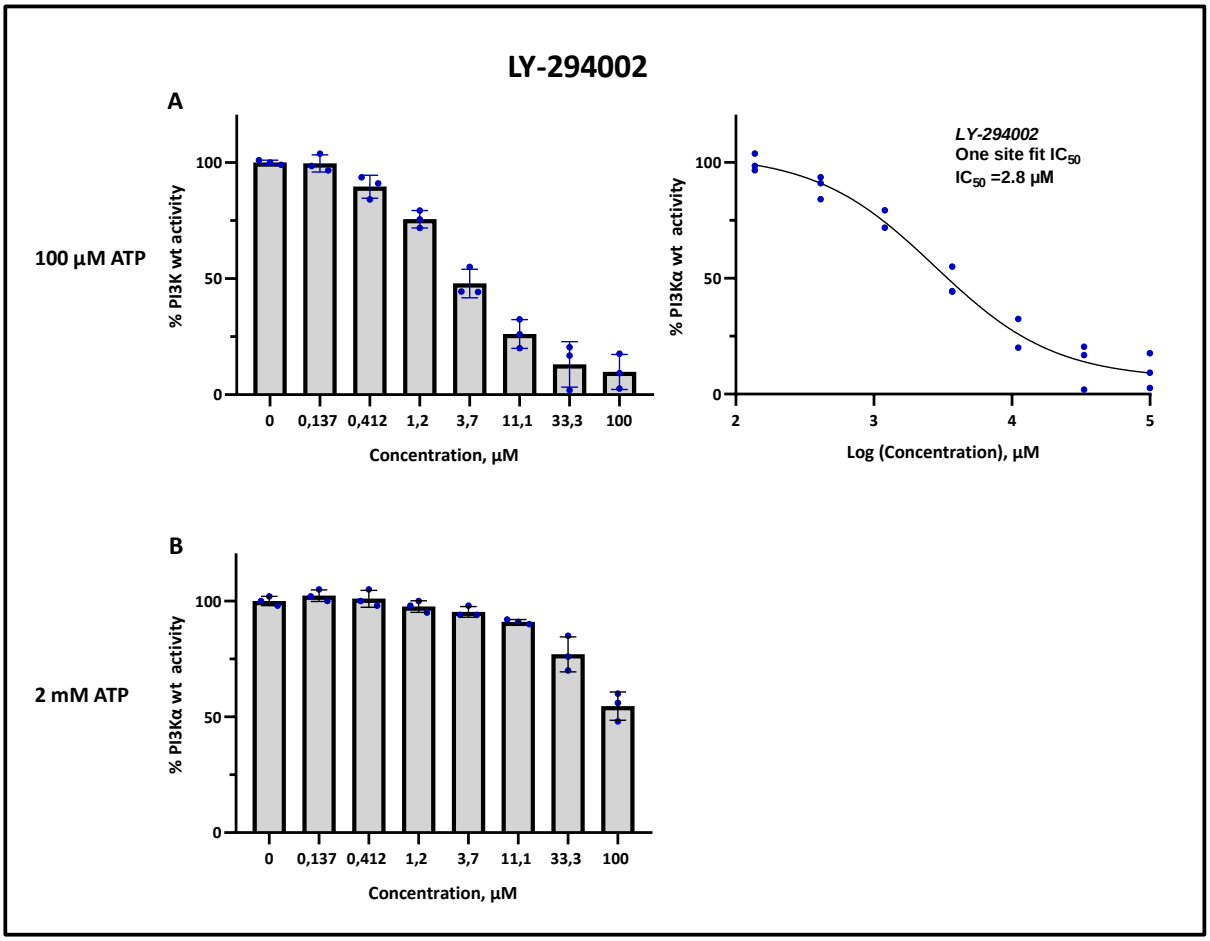
4.6.5 Διερεύνηση του μηχανισμού αναστολής της PI3Kα H1047R από το μόριο PI3K-0010 (άλας 1:1)

Από το σύνολο των ενώσεων που αξιολογήθηκαν, το μόριο PI3K-0010 (άλας 1:1) αναδείχθηκε ως η πλέον υποσχόμενη ένωση, καθώς συνδύαζε ισχυρή ανασταλτική δράση με αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης μορφής PI3Kα H1047R. Επιπλέον, αποτέλεσε το μόριο-οδηγό (lead compound) για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση των παραγώγων PI3K-0021 και PI3K-0024, τα οποία επίσης παρουσίασαν ενδιαφέρον φαρμακολογικό προφίλ.

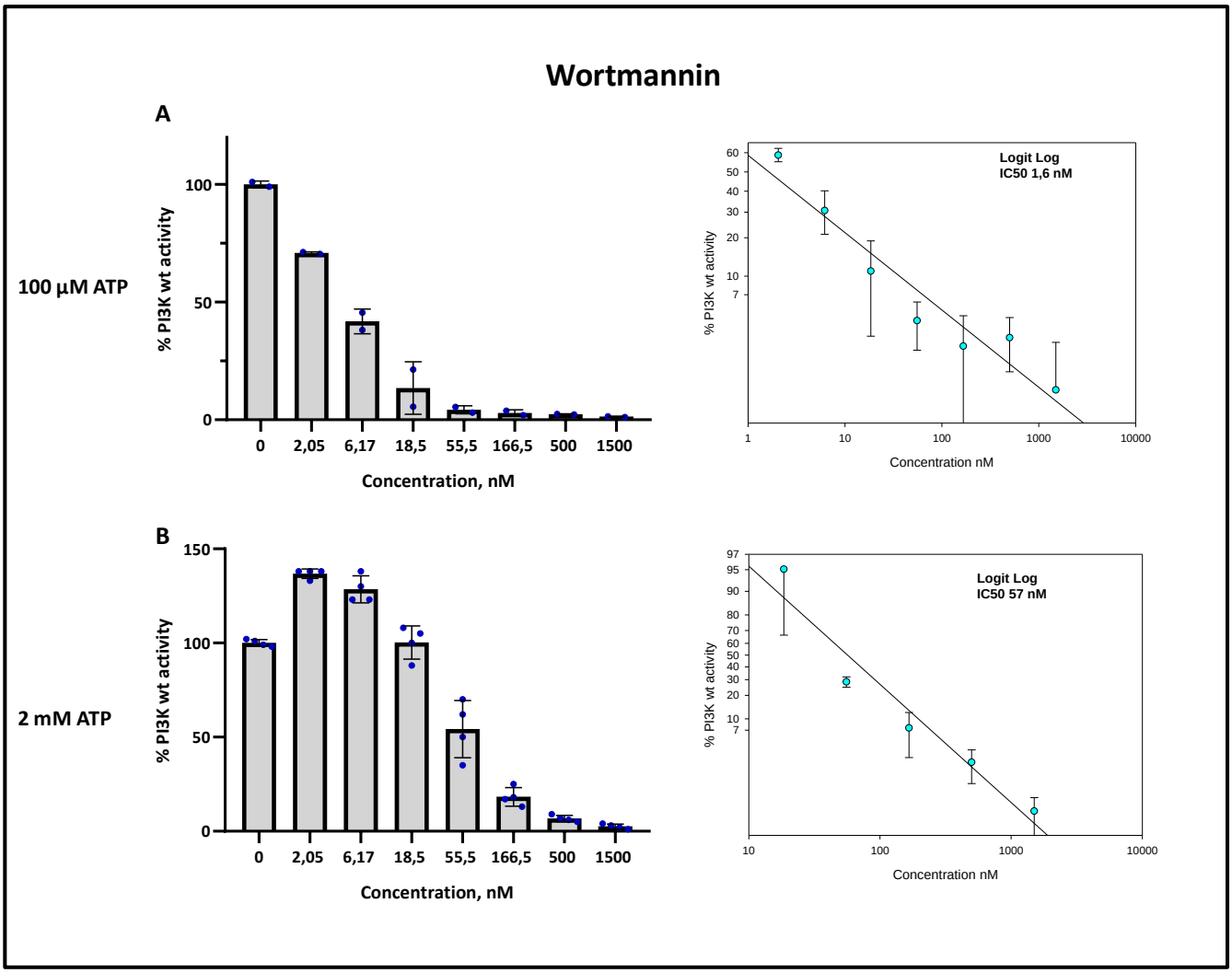
Για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του PI3K-0010 και τον καθορισμό του αν λειτουργεί ως ανταγωνιστικός (competitive) ή αλλοστερικός (allosteric)

αναστολέας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκε η τιμή IC_{50} του μορίου που προσδιορίστηκε σε κανονική συγκέντρωση ATP (100 μM) με την τιμή που προκύπτει παρουσία περίσσειας ATP (2 mM). Η διάκριση μεταξύ ATP-ανταγωνιστικών και αλλοστερικών αναστολέων βασίζεται στην επίδραση της συγκέντρωσης του ATP στην τιμή IC_{50}. Οι ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς εμφανίζουν σημαντική αύξηση της τιμής IC_{50} παρουσία περίσσειας ATP, καθώς ανταγωνίζονται το υπόστρωμα για την ίδια θέση πρόσδεσης. Αντίθετα, οι αλλοστερικοί αναστολείς αναμένεται να επηρεάζονται ελάχιστα από την αύξηση της συγκέντρωσης του ATP.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστοί ανταγωνιστικοί αναστολείς της PI3Kα LY294002 και Wortmannin. Η ένωση LY294002 αποτελεί χαρακτηριστικό ATP-ανταγωνιστικό αναστολέα, ενώ η Wortmannin είναι ένας αναστολέας που συνδέεται ομοιοπολικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Πράγματι, όπως επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.18 και 4.19, η αύξηση της συγκέντρωσης ATP συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της ανασταλτικής ισχύος και των δύο γνωστών αναστολέων. Συγκεκριμένα, για την ένωση LY294002 η μείωση της ανασταλτικής ισχύος ήταν τόσο δραματική που δεν επέτρεψε τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} παρουσία 2 mM ATP, ενώ για τη Wortmannin η τιμή IC_{50} αυξήθηκε 35 φορές (από 1,6 nM παρουσία 100 μM ATP αυξήθηκε σε 57 nM παρουσία 2 mM ATP).



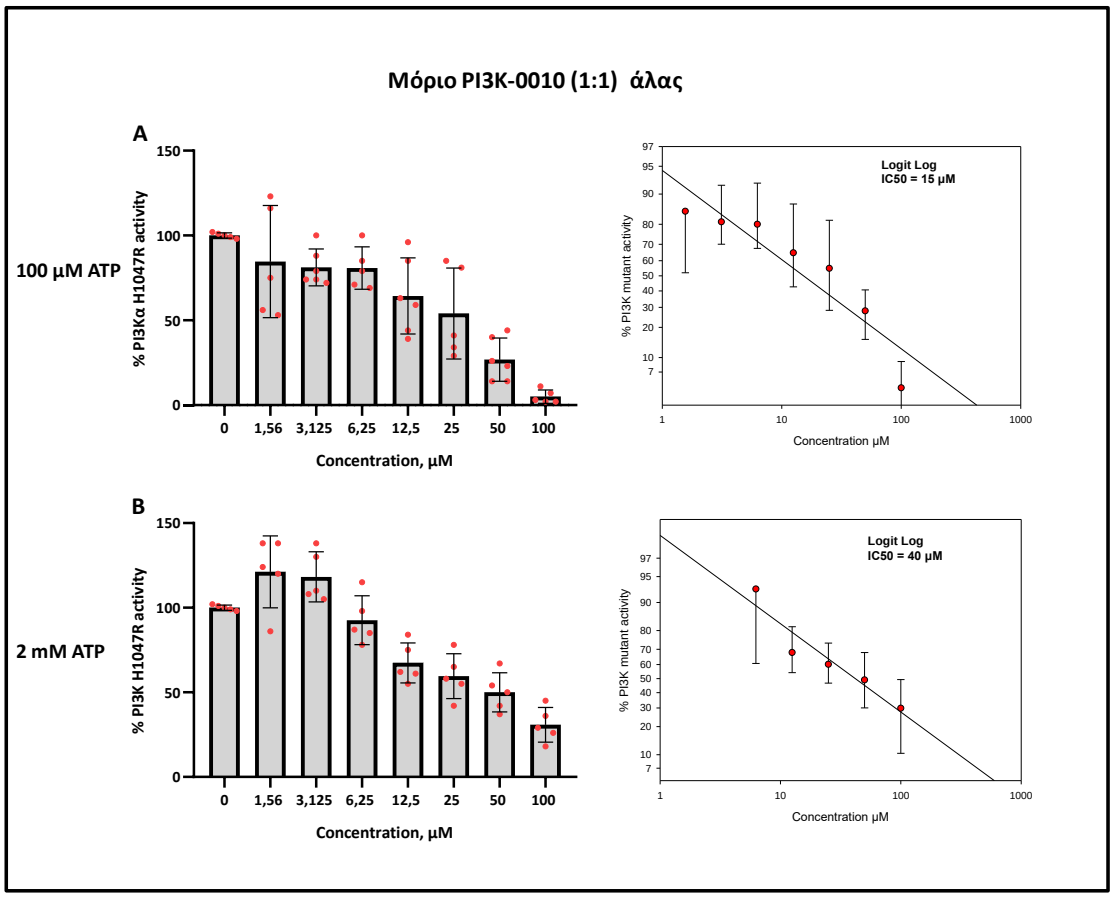
Εικόνα 4.18. Προσδιορισμός της τιμής IC_{50} του αναστολέα LY294002 έναντι της κινάσης φυσικού τύπου (WT) σε χαμηλή (100 μM) (A) και υψηλή (2 mM) (B) συγκέντρωση ATP. *Η τιμή IC_{50} υπολογίστηκε από την καμπύλη συγκέντρωσης–απόκρισης παρουσία 100 μM ATP, ενώ σε 2 mM ATP παρατηρείται μειωμένη αναστολή της κινάσης, συμβατή με ATP-ανταγωνιστικό μηχανισμό δράσης. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*



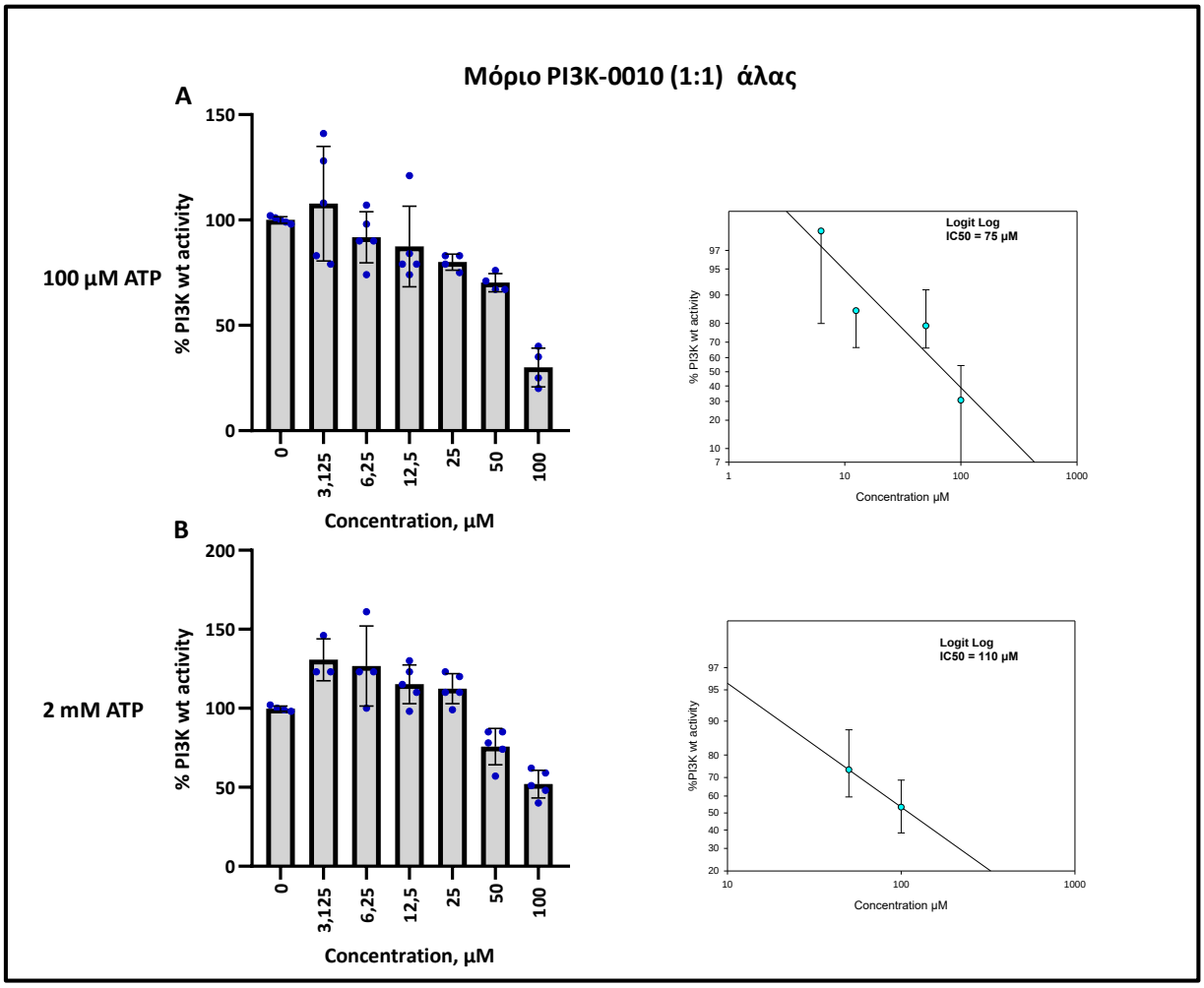
Εικόνα 4.19 Προσδιορισμός της ανασταλτικής δράσης της Wortmannin έναντι της PI3Kα φυσικού τύπου (WT) παρουσία 100 μM (A) και 2 mM (B) ATP. *Οι αντίστοιχες καμπύλες συγκέντρωσης–απόκρισης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών IC_{50}. Τα δεδομένα προέρχονται από δύο (A) και τέσσερα (B) ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*

Σε αντίθεση με τους δύο πρότυπους αναστολείς, το PI3K-0010 παρουσίασε σαφώς μικρότερη μεταβολή της IC_{50} μετά από αύξηση της συγκέντρωσης του ATP, και πιο συγκεκριμένα παρουσίασε μόνο 2,5 φορές αύξηση της τιμής IC_{50} έναντι της μεταλλαγμένης μορφής H1047R (από 15 μM σε 40 μM, Εικόνα 4.20) και περίπου 1,5

φορές έναντι της φυσικού τύπου μορφής (από 75 μM σε 110 μM, Εικόνα 4.21). Οι σχετικά μικρές μεταβολές στις τιμές IC_{50} υποδηλώνουν ότι η ανασταλτική δράση του PI3K-0010 δεν εξαρτάται άμεσα από τον ανταγωνισμό με το ATP και είναι συμβατές με αλλοστερικό ή, τουλάχιστον, μη αμιγώς ανταγωνιστικό μηχανισμό δράσης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τον αρχικό ορθολογικό σχεδιασμό του μορίου, το οποίο αναπτύχθηκε ώστε να στοχεύει περιοχή εκτός του ενεργού κέντρου (ATP-binding pocket). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα πειράματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP χρησιμοποιήθηκε διαφορετική παρτίδα (batch) του PI3K-0010 σε σχέση με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στον αρχικό χαρακτηρισμό του μορίου. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να συνέβαλε στις μικρές αποκλίσεις των απόλυτων τιμών IC_{50} σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα (Εικόνα 4.13 και Πίνακας 4.2). Ωστόσο, η διατήρηση της εκλεκτικότητας έναντι της H1047R υποστηρίζει ότι οι διαφορές αυτές δεν επηρεάζουν το βασικό συμπέρασμα της μελέτης.



Εικόνα 4.20. Προσδιορισμός της ανασταλτικής δράσης του μορίου PI3K-0010 (1:1) άλας έναντι της μεταλλαγμένης μορφής H1047R της PI3Kα παρουσία 100 μM (A) και 2 mM (B) ATP. *Οι αντίστοιχες καμπύλες συγκέντρωσης–απόκρισης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών* ***IC_{50}.*** *Τα δεδομένα προέρχονται από πέντε ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*



Εικόνα 4.21. Προσδιορισμός της ανασταλτικής δράσης του μορίου PI3K-0010 (1:1) άλας έναντι της PI3Kα φυσικού τύπου (WT) παρουσία 100 μM (A) και 2 mM (B) ATP. *Οι αντίστοιχες καμπύλες συγκέντρωσης–απόκρισης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών* ***IC₅₀.*** *Τα δεδομένα προέρχονται από πέντε ανεξάρτητα πειράματα με τριπλά δείγματα ανά συνθήκη και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD. Τα επιμέρους σημεία αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των επαναλήψεων κάθε ανεξάρτητου πειράματος.*

Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι το PI3K-0010 αναστέλλει την PI3Kα μέσω μηχανισμού που είναι διαφορετικός από τον κλασικό ανταγωνισμό μεταξύ αναστολέα υποστρώματος για σύνδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενισχύοντας την προοπτική αξιοποίησής του ως αφετηρίας για την ανάπτυξη εκλεκτικών αλλοστερικών αναστολέων έναντι της ογκογονικής PI3Kα H1047R.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

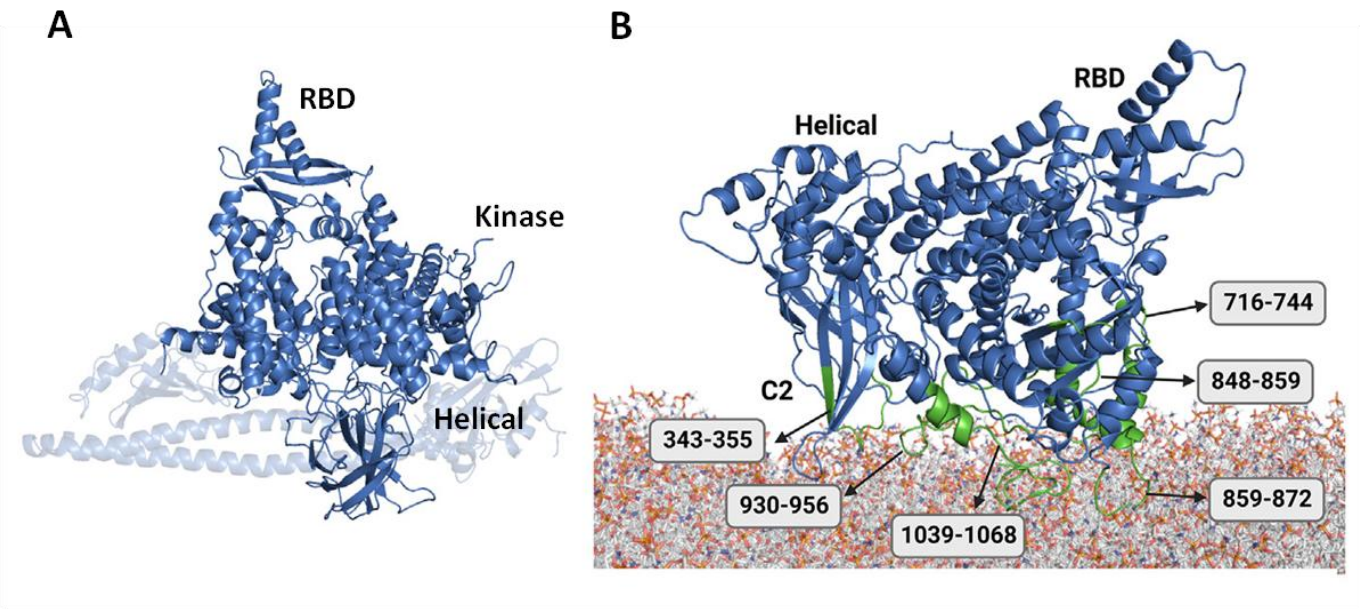
Οι hotspot μεταλλαγές E545K και H1047R του *PIK3CA* συγκαταλέγονται στις συχνότερες στον ανθρώπινο καρκίνο και συνδέονται με την υπερενεργοποίηση της PI3Kα και την ανάπτυξη ογκογόνων φαινοτύπων (48,57,59,60). Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της PI3Kα, καθώς και η ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων για την αναζήτηση εκλεκτικών αναστολέων, αποτελούν επομένως σημαντικούς στόχους για τη μελέτη και τη θεραπευτική στόχευση του μονοπατιού PI3K/AKT.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PI3Kα έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές βιοχημικές μέθοδοι, οι οποίες αξιοποιούν ραδιενεργές, φθορίζουσες, φωταυγείς ή χρωματομετρικές τεχνικές ανίχνευσης. Παρά τη χρησιμότητά τους, ορισμένες παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ασφάλεια, την πολυπλοκότητα, το κόστος ή την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού (92–94,99). Για τους λόγους αυτούς, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε μια νέα *in vitro*, cell-free δοκιμασία για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PI3Kα, βασισμένη στην εκλεκτική δέσμευση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, PIP_3, από την PH περιοχή της GRP1 (99). Η δοκιμασία ακολουθεί αρχή τύπου ELISA και, μετά τη βελτιστοποίησή της, παρουσίασε υψηλή ευαισθησία και ικανοποιητικό δυναμικό εύρος, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί με συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό και σε πολλαπλά δείγματα. Τα χαρακτηριστικά αυτά την καθιστούν κατάλληλη όχι μόνο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργότητας της PI3Kα, αλλά και για την αξιολόγηση μεγάλου αριθμού υποψήφιων αναστολέων.

Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό της δοκιμασίας που αναπτύξαμε είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το PIP_2 είτε ως λιπιδικό μόριο (με μακριές αλυσίδες ανθράκων) συνδεδεμένο σε μεμβράνες λιποσωμάτων, είτε ως πλήρως υδατοδιαλυτό υπόστρωμα με κοντές αλυσίδες ανθράκων. Κατά συνέπεια, η PI3Kα έχει τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνει το PIP_2 είτε στη διεπαφάνεια με τη μεμβράνη, είτε σε πλήρως διαλυτή φάση. Αξιοποιώντας τη δυνατότητα αυτή, και δεδομένου ότι οι ογκογόνες μεταλλαγές της PI3Kα συνδέονται με αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα σε σχέση με τη μορφή φυσικού τύπου, διερευνήσαμε τη σημασία που πιθανώς διαδραματίζει η σύνδεση του ενζύμου με την μεμβράνη στην καταλυτική υπερενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών. Για τον σκοπό αυτό, συγκρίναμε την ενεργότητα της PI3Kα με υπόστρωμα την λιπιδική μορφή του PIP_2, εντός μεμβρανικών λιποσωμάτων, σε σχέση με την ενεργότητα του ενζύμου όταν το υπόστρωμα βρίσκεται σε διαλυτή μορφή. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι το ℓPIP_2 ενσωματωμένο σε μεμβράνες αποτελεί αποτελεσματικότερο υπόστρωμα για την PI3Kα φυσικού τύπου (ειδική ενεργότητα 0,27 vs 0,18 pmol/min/ng) και για την H1047R (ειδική ενεργότητα 0,47 vs 0,1 pmol/min/ng), υπογραμμίζοντας τη σημασία του μεμβρανικού περιβάλλοντος για την ορθή αποτύπωση της ενζυμικής

δραστηριότητας. Η παρατήρηση αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική για τη μελέτη των ογκογόνων μεταλλαγών, καθώς επέτρεψε την αξιολόγηση της δραστικότητάς τους υπό συνθήκες που προσεγγίζουν περισσότερο το φυσιολογικό περιβάλλον δράσης του ενζύμου. Η εφαρμογή της δοκιμασίας στις hotspot μεταλλαγές E545K και H1047R ανέδειξε διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην υπερενεργοποίησή τους. Η E545K παρουσίασε αυξημένη ενεργότητα σε σχέση με την WT ανεξάρτητα από τη μορφή του υποστρώματος (μεμβρανικό ή υδατοδιαλυτό), γεγονός που είναι συμβατό με τον γνωστό μηχανισμό δράσης της συγκεκριμένης μεταλλαγής, η οποία επηρεάζει την αλληλεπίδραση της καταλυτικής υπομονάδας p110α με την ανασταλτική ρυθμιστική υπομονάδα p85α (66,68,69). Αντίθετα, η H1047R εμφάνισε αυξημένη ενεργότητα σε σχέση με τη WT μόνο παρουσία του λιπιδιακού PIP_2 (Εικόνα 4.8A και B). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η υπερενεργοποίηση της H1047R εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την αλληλεπίδραση της με τη μεμβράνη και από τη λιπιδική οργάνωση του υποστρώματος.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η διαφορετική συμπεριφορά της H1047R υποστηρίζεται από προηγούμενες δομικές και υπολογιστικές μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η μεταλλαγή μπορεί να επηρεάζει την αλληλεπίδραση της PI3Kα με τη μεμβράνη και να ευνοεί μια περισσότερο καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου (8,61,63,64,75). Ειδικότερα, σύμφωνα με το μοντέλο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.22, το C-τελικό άκρο της p110α (κατάλοιπα 1039–1068) αποτελεί μία από τις περιοχές που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη (39). Δεδομένου ότι η μεταλλαγή H1047R εντοπίζεται εντός αυτής της περιοχής, είναι πιθανό να επηρεάζει τη διαμόρφωση ή τις ιδιότητες της συγκεκριμένης περιοχής και, κατ' επέκταση, την αλληλεπίδραση της PI3Kα με τη μεμβράνη. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα πειράματα SPR της παρούσας μελέτης, τα οποία κατέδειξαν αυξημένη αλληλεπίδραση της H1047R με τη μεμβράνη, συγκριτικά με την WT (Εικόνα 4.9). Συγκεκριμένα, η H1047R παρουσίασε περίπου διπλάσιο ρυθμό σύνδεσης (K_{on}) σε σχέση με την WT. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης της ενζυμικής αντίδρασης, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ενισχυμένη πρόσδεση της H1047R στη μεμβράνη ενδέχεται να συμβάλλει στην αυξημένη καταλυτική της δραστηριότητα.



Εικόνα 4.22 Η ενεργή διαμόρφωση της PI3Kα και οι περιοχές της που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη. *Η τρισδιάστατη δομή της καταλυτικής υπομονάδας p110α της PI3Kα, από την οποία έχει αφαιρεθεί η περιοχή ABD, δημιουργήθηκε από τους με βάση τη δομή PDB ID: 7MYN* (114). ***A.*** *Προτεινόμενο μοντέλο της ενεργής διαμόρφωσης της PI3Kα, από το οποίο απουσιάζει η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στην περιοχή ABD και στην υπομονάδα p85α.* ***B*** *Το μοντέλο DABD σε μια προσομοιωμένη κυτταρική μεμβράνη, βασισμένο στη δομή PDB ID: 7MYN* (114). *Τα κατάλοιπα αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη απεικονίζονται με πράσινο χρώμα. Αναπαραγωγή από Kotzampasi et al* (39)

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ότι η λιπιδική οργάνωση του υποστρώματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αποτύπωση της δραστηριότητας της PI3Kα και, ιδιαίτερα στην περίπτωση της H1047R, φαίνεται να αποτελεί βασικό στοιχείο του μηχανισμού υπερενεργοποίησής της. Η δοκιμασία που αναπτύχθηκε παρέχει, επομένως, ένα λειτουργικό και ευέλικτο σύστημα για τη μελέτη της PI3Kα σε συνθήκες που προσεγγίζουν περισσότερο το φυσιολογικό λιπιδικό περιβάλλον, αλλά και για τη συστηματική αξιολόγηση υποψήφιων αναστολέων. Η τελευταία αυτή δυνατότητα αποτέλεσε το επόμενο βήμα της παρούσας διατριβής και αξιοποιήθηκε για τη σάρωση και τον χαρακτηρισμό ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι της PI3Kα.

Οι ενώσεις που εξετάστηκαν προέκυψαν από διαφορετικές προσεγγίσεις επιλογής, συμπεριλαμβανομένου του *de novo* σχεδιασμού και του εικονικού ελέγχου, καθώς και της αξιολόγησης βιβλιοθηκών φυσικών προϊόντων (το υπολογιστικό σκέλος της μελέτης πραγματοποιήθηκε από την ομάδα της ερευνήτριας Ζωής Κούρνια, ΙΙΒΕΑΑ). Η συνδυασμένη αυτή στρατηγική επέτρεψε την πειραματική διερεύνηση ενώσεων που είχαν επιλεγεί με βάση υπολογιστικά, δομικά ή χημειολογικά κριτήρια.

Κατά την πειραματική αξιολόγηση διαπιστώθηκε ότι η ανασταλτική δράση ορισμένων ενώσεων παρουσίαζε μεταβλητότητα μεταξύ ανεξάρτητων πειραμάτων. Η παρατήρηση αυτή ήταν περισσότερο εμφανής σε ενώσεις με μέτρια ή ασθενή δράση, ενώ μόρια που παρουσίαζαν ισχυρότερη αναστολή εμφάνιζαν γενικά πιο συνεπή συμπεριφορά. Η μεταβλητότητα αυτή μπορεί να σχετίζεται τόσο με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, όπως η περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα, όσο και με την ίδια τη φύση της δοκιμασίας, η οποία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της PI3Kα με ένα λιπιδικό υπόστρωμα και διαδοχικά στάδια ανίχνευσης. Για τον λόγο αυτό, η αξιολόγηση των υποψήφιων αναστολέων βασίστηκε σε επαναλαμβανόμενες ανεξάρτητες μετρήσεις και στη σύγκριση της δράσης τους έναντι της H1047R και της WT PI3Kα. Η προσέγγιση αυτή επέτρεψε την πιο αξιόπιστη διάκριση των ενώσεων με επαναλαμβανόμενη ανασταλτική δράση από εκείνες των οποίων η δράση δεν ήταν σταθερή και, παράλληλα, την αξιολόγηση της πιθανής εκλεκτικότητάς τους έναντι της H1047R μορφής.

Τα αποτελέσματα της σάρωσης ανέδειξαν ότι η ανασταλτική ισχύς και η εκλεκτικότητα δεν αποτελούν απαραίτητα αλληλένδετα χαρακτηριστικά των υποψήφιων ενώσεων. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση του PI3K-0024, το οποίο παρουσίασε ιδιαίτερα ισχυρή ανασταλτική δράση, χωρίς όμως να εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι της H1047R, ενώ αντίθετα τα PI3K-0010 και PI3K-0021 εμφάνισαν σαφέστερο προφίλ εκλεκτικότητας. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία της παράλληλης αξιολόγησης της ισχύος και της εκλεκτικότητας κατά την αναζήτηση αναστολέων που προορίζονται για τη στοχευμένη αναστολή ογκογονικών μορφών της PI3Kα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η επίδραση της υδροφιλικότητας και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ενώσεων στη βιολογική τους δράση. Η περίπτωση του PI3K-0104 και, αντίστοιχα, του PI3K-0048 δείχνει ότι η περιορισμένη διαλυτότητα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την αξιολόγηση μιας ένωσης σε ένα βιοχημικό σύστημα. Η βελτίωση της φυσικοχημικής συμπεριφοράς μέσω αλατοποίησης είχε ως αποτέλεσμα, σε ορισμένες περιπτώσεις, την ανάδειξη ανασταλτικής δράσης που δεν ήταν ανιχνεύσιμη στην αρχική μορφή της ένωσης. Ωστόσο, το γεγονός ότι η αλατοποίηση δεν βελτίωσε την απόδοση όλων των ενώσεων δείχνει ότι η επίδραση αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στη μετατροπή της ένωσης σε άλας, αλλά εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε μορίου. Επομένως, η αξιολόγηση της διαλυτότητας και της χημικής μορφής αποτελεί σημαντική παράμετρο ήδη από τα πρώτα στάδια της διαδικασίας επιλογής υποψήφιων αναστολέων.

Από την άλλη πλευρά, η διαφορετική συμπεριφορά των συνθετικών ενώσεων και των φυσικών προϊόντων παρέχει ενδιαφέρουσες πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα επίτευξης εκλεκτικότητας. Τα φυσικά προϊόντα που εξετάστηκαν παρουσίασαν γενικά σημαντική ανασταλτική δράση, αλλά χωρίς ουσιαστική

διαφοροποίηση μεταξύ WT και H1047R. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι, παρότι οι συγκεκριμένες ενώσεις μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα μόρια-οδηγούς για τη μελέτη της αναστολής της PI3Kα, απαιτείται περαιτέρω δομική βελτιστοποίηση προκειμένου να αποκτήσουν εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης μορφής. Αντίθετα, η προσέγγιση που βασίστηκε στον ορθολογικό σχεδιασμό και στην αξιολόγηση δομικά συγγενών ενώσεων φαίνεται να προσφέρει μεγαλύτερη δυνατότητα διερεύνησης της σχέσης μεταξύ χημικής δομής και εκλεκτικότητας.

Μεταξύ των ενώσεων που εμφάνισαν ανασταλτική δράση, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το PI3K-0010, το οποίο, με τη μορφή άλατος 1:1, αναδείχθηκε ως το πλέον υποσχόμενο μόριο-οδηγός, καθώς εμφάνισε ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της μεταλλαγμένης PI3Kα H1047R σε σύγκριση με την φυσικού τύπου πρωτεΐνη. Η μοριακή του δομή περιλαμβάνει έναν κεντρικό δακτύλιο πυριδίνης και δύο πλευρικά συμπυκνωμένα δικυκλικά συστήματα βενζιμιδαζολίου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν επίσης τα δύο ανάλογα PI3K-0021 και PI3K-0024. Ειδικότερα, και τα δύο ανάλογα διατηρούν τον κεντρικό δακτύλιο πυριδίνης, αλλά διαθέτουν απλούστερες πλευρικές ομάδες, οι οποίες συνδέονται μέσω αμιδικών δεσμών. Το PI3K-0024 φέρει δύο φαινυλικούς δακτυλίους με υδροξυλομάδες, ενώ το PI3K-0021 διαθέτει δύο πλευρικές βενζυλικές ομάδες. Οι τροποποιήσεις αυτές συνοδεύονται από διαφοροποίηση του ανασταλτικού προφίλ των ενώσεων, καθώς το PI3K-0021 εμφάνισε υψηλή εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης PI3Kα H1047R, ενώ το PI3K-0024 παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση σε νανομοριακές συγκεντρώσεις, χωρίς αντίστοιχη εκλεκτικότητα έναντι της μεταλλαγμένης μορφής. Η διαφοροποίηση αυτή υποδηλώνει ότι ακόμη και σχετικά περιορισμένες τροποποιήσεις των πλευρικών ομάδων μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τόσο την ανασταλτική ισχύ όσο και την εκλεκτικότητα των ενώσεων, αναδεικνύοντας τη σημασία της συστηματικής διερεύνησης της σχέσης δομής–δραστικότητας. Επιπλέον, ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση εμφάνισαν και ενώσεις με διαφορετική δομική αρχιτεκτονική, όπως το PI3K-0104 με τη μορφή άλατος, ένα παράγωγο κινολίνης που φέρει σουλφοναμιδική ομάδα, καθώς και ενώσεις της κατηγορίας των πυραζολοπυριδινών (NPC-1100 έως NPC-1124). Οι τελευταίες διαθέτουν επίσης συμπυκνωμένο ετεροκυκλικό πυρήνα που περιλαμβάνει δακτύλιο πυριδίνης, διαφοροποιούμενες ωστόσο ως προς τη συνολική δομική τους αρχιτεκτονική και τις πλευρικές τους ομάδες. Συνολικά, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι τροποποιήσεις στον πυριδινικό ετεροκυκλικό σκελετό και στους πλευρικούς υποκαταστάτες του μπορούν να αποτελέσουν σημαντική βάση για τη βελτιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης και την ανάπτυξη εκλεκτικότερων αναστολέων της PI3Kα, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μεταλλαγμένη ισομορφή H1047R. Οι χημικές δομές των ενώσεων που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στο Παράρτημα ΙΙ.

Πέρα από την ισχύ και την εκλεκτικότητα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης του PI3K-0010. Η σχετικά μικρή μεταβολή της IC_{50} παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ATP, αντίθετα δηλαδή από τη σαφή αύξηση που παρατηρήθηκε για τους γνωστούς αναστολείς wortmannin και LY294002, υποστηρίζει ότι η δράση του PI3K-0010 δεν εξαρτάται άμεσα από τον ανταγωνισμό με το ATP. Το αποτέλεσμα αυτό είναι συμβατό με έναν αλλοστερικό ή, γενικότερα, μη αμιγώς ATP-ανταγωνιστικό μηχανισμό. Παράλληλα, η παρατήρηση ότι το μόριο σχεδιάστηκε με στόχο περιοχή εκτός της θέσης πρόσδεσης του ATP ενισχύει την ερμηνεία αυτή.

Η πιθανή αυτή δράση του PI3K-0010 μέσω διαφορετικού μηχανισμού αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση της H1047R. Η μεταλλαγή αυτή επηρεάζει τη διαμόρφωση και την αλληλεπίδραση της PI3Kα με το μεμβρανικό περιβάλλον, όπως προέκυψε και από τα προηγούμενα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Επομένως, η στόχευση θέσεων εκτός του ATP-binding pocket ενδέχεται να προσφέρει μια διαφορετική δυνατότητα παρέμβασης στη λειτουργική κατάσταση του μεταλλαγμένου ενζύμου. Αν και τα πειράματα μεταβολής της συγκέντρωσης ATP δεν επαρκούν από μόνα τους για την πλήρη ταυτοποίηση της θέσης και του τρόπου πρόσδεσης του αναστολέα, παρέχουν σημαντική ένδειξη για έναν μηχανισμό που διαφοροποιείται από τον κλασικό ATP-ανταγωνισμό και δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη χρησιμότητα της νέας *in vitro* δοκιμασίας που εγκαθιδρύσαμε, με χρήση μεμβρανικού υποστρώματος, τόσο για τη μελέτη του μηχανισμού της καταλυτικής ενεργοποίησης των ογκογονικών μορφών της PI3Kα, όσο και ως εργαλείο για την ανακάλυψη και την αρχική φαρμακολογική αξιολόγηση υποψήφιων αναστολέων. Η εφαρμογή της σε ένα μεγάλο και ετερογενές σύνολο ενώσεων επέτρεψε την ιεράρχηση μορίων με βάση την ανασταλτική τους ισχύ, την αναπαραγωγιμότητα και την εκλεκτικότητά τους. Παράλληλα, ανέδειξε τη σημασία παραμέτρων όπως η διαλυτότητα και η χημική μορφή των ενώσεων, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν ουσιαστικά την πειραματική αξιολόγηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. J Cell Sci. 2014 Mar 1;127(5):923–8. doi:10.1242/jcs.093773

2. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat Rev Genet. 2006 Aug;7(8):606–19. doi:10.1038/nrg1879

3. Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Sep;20(9):515–34. doi:10.1038/s41580-019-0129-z

4. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 May;11(5):329–41. doi:10.1038/nrm2882

5. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. Nat Rev Cancer. 2015 Jan;15(1):7–24. doi:10.1038/nrc3860

6. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science. 2002 May 31;296(5573):1655–7. doi:10.1126/science.296.5573.1655

7. Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural Basis for Activation and Inhibition of Class I Phosphoinositide 3-Kinases. Sci Signal. 2011 Oct 18;4(195). doi:10.1126/scisignal.2002165

8. Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang CH, et al. A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3Kα and the membrane. Proc Natl Acad Sci. 2009 Oct 6;106(40):16996–7001. doi:10.1073/pnas.0908444106

9. Vadas O, Dbouk HA, Shymanets A, Perisic O, Burke JE, Abi Saab WF, et al. Molecular determinants of PI3Kγ-mediated activation downstream of G-protein–coupled receptors (GPCRs). Proc Natl Acad Sci. 2013 Nov 19;110(47):18862–7. doi:10.1073/pnas.1304801110

10. Schmid MC, Avraamides CJ, Dippold HC, Franco I, Foubert P, Ellies LG, et al. Receptor Tyrosine Kinases and TLR/IL1Rs Unexpectedly Activate Myeloid Cell PI3Kγ, A Single Convergent Point Promoting Tumor Inflammation and Progression. Cancer Cell. 2011 Jun;19(6):715–27. doi:10.1016/j.ccr.2011.04.016

11. Aydin E, Faehling S, Saleh M, Llaó Cid L, Seiffert M, Roessner PM. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling in the Tumor Microenvironment: What Do We Need to Consider When Treating Chronic Lymphocytic Leukemia With PI3K Inhibitors? Front Immunol. 2021 Jan 20;11:595818. doi:10.3389/fimmu.2020.595818

12. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL. Proliferative Defect and Embryonic Lethality in Mice Homozygous for a Deletion in the p110α Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. J Biol Chem. 1999 Apr;274(16):10963–8. doi:10.1074/jbc.274.16.10963

13. Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110β catalytic subunit of PI 3-kinase. Mamm Genome. 2002 Mar;13(3):169–72. doi:10.1007/BF02684023

14. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer. 2009 Aug;9(8):550–62. doi:10.1038/nrc2664

15. Sopasakis VR, Liu P, Suzuki R, Kondo T, Winnay J, Tran TT, et al. Specific Roles of the p110α Isoform of Phosphatidylinsositol 3-Kinase in Hepatic Insulin Signaling and Metabolic Regulation. Cell Metab. 2010 Mar;11(3):220–30. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.002

16. Margaria JP, Ratto E, Gozzelino L, Li H, Hirsch E. Class II PI3Ks at the Intersection between Signal Transduction and Membrane Trafficking. Biomolecules. 2019 Mar 15;9(3):104. doi:10.3390/biom9030104

17. Falasca M, Hamilton JR, Selvadurai M, Sundaram K, Adamska A, Thompson PE. Class II Phosphoinositide 3-Kinases as Novel Drug Targets: Miniperspective. J Med Chem. 2017 Jan 12;60(1):47–65. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00963

18. Rubino R, Squillero G, Prever L, Fantastico E, De Santis MC, Kahnamouei A, et al. Decoding class II PI3K signaling: From membrane identity to human disease. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids. 2026 Jan;1871(1):159693. doi:10.1016/j.bbalip.2025.159693

19. Gulluni F, De Santis MC, Margaria JP, Martini M, Hirsch E. Class II PI3K Functions in Cell Biology and Disease. Trends Cell Biol. 2019 Apr;29(4):339–59. doi:10.1016/j.tcb.2019.01.001

20. Yoshioka K. Class II phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in vesicular trafficking. Biochem Soc Trans. 2021 Apr 30;49(2):893–901. doi:10.1042/BST20200835

21. Burke JE, Triscott J, Emerling BM, Hammond GRV. Beyond PI3Ks: targeting phosphoinositide kinases in disease. Nat Rev Drug Discov. 2023 May;22(5):357–86. doi:10.1038/s41573-022-00582-5

22. Ohashi Y. Activation Mechanisms of the VPS34 Complexes. Cells. 2021 Nov 11;10(11):3124. doi:10.3390/cells10113124

23. He F, Nichols RM, Agosto MA, Wensel TG. Roles of class III phosphatidylinositol 3-kinase, Vps34, in phagocytosis, autophagy, and endocytosis in retinal pigmented epithelium. iScience. 2025 May;28(5):112371. doi:10.1016/j.isci.2025.112371

24. Vara JÁF, Casado E, De Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treat Rev. 2004 Apr;30(2):193–204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007

25. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2014 Feb;13(2):140–56. doi:10.1038/nrd4204

26. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002 Jul 1;2(7):489–501. doi:10.1038/nrc839

27. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell. 2007 Jun;129(7):1261–74. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009

28. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 2017 Mar;168(6):960–76. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004

29. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. Science. 2005 Feb 18;307(5712):1098–101. doi:10.1126/science.1106148

30. Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. Semin Cancer Biol. 2019 Dec;59:125–32. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.009

31. Sicurella M, De Chiara M, Neri LM. Hedgehog and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways Involvement in Leukemic Malignancies: Crosstalk and Role in Cell Death. Cells. 2025 Feb 13;14(4):269. doi:10.3390/cells14040269

32. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. Cell. 1997 Oct;91(2):231–41. doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5

33. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. Cell. 1999 Mar;96(6):857–68. doi:10.1016/S0092-8674(00)80595-4

34. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell. 2012 Apr;149(2):274–93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017

35. Garcia-Cao I, Song MS, Hobbs RM, Laurent G, Giorgi C, de Boer VCJ, et al. Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State. Cell. 2012 Mar;149(1):49–62. doi:10.1016/j.cell.2012.02.030

36. Lee YR, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Sep;19(9):547–62. doi:10.1038/s41580-018-0015-0

37. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. Front Endocrinol. 2018 Jul 9;9:338. doi:10.3389/fendo.2018.00338

38. Aquila S, Santoro M, Caputo A, Panno ML, Pezzi V, De Amicis F. The Tumor Suppressor PTEN as Molecular Switch Node Regulating Cell Metabolism and Autophagy: Implications in Immune System and Tumor Microenvironment. Cells. 2020 Jul 18;9(7):1725. doi:10.3390/cells9071725

39. Kotzampasi DM, Premeti K, Papafotika A, Syropoulou V, Christoforidis S, Cournia Z, et al. The orchestrated signaling by PI3Kα and PTEN at the membrane interface. Comput Struct Biotechnol J. 2022 Jan;20:5607–21. doi:10.1016/j.csbj.2022.10.007

40. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN Tumor Suppression. Cell. 2008 May;133(3):403–14. doi:10.1016/j.cell.2008.04.013

41. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. Front Oncol. 2015 Feb 16;5. doi:10.3389/fonc.2015.00024

42. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. Front Mol Neurosci. 2011;4. doi:10.3389/fnmol.2011.00051

43. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. Nat Med. 2002 Oct;8(10):1153–60. doi:10.1038/nm761

44. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, et al. Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):3892–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2904

45. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer. 2020 Feb;20(2):74–88. doi:10.1038/s41568-019-0216-7

46. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, et al. Akt/PKB Regulates Actin Organization and Cell Motility via Girdin/APE. Dev Cell. 2005 Sep;9(3):389–402. doi:10.1016/j.devcel.2005.08.001

47. Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci. 2010 Feb 23;107(8):3522–7. doi:10.1073/pnas.0910179107

48. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The Structure of a Human p110α/p85α Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3Kα Mutations. Science. 2007 Dec 14;318(5857):1744–8. doi:10.1126/science.1150799

49. Zhang M, Jang H, Nussinov R. The structural basis for Ras activation of PI3Kα lipid kinase. Phys Chem Chem Phys. 2019;21(22):12021–8. doi:10.1039/C9CP00101H

50. Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel LM. Insights into the oncogenic effects of /PIK3CA/ mutations from the structure of p110α/p85α Cell Cycle. 2008 May;7(9):1151–6. doi:10.4161/cc.7.9.5817

51. Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. Nature. 1999 Nov;402(6759):313–20. doi:10.1038/46319

52. Zhang X, Vadas O, Perisic O, Anderson KE, Clark J, Hawkins PT, et al. Structure of Lipid Kinase p110β/p85β Elucidates an Unusual SH2-Domain-Mediated Inhibitory Mechanism. Mol Cell. 2011 Mar;41(5):567–78. doi:10.1016/j.molcel.2011.01.026

53. Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. Trends Biochem Sci. 2015 Feb;40(2):88–100. doi:10.1016/j.tibs.2014.12.003

54. Burke JE, Williams RL. Dynamic steps in receptor tyrosine kinase mediated activation of class IA phosphoinositide 3-kinases (PI3K) captured by H/D exchange (HDX-MS). Adv Biol Regul. 2013 Jan;53(1):97–110. doi:10.1016/j.jbior.2012.09.005

55. Burke JE. Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease. Mol Cell. 2018 Sep;71(5):653–73. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.005

56. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2009 Feb 1;4(1):127–50. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311

57. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers. Science. 2004 Apr 23;304(5670):554–554. doi:10.1126/science.1096502

58. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. Oncogene. 2005 Feb 17;24(8):1477–80. doi:10.1038/sj.onc.1208304

59. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. Proc Natl Acad Sci. 2005 Jan 18;102(3):802–7. doi:10.1073/pnas.0408864102

60. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, et al. Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. Cancer Res. 2005 Jun 1;65(11):4562–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4114

61. Jenkins ML, Ranga-Prasad H, Parson MAH, Harris NJ, Rathinaswamy MK, Burke JE. Oncogenic mutations of PIK3CA lead to increased membrane recruitment driven by reorientation of the ABD, p85 and C-terminus. Nat Commun. 2023 Jan 12;14(1):181. doi:10.1038/s41467-023-35789-6

62. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. Proc Natl Acad Sci. 2008 Feb 19;105(7):2652–7. doi:10.1073/pnas.0712169105

63. Hon WC, Berndt A, Williams RL. Regulation of lipid binding underlies the activation mechanism of class IA PI3-kinases. Oncogene. 2012 Aug 9;31(32):3655–66. doi:10.1038/onc.2011.532

64. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110α (*PIK3CA*). Proc Natl Acad Sci. 2012 Sep 18;109(38):15259–64. doi:10.1073/pnas.1205508109

65. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, et al. Somatic Mutations in p85α Promote Tumorigenesis through Class IA PI3K Activation. Cancer Cell. 2009 Dec;16(6):463–74. doi:10.1016/j.ccr.2009.10.016

66. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit. Science. 2007 Jul 13;317(5835):239–42. doi:10.1126/science.1135394

67. Lee JY, Engelman JA, Cantley LC. PI3K Charges Ahead. Science. 2007 Jul 13;317(5835):206–7. doi:10.1126/science.1146073

68. Leontiadou H, Galdadas I, Athanasiou C, Cournia Z. Insights into the mechanism of the PIK3CA E545K activating mutation using MD simulations. Sci Rep. 2018 Oct 19;8(1):15544. doi:10.1038/s41598-018-27044-6

69. Galdadas I, Gervasio FL, Cournia Z. Unravelling the effect of the E545K mutation on PI3Kα kinase. Chem Sci. 2020;11(13):3511–5. doi:10.1039/C9SC05903B

70. Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, et al. AKT-Independent Signaling Downstream of Oncogenic PIK3CA Mutations in Human Cancer. Cancer Cell. 2009 Jul;16(1):21–32. doi:10.1016/j.ccr.2009.04.012

71. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. Nat Med. 2008 Dec;14(12):1351–6. doi:10.1038/nm.1890

72. Chakrabarty A, Rexer BN, Wang SE, Cook RS, Engelman JA, Arteaga CL. H1047R phosphatidylinositol 3-kinase mutant enhances HER2-mediated transformation by heregulin production and activation of HER3. Oncogene. 2010 Sep 16;29(37):5193–203. doi:10.1038/onc.2010.257

73. Meyer DS, Brinkhaus H, Müller U, Müller M, Cardiff RD, Bentires-Alj M. Luminal Expression of *PIK3CA* Mutant H1047R in the Mammary Gland Induces Heterogeneous Tumors. Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4344–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3827

74. Carson JD, Van Aller G, Lehr R, Sinnamon RH, Kirkpatrick RB, Auger KR, et al. Effects of oncogenic p110α subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. Biochem J. 2008 Jan 15;409(2):519–24. doi:10.1042/BJ20070681

75. Gkeka P, Evangelidis T, Pavlaki M, Lazani V, Christoforidis S, Agianian B, et al. Investigating the Structure and Dynamics of the PIK3CA Wild-Type and H1047R Oncogenic Mutant. De Groot BL, editor. PLoS Comput Biol. 2014 Oct 23;10(10):e1003895. doi:10.1371/journal.pcbi.1003895

76. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 2013 Dec;6(1):88. doi:10.1186/1756-8722-6-88

77. Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 kinase in cancer. Pharmacol Ther. 2015 Feb;146:53–60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.006

78. Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, et al. Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. Mol Cell. 2000 Oct;6(4):909–19. doi:10.1016/S1097-2765(05)00089-4

79. Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2002 Jun;8(6):1957–63. PubMed PMID: 12060641.

80. Wetzker R, Rommel C. Phosphoinositide 3-Kinases as Targets for Therapeutic Intervention. Curr Pharm Des. 2004 Jun 1;10(16):1915–22. doi:10.2174/1381612043384402

81. Martini M, Ciraolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? Front Oncol. 2013;3. doi:10.3389/fonc.2013.00108

82. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. J Clin Oncol. 2010 Feb 20;28(6):1075–83. doi:10.1200/JCO.2009.25.3641

83. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for *PIK3CA* -Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. N Engl J Med. 2019 May 16;380(20):1929–40. doi:10.1056/NEJMoa1813904

84. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2–negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. Ann Oncol. 2021 Feb;32(2):208–17. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.011

85. Zumsteg ZS, Morse N, Krigsfeld G, Gupta G, Higginson DS, Lee NY, et al. Taselisib (GDC-0032), a Potent β-Sparing Small Molecule Inhibitor of PI3K, Radiosensitizes Head and Neck Squamous Carcinomas Containing Activating *PIK3CA* Alterations. Clin Cancer Res. 2016 Apr 15;22(8):2009–19. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2245

86. Mayer IA, Abramson VG, Formisano L, Balko JM, Estrada MV, Sanders ME, et al. A Phase Ib Study of Alpelisib (BYL719), a PI3Kα-Specific Inhibitor, with Letrozole in ER+/HER2− Metastatic Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2017 Jan 1;23(1):26–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0134

87. Dickler MN, Saura C, Richards DA, Krop IE, Cervantes A, Bedard PL, et al. Phase II Study of Taselisib (GDC-0032) in Combination with Fulvestrant in Patients with HER2-Negative, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2018 Sep 15;24(18):4380–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0613

88. Ketcham JM, Harwood SJ, Aranda R, Aloiau AN, Bobek BM, Briere DM, et al. Discovery of Pyridopyrimidinones that Selectively Inhibit the H1047R PI3Kα Mutant Protein. J Med Chem. 2024 Mar 28;67(6):4936–49. doi:10.1021/acs.jmedchem.4c00078

89. Jhaveri KL, Im SA, Saura C, Loibl S, Kalinsky K, Schmid P, et al. Overall Survival with Inavolisib in *PIK3CA* -Mutated Advanced Breast Cancer. N Engl J Med. 2025 Jul 10;393(2):151–61. doi:10.1056/NEJMoa2501796

90. Varkaris A, Fece De La Cruz F, Martin EE, Norden BL, Chevalier N, Kehlmann AM, et al. Allosteric PI3Kα Inhibition Overcomes On-target Resistance to Orthosteric Inhibitors Mediated by Secondary *PIK3CA* Mutations. Cancer Discov. 2024 Feb 8;14(2):227–39. doi:10.1158/2159-8290.CD-23-0704

91. Ciraolo E, Perino A, Hirsch E. Measuring PI3K Lipid Kinase Activity. In: Kuster B, editor. Kinase Inhibitors [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cited 2026 Oct 22]. p. 55–67. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-337-0_4 doi:10.1007/978-1-61779-337-0_4

92. Knight ZA, Feldman ME, Balla A, Balla T, Shokat KM. A membrane capture assay for lipid kinase activity. Nat Protoc. 2007 Oct;2(10):2459–66. doi:10.1038/nprot.2007.361

93. Sugita H, Dan S, Kong D, Tomida A, Yamori T. A new evaluation method for quantifying PI3K activity by HTRF assay. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Dec;377(3):941–5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.083

94. Yanamandra M, Mitra S, Giri A. Development and application of PI3K assays for novel drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2015 Feb;10(2):171–86. doi:10.1517/17460441.2015.997205

95. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May;226(1):497–509. PubMed PMID: 13428781.

96. Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP. Signaling by Phosphoinositide-3,4,5-Trisphosphate Through Proteins Containing Pleckstrin and Sec7 Homology Domains. Science. 1997 Mar 28;275(5308):1927–30. doi:10.1126/science.275.5308.1927

97. Kavran JM, Klein DE, Lee A, Falasca M, Isakoff SJ, Skolnik EY, et al. Specificity and Promiscuity in Phosphoinositide Binding by Pleckstrin Homology Domains. J Biol Chem. 1998 Nov;273(46):30497–508. doi:10.1074/jbc.273.46.30497

98. Ferguson KM, Kavran JM, Sankaran VG, Fournier E, Isakoff SJ, Skolnik EY, et al. Structural Basis for Discrimination of 3-Phosphoinositides by Pleckstrin Homology Domains. Mol Cell. 2000 Aug;6(2):373–84. doi:10.1016/S1097-2765(00)00037-X

99. Gray A, Olsson H, Batty IH, Priganica L, Peter Downes C. Nonradioactive methods for the assay of phosphoinositide 3-kinases and phosphoinositide phosphatases and selective detection of signaling lipids in cell and tissue extracts. Anal Biochem. 2003 Feb;313(2):234–45. doi:10.1016/S0003-2697(02)00607-3

100. Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell. 2005 Jun;7(6):561–73. doi:10.1016/j.ccr.2005.05.014

101. Lindsay Y, McCoull D, Davidson L, Leslie NR, Fairservice A, Gray A, et al. Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. J Cell Sci. 2006 Dec 15;119(24):5160–8. doi:10.1242/jcs.000133

102. Corbin JA, Dirkx RA, Falke JJ. GRP1 Pleckstrin Homology Domain: Activation Parameters and Novel Search Mechanism for Rare Target Lipid. Biochemistry. 2004 Dec 1;43(51):16161–73. doi:10.1021/bi049017a

103. Barnett SF, Ledder LM, Stirdivant SM, Ahern J, Conroy RR, Heimbrook DC. Interfacial Catalysis by Phosphoinositide 3'-Hydroxykinase. Biochemistry. 1995 Oct 1;34(43):14254–62. doi:10.1021/bi00043a033

104. Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. Biochem J. 1993 Dec 1;296(2):297–301. doi:10.1042/bj2960297

105. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem. 1994 Feb;269(7):5241–8. doi:10.1016/S0021-9258(17)37680-9

106. Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, et al. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. J Biol Chem. 1993 May;268(13):9478–83. doi:10.1016/S0021-9258(18)98375-4

107. Papafotika A, Pavlaki M, Lazani V, Karamani VE, Aggelidis D, Kapella A, et al. A new functional assay reveals that membrane binding is critical for overactivation of the phosphoinositide 3-kinase H1047R mutant. J Biol Chem. 2026 Mar;302(3):111207. doi:10.1016/j.jbc.2026.111207

108. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. Oncogene. 2008 Sep 15;27(41):5486–96. doi:10.1038/onc.2008.244

109. Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. 2006.

110. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25. 1. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Mar;46(1–3):3–26. doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0

111. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J Med Chem. 2002 Jun 1;45(12):2615–23. doi:10.1021/jm020017n

112. Halgren TA. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability. J Chem Inf Model. 2009 Feb 23;49(2):377–89. doi:10.1021/ci800324m

113. Deems RA. Interfacial Enzyme Kinetics at the Phospholipid/ Water Interface: Practical Considerations. Anal Biochem. 2000 Dec;287(1):1–16. doi:10.1006/abio.2000.4766

114. Liu X, Yang S, Hart JR, Xu Y, Zou X, Zhang H, et al. Cryo-EM structures of PI3Kα reveal conformational changes during inhibition and activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Nov 9;118(45):e2109327118. doi:10.1073/pnas.2109327118 PubMed PMID: 34725156; PubMed Central PMCID: PMC8609346.