



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΤΡΑΠΕΖΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

«Ανάπτυξη αντικαρκινικών μορίων με δράση αναστολής των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A και ειδικότητα στόχευσης καρκινικών όγκων που εκφράζουν μεμβρανικούς διακομιστές οργανικών ανιόντων, πάνω στη βάση της δομής της μικροκυστίνης LR»

Βαλεντίνος Κουννής
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΤΡΑΠΕΖΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

«Ανάπτυξη αντικαρκινικών μορίων με δράση αναστολής των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A και ειδικότητα στόχευσης καρκινικών όγκων που εκφράζουν μεμβρανικούς διακομιστές οργανικών ανιόντων, πάνω στη βάση της δομής της μικροκυστίνης LR»

Βαλεντίνος Κουννής
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ**
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κουννή Βαλεντίνου: 17-2-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 658^α/7-4-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπριασούλης Ευάγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φωκάς Δημοσθένης Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπανικολάου Νικόλαος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-4-2009

«Ανάπτυξη αντικαρκινικών μορίων με δράση αναστολής των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A και ειδικότητα στόχευσης καρκινικών όγκων που εκφράζουν μεμβρανικούς διακομιστές οργανικών ανιόντων, πάνω στην βάση της δομής της μικροκυστίνης LR».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 757^α/19-12-2013

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσαταλάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
Παπανικολάου Νικόλαος	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
Παππάς Περικλής	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζάκος Ανδρέας	Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φωκάς Δημοσθένης	Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-2-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Η Γραμματέας του Τμήματος

Ανδρέας Φωτόπουλος

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αφιερώσεις

*Στη Μάνα μου Μηλίτσα,
στον Πατέρα-Παππού Τάκη,
στη Γιαγιά Φωτούλλα,
στο Δάσκαλο Ευάγγελο*

Σας αγαπώ και σας ευχαριστώ,

Βαλεντίνος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο πλαίσιο της ευρύτερης ερευνητικής δραστηριότητας του Κέντρου Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανίχνευση εξειδικευμένων μοριακών στόχων στον καρκίνο, την ανάπτυξη καινοτόμων στοχευμένων θεραπευτικών μορίων και την παράλληλη ερευνητική ενασχόληση με φυσικά βιοδραστικά μόρια, μου ανατέθηκε να αναπτύξω στο πλαίσιο εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής το παρόν ερευνητικό έργο, το οποίο εστιάζει στο ανεξερεύνητο πεδίο των *μικροκυστινών*. Οι *Μικροκυστίνες* είναι ευρέως διαδιδόμενα στα υδατικά συστήματα φυσικά κυκλικά επταπεπτίδια, γνωστά και ως κυανοτοξίνες.

Η επιλεκτική βιοδραστικότητα των κυκλικών αυτών πεπτιδίων οφείλεται α) στην επιλεκτική στόχευση κυττάρων που εκφράζουν διαμεμβρανικούς διακομιστές οργανικών ανιόντων (OATPs) οι οποίοι διαμεσολαβούν την είσοδο τους στο κύτταρο στόχο και β) στην ικανότητα τους να δεσμεύονται στις πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 και 2A (PP1 και PP2A) γεγονός που οδηγεί στην υπέρφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, τη λειτουργική καταστροφή του και τον κυτταρικό θάνατο.

Πέραν της επιλεκτικά στοχευμένης δράσης τους, οι *Μικροκυστίνες* παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες απο φαρμακολογική άποψη φυσικοχημικές ιδιότητες όπως είναι η αντοχή στο βρασμό, το σχετικά μικρό τους μέγεθος, η υδατοδιαλυτότητα τους και η παρατεταμένη σταθερότητα τους σε ουδέτερο pH.

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία αναπτύχθηκε σε τρεις κύριους άξονες που αφορούσαν: 1) στον έλεγχο της έκφρασης διαμεμβρανικών διακομιστών οργανικών ανιόντων σε καρκίνους ανθρώπου και κυτταρικές σειρές, 2) την *in vitro* διερεύνηση του δυναμικού πρόκλησης τοξικότητας της Μικροκυστίνης-LR σε καρκινικές και μη κυτταρικές σειρές 3) τον λογικό σχεδιασμό και την προπάθεια σύνθεσης μορίων *Μικροκυστίνης* συζευγμένων με κυτταροπροστατευτικά μόρια

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον επιβλέποντα, μέντορα, φίλο και πατέρα μου στη επιστήμη της Ιατρικής και της Ιατρικής έρευνας, καθηγητή Ευάγγελο Μπριασούλη που στάθηκε δίπλα μου κάθε στιγμή, για την απόλυτη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, και την αδιάλειπτη στήριξη και καθοδήγηση. Το γεγονός ότι ως εμπνευστής και θεμελιωτής της Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μου έδωσε την ευκαιρία να ζήσω μαζί του την εμπειρία της οικοδόμησης μιας ερευνητικής υποδομής με όραμα δεκαετιών, το εργαστήριο της οποίας μάλιστα είχα την τιμή να εγκαινιάσω με το έργο αυτής της διδακτορικής διατριβής, αποτελεί για εμένα δώρο και βίωμα ζωής. Ευχαριστώ επίσης θερμά και τους συν-επιβλέποντες καθηγητές Δρ Δημοσθένη Φωκά και Δρ Νικόλαο Παπανικολάου για τη συνεχή επικοινωνία, τις συμβουλές, την κατανόηση και την πολύτιμη καθοδήγηση.

Τους συνεργάτες και φίλους τον Δρ Ιωάννη Σαΐνη και τον Επίκουρο καθηγητή Δρ Ανδρέα Τζάκο για την αμέριστη στήριξη, βοήθεια και κατανόηση. Την Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Γ. Νοσοκομείου Χατζηκώστα για την βοήθεια που μου προσέφερε στην μελέτη έκφρασης των OATP σε αρχειακό υλικό νεοπλασιών των γαστρεντερικού σωλήνα. Τον Professor Bruno Steiger, Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, Switzerland για την ευγενή παραχώρηση σειρών διαμολυσμένων CHO κυττάρων που εκφράζουν OATP1B1 και

OATP1B3, καθώς και CHO-WT. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή Παναγιώτη Καναβάρο και Επικουρη Καθηγήτρια Βασιλική Γαλάνη, Τμήμα Ανατομίας – Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων για την ευγενική παραχώρηση εγκαταστάσεων του εργαστηρίου. Τις συμφοιτήτριες, φίλες που μοιράστηκαν μαζί μου για μια τριετία ερευνητικές επιτυχίες, αποτυχίες και αγωνίες στο διεπιστημονικό εργαστήριο ογκολογίας της Βιοτράπεζας Καρκίνου (iMOL) κυρίες Αναστασία Τούκα και Μαρία Ιγγλέζου για τη συμπαράσταση, την κατανόηση στις δύσκολες στιγμές και την αγάπη τους.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, Μηλίτσα, Τάκη και Φωτούλλα για την αμέριστη και ολοκληρωτική συμπαράσταση, τη στήριξη και όλες τις θυσίες που έκαναν για να μου δώσουν την ευκαιρία να σπουδάσω. Εύχομαι κάποτε να μπορέσω να σταθώ αντάξιος της αγάπης τους

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής οι παρακάτω εργασίες έχουν δημοσιευθεί στην διεθνή βιβλιογραφία ή βρίσκονται υπό κρίση:

1. Sainis I, Fokas D, Vareli K, Tzakos AG, Kounnis V, Briasoulis E: Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. *Marine drugs* 2010, 8(3):629-657.
2. Kounnis V, Ioachim E, Svoboda M, Tzakos A, Sainis I, Thalhammer T, Steiner G, Briasoulis E: Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets. *Oncotargets Ther* 2011, 4:27-32.
3. Hatzimichael E, Dasoula A, Kounnis V, Benetatos L, Lo Nigro C, Lattanzio L, Papoudou-Bai A, Dranitsaris G, Briasoulis E, Crook T: Bcl2-interacting killer CpG methylation in multiple myeloma: a potential predictor of relapsed/refractory disease with therapeutic implications. *Leuk Lymphoma* 2012, 53(9):1709-1713.
4. Buxhofer-Ausch V, Secky L, Wlcek K, Svoboda M, Kounnis V, Briasoulis E, Tzakos AG, Jaeger W, Thalhammer T: Tumor-Specific Expression of Organic Anion-Transporting Polypeptides: Transporters as Novel Targets for Cancer Therapy. *Journal of Drug Delivery* 2013, 2013:12.
5. Kounnis V, Chondrogiannis G, Mantzaris M, Galani V, Tzakos A, Fokas D, Papanikolaou NA, Sainis I., Briasoulis E: Microcystin LR a natural occurring cyanotoxin has activity against pancreatic cancer cells expressing the OATP1B3 transporter. *Submitted*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. Γενικά	9
2. Κυανοτοξίνες – Μικροκυστίνη.....	10
2.1. Κατηγορίες	10
2.2. Μικροκυστίνες	10
2.3. Μικροκυστίνες: βιογένεση, οικολογικός ρόλος και λειτουργία	11
2.4. Η βιολογική δράση των μικροκυστινών ως ξενοβιοτικά.....	11
3. MC-LR - κυτταρικοί μοριακοί στόχοι.....	13
4. Κυτταροτοξική επίδραση της MC-LR	15
4.1. Η δράση των Μικροκυστινών σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ιστούς...	15
4.2. Η δράση των μικροκυστινών σε καρκινικά κύτταρα	15
5. Πολυπεπτίδια Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων	16
5.1. Γενικά.....	16
5.2 Η υπερ-οικογένεια των OATP διακομιστών	18
5.3. Έκφραση των OATPs σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς	19
5.4. Η έκφραση των OATPs στον καρκίνο και η σημασία της.....	21
5.5. Έκφραση OATPs στον καρκίνο του μαστού.....	24
5.6 Έκφραση OATPs στον καρκίνο του προστάτη	24
5.7. OATPs στο αδενοκαρκίνωμα του εντέρου	26
5.8. Έκφραση OATPs στον παγκρεατικό καρκίνο.....	26
5.9. Έκφραση OATPs στον καρκίνο του ήπατος.....	26
5.10 Η υπερ-οικογένεια των OATPs: Ο ρόλος τους στη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων και ορμονών	27
5.11 Ρύθμιση της έκφρασης των OATPs.....	31
5.12 Οι OATPs ως “Κερκόπορτες” στον καρκίνο και η αξιοποίηση τους.....	32
6. Ανάλογα Μικροκυστινών: Δυνατότητες και Προοπτικές.....	34
6.1. Χημική συνδυαστική σύνθεση	34
6.2. Συνδυαστική συνολική βιοσύνθεση.....	37
6.3. Επιλεκτικότητα και Λειτουργία	37
7. Στοχευμένες θεραπείες για τον παγκρεατικό καρκίνο.....	39
ΣΚΟΠΟΣ.....	41
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	45
ΥΛΙΚΑ	45
1. Βιολογικό Υλικό	45
1.1 Δείγματα ιστού εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE).....	45
1.2 Φρεσκος κατεψυγμένος ανθρώπινος ιστός.....	45
1.3 Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες	45
1.4 Χαρακτηρισμένες – εμπορικά διαθέσιμες Κυτταρικές Σειρές.....	46
2. Αντισώματα Ανοσοϊστοχημείας και Western Blot	48
ΜΕΘΟΔΟΙ	49
1. Ανοσοϊστοχημεία.....	49
2. Απομόνωση ολικού RNA	49
3. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription) και σύνθεση cDNA	50
4. rtPCR.....	51
5. Western Blot.....	53

6. Έλεγχος τοξικότητας διάφορων παραγόντων (agents)	53
7. Εκτίμηση της διαδικασίας Απόπτωσης – Κυτταρομετρία Ροής.....	54
8. Λογισμικό.....	55
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
1. Πρωτεϊνική έκφραση διακομιστών οργανικών ανιόντων σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό.....	57
2. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs σε παγκρεατικό αδеноκαρκίνωμα.	58
3. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs σε αδеноκαρκίνωμα του εντέρου	60
4. Ενδεικτική μελέτη έκφρασης των OATPs σε διάφορους τύπους καρκίνου.....	61
5. Σχετική mRNA έκφραση του OATP1B3 σε in vitro καλλιέργεια κυτταρικών σειρών καρκίνου παγκρέατος.....	63
6. Έλεγχος επίδρασης και επιγενετικοί χειρισμοί για μεταβολή της έκφρασης των OATPs με την υπομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Azacytidine.....	64
7. Μελέτη της κυτταροτοξικής επίδρασης της MC-LR σε καρκινικές σειρές παγκρέατος.....	67
8. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε παγκρεατικές σειρές.....	69
9. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs – Western Blot / Densitometry.....	70
10. Έλεγχος τοξικότητας MC-LR, Gemcitabine και του συνδυασμού MC-LR/Gemcitabine σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	70
11. Έλεγχος της κυτταροπροστατευτικής δράσης/ικανότητας της N-acetylcystein	73
12. Προφίλ έκφρασης των OATPs σε ασθενή με πρωτοπαθές αδеноκαρκίνωμα του εντέρου και συνοδό ηπατική νόσο.	76
13. Μοντέλα Δομής και Πρόσδεσης.....	78
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	91
ABSTRACT	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά

Τα Κυανοβακτήρια εμφανίστηκαν πριν 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια περίπου, προκαλώντας σημαντική οικολογική αλλαγή μέσω φωτοχημικής απελευθέρωσης μοριακού οξυγόνου από το νερό στην ατμόσφαιρα (1, 2). Ο πληθυσμός των Κυανοβακτηρίων αποτελείται από 150 γένη και αριθμεί περίπου 2.000 είδη. Είναι προκαρυωτικά φύκια που απαντούν είτε ως μονοκύτταρα είδη (unicellular species) είτε ως αποικίες (σχήμα 1). Λόγω της φωτοσυνθετικής τους ιδιότητας, αποτελούν το πρώτο επίπεδο οργανισμών σε διατροφικές αλυσίδες υδάτινων οικοσυστημάτων.

Επιπλέον, αυτοί οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο θαλάσσιο κύκλο του αζώτου και έχουν επίσης ρόλο στη δυναμική εξισορρόπηση του αζώτου (N) και του CO₂ στη βιόσφαιρα (3). Εκτός από τους υποστηρικτικούς της ζωής ρόλους τους, ο ευτροφισμός ορισμένων ειδών κυανοβακτηρίων σε υδατικές δεξαμενές (τοξικά κυανοβακτήρια) έχουν δημιουργήσει αυξανόμενη ανησυχία για την υγεία ανθρώπων και ζώων, λόγω δυνητικών αρνητικών επιπτώσεων των τοξινών που παράγουν (4-7). Ως εκ τούτου, συστήνεται τακτική παρακολούθηση προαστιακών υδατοδεξαμενών για κυανοτοξίνες (8, 9). Στον άνθρωπο, τοξίκωση από κυανοτοξίνες μπορεί να προκαλέσει οξεία ηπατική βλάβη, νευροτοξικότητα, γαστρεντερικές διαταραχές και σε χρόνια έκθεση μικρών συγκεντρώσεων καρκίνο του ήπατος (10, 11).

Ωστόσο, από φαρμακολογική άποψη, οι στοχευμένες βιολογικές δραστηριότητες και χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες των κυανοτοξινών, τις καθιστούν υποψήφια χημικά μόρια για ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών κατά του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, τα κυκλοπεπτίδια των Κυανοβακτηρίων, μοιράζονται μια φαρμακοφόρο (pharmacophore) δομή που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας καινοτόμου κατηγορίας αντικαρκινικών φαρμάκων με δραστηριότητα σε ανθεκτικές σε χημειοθεραπεία μορφές μεταστατικού καρκίνου που εκφράζουν τους διακομιστές οργανικών ανιόντων, το πρωτεύοντα μοριακό στόχο αυτών των ενώσεων (12, 13).



Σχήμα 1. Τυπική αποικία κυανοβακτηρίων στη λίμνη Παμβώτιδα, Ιωαννίνων. A. *Anabaena* sp. B. *Microcystis* sp.

2. Κυανοτοξίνες – Μικροκυστίνη

2.1. Κατηγορίες

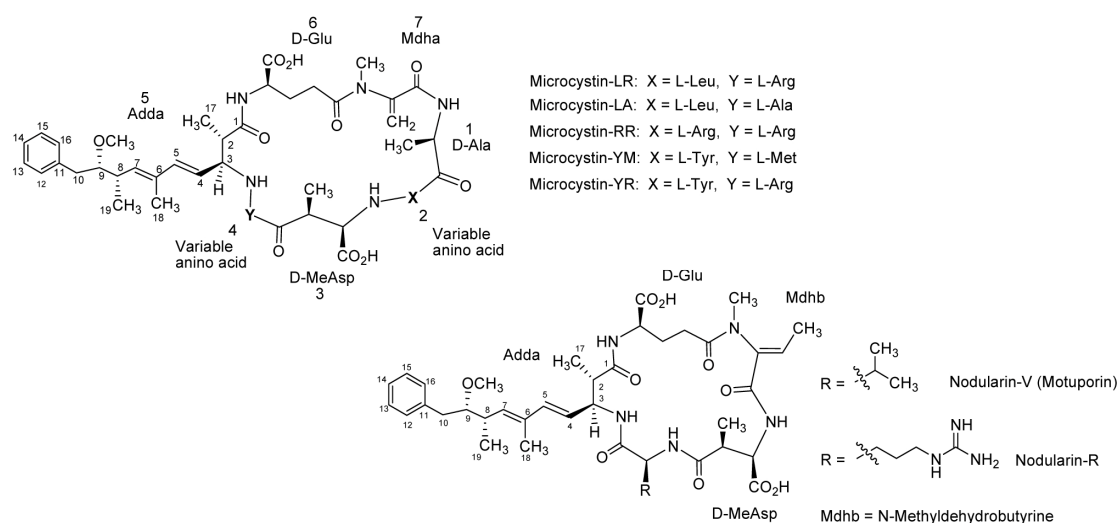
Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων (cyanotoxins) ανήκουν σε διάφορες τάξεις χημικών μορίων και μπορεί να προκαλέσουν ποικιλία μορφών κυτταρικής τοξικότητας, όπως νευροτοξικότητα από anatoxin-α, anatoxin-α (S) και saxitoxins, ηπατοτοξικότητα από microcystins, nodularins και cylindrospermopsins, και δερματίτιδα από lyngbyatoxin-α (14).

Μεταξύ των κυανοτοξινών, οι κυκλικές nodularins και microcystins είναι από τις πιο κοινές φυσικές τοξίνες που έχουν μελετηθεί και έχει αποδειχθεί ότι μοιράζονται παρόμοιους μηχανισμούς βιοχημικής δράσης. Και οι δύο είναι ισχυροί ανασταλτικοί παράγοντες πρωτεϊνικών φωσφατασών σερίνης-θρεονίνης PP1 και PP2A και επίσης δρουν προ-οξειδωτικά με δυναμική να προκαλούν οξειδωτικό στρες των κυττάρων μέσω της γένεσης αντιδραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (15, 16).

2.2. Μικροκυστίνες

Οι Microcystins είναι κυκλικά επταπεπτίδια με μοριακή μάζα που κυμαίνεται μεταξύ 500 και 4000 Da. Απομονώθηκαν αρχικά από το στέλεχος *Microcystis Aeruginosa* και πήραν το όνομά τους από αυτόν τον οργανισμό. Υψηλή περιεκτικότητα σε MC έχει βρεθεί επίσης σε άλλα είδη όπως τα *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, και *Aphanocapsa cyanobacterium* *Haphalosiphon* στο χώμα.

Οι MCs παράγουν μία σειρά από 60 διαφορετικά κυκλικά επταπεπτίδια με τη γενική δομή cyclo-(D-Ala-X-(D)-erythro-b-methyl-iso-Asp-Y-Adda-(D)-iso-Glu-N-methyldehydro-Ala-). Τα αμινοξέα αριθμούνται διαδοχικά από την (D)-αλανίνη (1) έως τη N-methyldehydroalanine (7), ενώ τα γράμματα X και Y αντιπροσωπεύουν μεταβλητές θέσεις στο μόριο που καταλαμβάνονται από φυσικά L-αμινοξέα (σχήμα 2) (17-19).



Σχήμα 2. Δομή των συχνότερα απομονωμένων MCs και Nodularins

Μεταξύ των διαφόρων παραλλαγών των MCs, η πλέον τοξική και κοινή μορφή είναι η MC-LR, στην οποία τα δύο μεταβλητά αμινοξέα είναι Λευκίνη και Αργινίνη (20). Η παρουσία του αμινοξέος Adda ([2S, 3S, 8S, 9S] -3-αμινο - 9 -Methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic οξύ), είναι ένα ασυνήθιστο διακριτικό δομικό χαρακτηριστικό των MCs (21). Το Adda διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική δραστηριότητα των MCs αφού υδρογόνωση ή οζονόλυση του διενικού δεσμού σε αυτή μονάδα καταλήγει σε ανενεργό προϊόν (22, 23). Επιπλέον, ακυλίωση του γλουταμικού καθιστά τις MCs λιγότερο ή και καθόλου τοξικές (24, 25).

Από φαρμακολογική άποψη η MC-LR διαθέτει διάφορες επιθυμητές ιδιότητες όπως διαλυτότητα στο νερό και εκτεταμένη σταθερότητα σε αρκετές μορφές χειρισμών. Η σταθερότητα τους σε φυσικό νερό είναι λιγότερο από μία εβδομάδα, αλλά είναι σταθερή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε φιλτραρισμένο ή απιονισμένο νερό (26, 27). Επιπλέον, η MC-LR παραμένει σταθερή ακόμα και μετά από αρκετές ώρες βρασμού και είναι επίσης ανθεκτική στη χημική υδρόλυση ή οξειδωση και σε ουδέτερο pH (28-30).

2.3. Μικροκυστίνες: βιογένεση, οικολογικός ρόλος και λειτουργία

Η σύνθεση των μικροκυστινών γίνεται από ένα συγκρότημα μη-ριβοσωμικών (nonribosomal) ενζύμων, όπως και τα περισσότερα κυανοβακτηριδιακά πεπτιδία, και κωδικοποιείται από το σύμπλεγμα των γονιδίων *microcystin (mcy)*. Το *mcy* εκτείνεται σε μια περιοχή μήκους ~ 55 kb και περιλαμβάνει γονίδια για πεπτιδικές συνθετάσες (peptide synthetases), πολυκετιδικές συνθετάσες (synthases polyketide), μικτές πεπτιδικές συνθετάσες και ανασυνδυαστικά ένζυμα (tailoring enzymes) (31). Ο οικολογικός τους ρόλος και η λειτουργία τους δεν είναι σαφώς διευκρινισμένα μέχρι σήμερα, αν και είναι κοινώς αποδεκτό ότι έχουν διάφορες δράσεις στο φυτοπλαγκτόν και στο ζωοπλαγκτόν (32, 33).

Έχει προταθεί ότι οι MCs έχουν εξελιχθεί για να αποτελέσουν μηχανισμό άμυνας των Κυανοβακτηρίων ενάντια σε διάφορους εισβολείς, μια θεωρία που έχει τεθεί σε συζήτηση μετά από πρόσφατα ευρήματα που δείχνουν ότι η συνθετάση των *microcystins* προηγήθηκε χρονικώς της μετα-ζωικής γενεαλογίας (34, 35). Άλλοι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι οι MCs παράγονται σε απάντηση απελευθέρωσης μεταβολιτών εξωκυττάρια από τα φυτοφάγα ζωοπλαγκτόν (36, 37) και ότι οι MCs μπορεί να δρουν επίσης απομακρύνοντας από το περιβάλλον μέταλλα, όπως ο σίδηρος (38).

2.4. Η βιολογική δράση των μικροκυστινών ως ξενοβιοτικά

2.4.1. Σε ζώα

2.4.1.1. Έκθεση σε ψηλές δόσεις μικροκυστίνης

Η πρώτη αναφορά για τη θανατηφόρο τοξικότητα σε ζώα που κατανάλωσαν νερό με υψηλά ποσοστά algal blooms αναφέρθηκε στην Αυστραλία πριν από 140 χρόνια (4). Αργότερα έγινε σαφές ότι η οξεία έκθεση σε MCs μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ηπατοκυτταρική βλάβη στα ζώα και ως εκ τούτου οι MCs χαρακτηρίστηκαν και ως ηπατοτοξίνες (hepatotoxins) (39, 40).

Έχει παρατηρηθεί σημαντική ποικιλότητα όσον αφορά την τοξικότητα και ευαισθησία των MCs μεταξύ διάφορων ζώων (41). Στα ποντίκια, η απο του στόματος (p.os) θανατηφόρα δόση που σκοτώνει το 50% του μελετούμενου πληθυσμού (LD50) για τη MC-LR κυμαίνεται από 5 έως 10 mg/Kg σωματικού βάρους (bw), σε σύγκριση με 0.1 mg/kg (bw) σε αρουραίους (42, 43). Η ενδοπεριτοναϊκή (i.p) LD50 της MC-LR σε ποντίκια και αρουραίους επίσης ποικίλλει, αλλά μια τιμή των 50-100 µg/gr bw είναι κοινώς αποδεκτή (11, 44). Όσον αφορά άλλα MCs το i.p LD50 για τις MC-LA, -YR και -YM είναι παρόμοια με εκείνη της MC-LR, αλλά το i.p LD50 για MC-RR είναι δέκα φορές υψηλότερο από εκείνο της MC-LR (5).

2.4.1.2. Χαμηλές δόσεις – χρόνια έκθεση

Η χρόνια έκθεση πειραματοζώων σε χαμηλότερες της θανατηφόρου δόσης MC, έχει αποδειχθεί ότι η προάγει την ογκογένεση (tumorigenesis) σε συνδυασμό με ανενεργό το p53 (45). Επιπλέον, η χρόνια έκθεση σε MC έδειξε να προάγει την ογκογένεση στο ήπαρ όταν ήδη έχει προκληθεί μεταλλαξιογένεση με καρκινογόνες ουσίες όπως η diethylnitrosamine (46), η azoxymethane (47) και ιδιαίτερα η aflatoxin B1 (48, 49).

2.4.2. Στον άνθρωπο

2.4.2.1. Οξεία έκθεση

Η δυνατότητα των MCs να προκαλέσουν θανατηφόρο τοξικότητα στον άνθρωπο περιγράφηκε μετά από ένα βιολογικό ατύχημα που συνέβη σε ένα κέντρο αιμοκάθαρσης στο Caruaru της Βραζιλίας το 1996. Συνολικά 100 από 131 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς οι οποίοι εκτέθηκαν τυχαία σε MC που είχε μολύνει την πηγή του νερού της αιμοκάθαρσης (δημοτική παροχή νερού) ανέπτυξαν οξεία ηπατική ανεπάρκεια, και οι 76 πέθαναν. Υπολογίστηκε ότι στο νερό που χρησιμοποιήθηκε για αιμοκάθαρση η συγκέντρωση της μικροκυστίνης ήταν 19,5 µg/L (50-52). Ένα άλλο περιστατικό έκθεσης σε MC ασθενών σε αιμοκάθαρση αναφέρθηκε λίγα χρόνια αργότερα στο Rio de Janeiro της Βραζιλίας. (53).

2.4.2.2. Χαμηλή δόση - Χρόνια Έκθεση

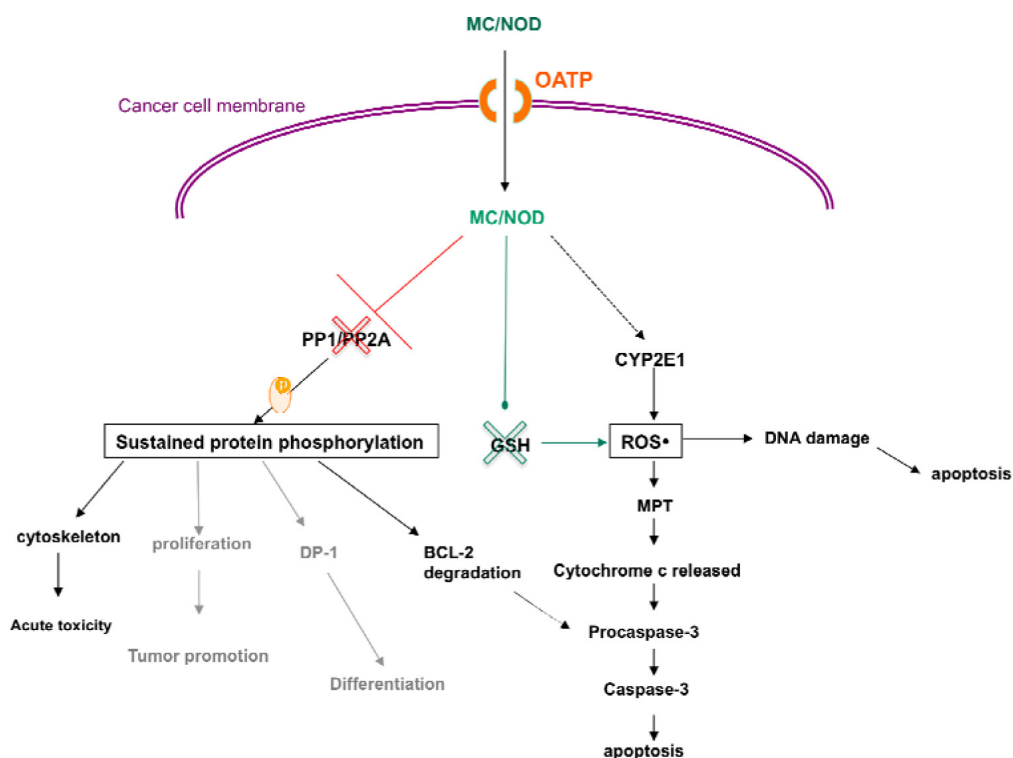
Δεδομένα απο χρόνια έκθεση ανθρώπων σε χαμηλές δόσεις MCs είναι περιορισμένα και προέρχονται κυρίως από επιδημιολογικές μελέτες. Συσχετίσεις μεταξύ περιστατικών υψηλής συχνότητα πρωτοπαθούς ηπατοκυτταρικού καρκίνου και κατανάλωσης πόσιμου νερού επιμολυσμένο με MC κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ορισμένες επαρχίες της Κίνας (54). Ομοίως, αυξημένη συχνότητα πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος καταγράφηκε την τελευταία δεκαετία σε ορισμένες περιοχές της Σερβίας όπου οι κάτοικοι έκαναν χρήση πόσιμου νερού από μολυσμένες με μικροκυστίνη δεξαμενές (55).

Τα επιδημιολογικά αυτά δεδομένα, στηρίζονται σε *in vivo* μελέτες και δείχνουν ότι η συνδυασμένη έκθεση σε αφλατοξίνη B1, λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας B και διαλείπουσα πρόσληψη MCs μπορούν να οδηγούν σε ηπατική καρκινογένεση (49, 54). Αυτές οι παρατηρήσεις και οι μελέτες για την τοξικότητα των MCs, οδήγησαν τον WHO (Παγκοσμίος Οργανισμός Υγείας) να θέσει ως ανώτατο ασφαλές επίπεδο συγκέντρωσης MC-LR για το πόσιμο νερό το 1 µg/L (11, 56).

3. MC-LR - κυτταρικοί μοριακοί στόχοι

Η υδρόφιλος δομή των περισσοτέρων μικροκυστινών κωλύει την ελεύθερη διάχυση τους μέσα από κυτταρικές μεμβράνες. Αντίθετα η πρόσληψη τους διαμεσολαβείται από το σύστημα Πολυπεπτιδικών Διακομιστών Οργανικών Ανιόντων (OATPs - Organic Anion Transporting Polypeptides) που διευκολύνει την εκλεκτική πρόσληψη και ενδοκυττάρωση των μικροκυστινών (57, 58). Επί του παρόντος, τα δεδομένα σχετικά με τη μεταφορά των διάφορων αναλόγων MCs από διαφορετικά μέλη της οικογένειας OATPs είναι περιορισμένα. Σύμφωνα με το τι είναι γνωστό σήμερα και ειδικότερα για την πλέον μελετημένη MC-LR έχει χαρακτηριστεί ως υπόστρωμα για τους OATP1A2, OATP1B1 και OATP1B3 (58).

Είναι γνωστό ότι στα θηλαστικά που καταναλώνουν νερό ή τρόφιμα που έχουν μολυνθεί με MCs, οι τοξίνες μεταφέρονται από το λεπτό έντερο στην κυκλοφορία του αίματος μέσω επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν τους ειδικούς OATPs, και απο εκεί στα ηπατοκύτταρα των περιπυλαίων περιοχών, που υπερεκφράζουν τους συγκεκριμένους OATPs. Οι τοξικές επιδράσεις στα ηπατοκύτταρα αποδίδεται γενικότερα στην διατάραξη της δυναμικής της αναστρέψιμης πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης μέσα απο την ισχυρή αναστολή των Πρωτεϊνικών Φωσφατασών (PP) τύπου 1 και 2α και τον ανεξέλεγκτο σχηματισμό υψηλών επιπέδων ROS (59-62) (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Μοριακοί στόχοι και δράση των κυανοβακτηριδιακών κυκλοπεπτιδίων στο καρκινικό κύτταρο.

(MC = microcystin, NOD = nodularin, OATP = Organic Anion Transporting Polypeptides, PP = protein phosphatase, MPT = Mitochondrial permeability transition,

ROS = reactive oxygen species, GSH = glutathione, CYP2E1 = Cytochrome P450 2E1, red cross symbol = inhibition, green cross symbol = consumption, black lines symbolize established action, grey lines symbolize likely actions).

Έχει αναφερθεί ότι η MC-LR προσδένεται ομοιοπολικά με μόρια κυστεΐνης (cysteine) των PP1 και PP2A (63). Η αναστολή των PP1 και PP2A οδηγεί σε υπερφοσφορυλίωση λειτουργικών και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και τελικά οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων (39, 64). Μακροσκοπικά, το ήπαρ γίνεται οιδηματώδες και αιμορραγικό και ο διαχωρισμός και διαταραχή του ηπατικού επιθηλίου είναι εκτεταμένη (65-67). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της MC-RR, που ενώ είναι εξίσου ισχυρός αναστολέας των PPs όπως και η MC-LR, χρειάζεται εντούτοις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις για να προκαλέσει παραμόρφωση των ηπατοκυττάρων και αυξημένη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Η μειωμένη ηπατοτοξικότητα της MC-RR φαίνεται ότι οφείλεται σε μειωμένη συγγένεια της τοξίνης με τους ειδικούς διακομιστές (68).

Σε χρόνια έκθεση χαμηλών δόσεων, οι MCs θεωρούνται υπεύθυνες για την προαγωγή της ογκογένεσης μέσω της αναστολής της λειτουργίας των PP1 και PP2A, οι οποίες ως γνωστόν διαθέτουν και ογκο-καταστατικές ιδιότητες (69). Η αναστολή των PPs οδηγεί σε μετατόπιση της ισορροπίας της διαδικασίας φωσφορυλίωσης/αποφοσφορυλίωσης προς την πλευρά της φωσφορυλίωσης γονιδίων στόχων. Για παράδειγμα, η PP2A έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της δραστηριότητας τουλάχιστον 50 πρωτεϊνικών κινάσων και συνεπώς η επίδραση ενός ισχυρού αναστολέα της δραστηριότητας της PP2A, είναι πιθανό να αποβεί επιβλαβής για το κύτταρο.

Η protein kinase C (PKC), η Akt, η extracellular signal-regulate kinase (ERK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), η IκB kinase, η p38 και η caspase-3 είναι μερικές από τις πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από την PP2A (46, 70-72).

Έχει επίσης δειχθεί ότι οι μικροκυστίνες ασκούν διάφορες γονιδιοτοξικές επιδράσεις όπως: κατακερματισμό του DNA, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, σχηματισμό μικροπυρήνων (micronuclei), απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) και γενετικές μεταλλάξεις (10, 73-75). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι γνωστό ότι είναι επιβλαβείς για το DNA. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αναφερθεί ότι τα κυκλοπεπτίδια των κυανοβακτηρίων παράγουν ελεύθερες ρίζες και μέσω αυτής της διαδικασίας μειώνονται τα ενδοκυττάρια επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) (76, 77). Επιπλέον, η ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) έκθεση ποντικών με nodularin κατάφερε να μειώσει την ενζυματική δραστηριότητα των superoxide dismutase, catalase, και glutathione peroxidase (78).

Οι μικροκυστίνες μπορούν επίσης να επηρεάσουν και άλλους ενδοκυττάριους στόχους εκτός της PP2A. Για παράδειγμα, η υπομονάδα h της ATP-synthase έχει αποδειχθεί ότι είναι μια δεσμευτική πρωτεΐνη των MCs και ως εκ τούτου, πιθανός στόχος στα ηπατικά κύτταρα (79). Ένας άλλος πιθανός στόχος των MCs θα μπορούσε να είναι η μιτοχονδριακή aldehyde dehydrogenase II, που εντοπίστηκε πρόσφατα ως πιθανός στόχος των μικροκυστινών στο ανθρώπινο ήπαρ (80). Λαμβάνοντας υπόψη τον σημαντικό ρόλο της aldehyde dehydrogenase II στην απομάκρυνση της επιβλαβούς ακεταλδεΐδης, αλλά και την πρόληψη σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου, η φυσική ένωση αυτού του ενζύμου με τις MCs μπορεί σε κάποιο βαθμό να εξηγήσει την ηπατοτοξικότητα των MCs.

4. Κυτταροτοξική επίδραση της MC-LR

4.1. Η δράση των Μικροκυστινών σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ιστούς

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες ηπατοκυττάρων από αρουραίους, που εκτέθησαν σε MC-LR για 24 και 72 ώρες, οι LC50 τιμές διαπιστώθηκε ότι ήταν 48 ng/mL και 8 ng/mL, αντίστοιχα. Επιπλέον, η έκθεση τους σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις MC-LR 2 ή 10 ng/ml για 3, 24 ή 48 h είχε ως αποτέλεσμα να σχηματιστούν ROS, όπως αποδείχθηκε από την οξεία αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (16). Εκχυλίσματα που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών (675–2700 nM MC-LR eq.) προκάλεσαν απόπτωση σε ηπατοκύτταρα αρουραίων και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Στα ηπατοκύτταρα των αρουραίων, αν και παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στα 30 λεπτά μετά από την έκθεση αποπτωτικές μορφολογικές αλλαγές, δεν παρατηρήθηκαν άλλες βιοχημικές μεταβολές.

Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές απόπτωσης παρατηρήθηκαν 24 h μετά από την αρχική έκθεση. Μια περίοδος επώασης 48 ωρών κρίθηκε ως η βέλτιστη για την εμφάνιση της ενδοπυρηνικών σωματιδίων (intranucleosomal) κατακερματισμένου DNA (81). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) βρέθηκαν να παίζουν κρίσιμο ρόλο στην mitochondrial permeability transition (MPT) διαδικασία μετά την έκθεση ηπατοκυττάρων αρουραίων σε MC-LR (82).

Υπερταχεία απόπτωση παρατηρήθηκε σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα μετά από μικροεγχύσεις (microinjection) τόσο MC-LR όσο και nodularin, που χαρακτηρίζεται από εξεσημασμένη κυτταροπλασματική συρρίκνωση, συμπίκνωση χρωματίνης, blebbing της κυτταρικής μεμβράνης και διάσπαση (cleavage) της procaspase-3 (83). Η διαπίστωση ότι η PP2A ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της BCL-2 έχει θεραπευτική σημασία. Ο Lin και συνεργάτες είχαν διαπιστώσει ότι η αναστολή της PP2A οδηγεί σε διαμεσολαβούμενο - από το πρωτεάσωμα - κατακερματισμό της υπερφωσφορυλιωμένης BCL-2 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (84).

Επιπλέον, δείχθηκε ότι φαρμακολογική αναστολή ή μέσω RNA-interference καταστολή έκφρασης της PP2A προκαλεί πρωτεασωμική διάσπαση (proteasomic degradation) της φωσφορυλιωμένης BCL-2 και επακόλουθη ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα πρόκλησης κυτταρικού θανάτου (85). Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι MC μπορεί να προάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν την BCL-2 μέσω μιας προσέγγισης που εστιάζει στην αναστολή της δράσης της PP2A. Η παραγωγή ROS και η επακόλουθη ζημία στο DNA συσχετίστηκαν με διαμεσολαβούμενη από MC τοξικότητα σε άλλα καλοήθη, μη-ηπατικά κύτταρα (86, 87).

4.2. Η δράση των μικροκυστινών σε καρκινικά κύτταρα

Για να θεωρηθούν οι μικροκυστίνες ως πιθανά υποψήφια μόρια για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, είναι απαραίτητο τα καρκινικά κύτταρα να επιδεικνύουν επιλεκτική ευαισθησία όταν εκτίθενται στις τοξίνες αυτές.

Δυστυχώς οι μέχρι στιγμής προσπάθειες για διερεύνηση των αντικαρκινικών επιδράσεων των MCs *in vitro* ήταν αδύνατη λόγω της υπο-έκφρασης των διακομιστών στις περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η απουσία συμφωνίας μεταξύ της έκφρασης των διακομιστών σε γενετικά τροποποιημένες (transformed) και σε ορθολογικές (ortholog) κυτταρικές σειρές αλλά και της αντίστοιχης έκφρασης στους ανάλογους ιστούς είναι ένα γνωστό πρόβλημα που αποδίδεται κυρίως στην μειορρύθμιση (down-regulation) της γονιδιακής έκφρασης τους όταν κύτταρα αναπτύσσονται και διατηρούνται σε καλλιέργεια (88, 89). Χαρακτηριστικά, σε φρέσκα απομονωμένα ηπατοκύτταρα από πέστροφες και ποντικούς, παρατηρήθηκε ταχεία απώλεια της έκφρασης των γονιδίων των OATPs η οποία συνέπεσε και με απώλεια της ευαισθησίας των κυττάρων αυτών στη Μικροκυστίνη (90).

Αντίθετα, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι μερικοί OATPs υπερ-εκφράζονται σε καρκινικούς ιστούς (91). Χαρακτηριστικά, η έκφραση των OATP1B1 και OATP1B3, όταν αξιολογήθηκε με τη μέθοδο western blot βρέθηκε θετική στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (92). Επιπλέον, η έκφραση των OATP1B1 και η OATP1B3 εντοπίστηκε σε μερικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από το ήπαρ, το παχύ έντερο, καθώς και από όγκους παγκρέατος (93).

Η Zegura και συνεργάτες έχουν διαπιστώσει ότι η βλάβη του DNA που προκαλείται από την MC-LR στην κυτταρική σειρά HepG2, σχετίζεται με μειωμένα ενδοκυττάρια επίπεδα γλουταθειόνης (77). Σε μια άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη αναλογία της έκφρασης του bax σε σχέση με το bcl-2 (bax:bcl-2 ratio) συνέπεια της έκθεσης σε MC-LR, παρατήρηση η οποία υποδηλώνει ότι η απόπτωση σε κύτταρα HepG2 επισυμβαίνει δια μέσου μιτοχονδριακών μονοπατιών (73). Επιπλέον, ο Monks και συνεργάτες, μετά από παρατήρηση ότι το mRNA του OATP1B3 υπερ-εκφράζεται σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, διαμόλυναν καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας τύπου HeLa με τους διακομιστές OATP1B1 και OATP1B3 για να δημιουργήσουν *in vitro* μοντέλα στα οποία θα μπορούσαν να μελετήσουν τη δράση των MCs. Τα διαμολυσμένα κύτταρα HeLa βρέθηκαν να είναι 1,000-φορές πιο ευαίσθητα στην MC-LR από τα κύτταρα-μάρτυρες (vector-transfected), δείχνοντας έτσι ότι η έκφραση των διακομιστών προσδίδει έντονη επιλεκτικότητα στην κυτταροτοξικότητα των MCs (12).

5. Πολυπεπίδια Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων

5.1. Γενικά

Τα Πολυπεπίδια Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων – OATPs, κωδικοποιούνται από τα *SLC21* γονίδια (οικογένεια OATP) και ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των *SCLO*.

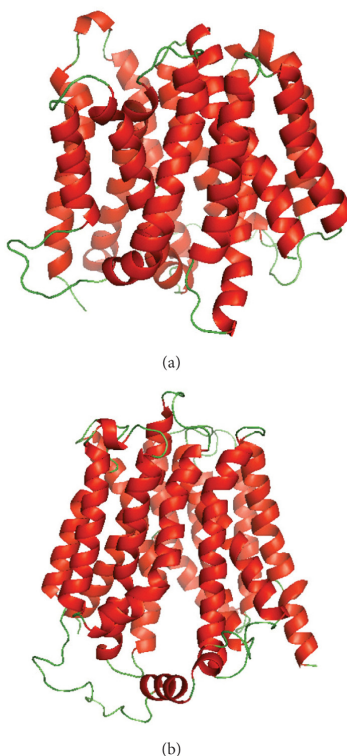
Κυριότερη γνωστή δράση τους είναι η διαμεσολάβηση της ενδοκυττάριας μεταφοράς μεγάλης ποικιλίας υποστρωμάτων (94). Οι OATPs ευνοούν τη νάτριο-ανεξάρτητη (sodium-independent) μεταφορά δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης ενδογενών μεταβολικών υποστρωμάτων όπως χολικών οξέων, στεροειδών και θυρεοειδικών ορμονών, προσταγλανδινών, κυκλικών νουκλεοτιδίων, φαρμάκων και ξενοβιοτικών ουσιών. Στον άνθρωπο, έχουν αναγνωρισθεί 11 μέλη της υπερ-οικογένειας των

OATPs, που διαιρούνται σε 6 οικογένειες, οι οποίες έχουν 40% ομοιότητα ακολουθίας αμινοξέων. Οι OATPs μοιράζονται σε μεγάλο βαθμό, μία κοινή αρχιτεκτονική με 12 διαμεμβρανικές περιοχές και ένα μεγάλο εξωκυττάριο βρόγχο (loop) μεταξύ της 9ης και 10ης διαμεμβρανικής περιοχής (σχήμα 4).

Ενώ οι οικογένειες OATP-3, -5, και -6 αποτελούνται από ένα μόνο μέλος, οι άλλες οικογένειες υποδιαιρούνται περαιτέρω σε υποοικογένειες, οι οποίες έχουν ομοιότητα ακολουθίας αμινοξέων σε βαθμό άνω του 60% (95). Οι OATPs που εκφράζονται με σαφή τρόπο σε ιστούς απεκκριτικών οργάνων (έντερο, ήπαρ και νεφρούς), βιολογικών φραγμών – συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου (Αιματο-Εγκεφαλικό Φραγμό), του μαστού, πλακούντα, αμφιβληστροειδή, ωοθηκών και στις γονάδες, συμβάλλουν στην απορρόφηση, κατανομή και απέκκριση ορμονών, φαρμάκων και των προϊόντων του μεταβολισμού τους. Οι OATPs λειτουργούν σε συνεργασία με κυτταρικά μεταβολικά ένζυμα «φάσης 1» (ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450) και της ένζυμα «φάσης 2» (glucuronosyltransferases, sulfotransferases, glutathione transferases κ.α.) καθώς και με αντλίες απέκκρισης (eflux pumps) (P-glycoprotein και breast cancer resistance protein ABCG2).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ πρόσληψης, βιομετατροπής και απέκκρισης επηρεάζει καθοριστικά τη κατανομή των φαρμάκων που είναι υποστρώματα για τους OATPs (96). Πλήθος ερευνητικών δεδομένων υποστηρίζουν ότι οι OATPs μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία διάφορων μορφών καρκίνου. Η *de novo* έκφραση των OATPs, όπως οι OATP1B1 και OATP1B3 που κανονικά εκφράζονται μόνο στο ήπαρ, επιβεβαιώθηκε σε αρκετούς τύπους καρκίνους (μαστού, παχέος εντέρου, παγκρέατος, στομάχου, προστάτη, οστών και ωοθηκών) (97-99).

Σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου, η έκφραση του OATP1B3 προσδίδει σαφή αντοχή της νόσου στη χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων όπως η paclitaxel (βλέπε σχήμα 6) (91). Επίσης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που βρίσκονται σε θεραπεία αποστέρησης ανδρογόνων, παραλλαγές του OATP1B3 με λειτουργικές διαταραχές, συνδέονται με μεγαλύτερο progression-free διάστημα και καλύτερη συνολική επιβίωση, που πιθανά οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη τεστοστερόνης από τα καρκινικά κύτταρα (100, 101). Φαρμακευτική αναστολή του OATP1B3 θα μπορούσε ενδεχόμενα, να αποδειχθεί κατάλληλη για ενδοκρινική αντικαρκινική θεραπεία. Ωστόσο, η αναστολή της λειτουργίας αυτού του διακομιστή για θεραπευτικούς σκοπούς ίσως να παρενέβαινε στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ με αποτέλεσμα την ελάττωση της απέκκριση της χολερυθρίνης, χολικών οξέων, φαρμάκων και τοξινών. Θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει διάφορες αλληλεπιδράσεις φαρμάκων δευτερογενώς, λόγω της παρεμπόδισης της ηπατικής πρόσληψης, βιομετατροπής και απέκκρισης των διάφορων OATP1B3-υποστρωμάτων (102).



Σχήμα 4. Τρισδιάστατη αναπράσταση των (a) OATP2B1 και (b) OATP1B3 με τη χρήση του λογισμικού Modeler 9.11 (San Francisco, CA, USA)

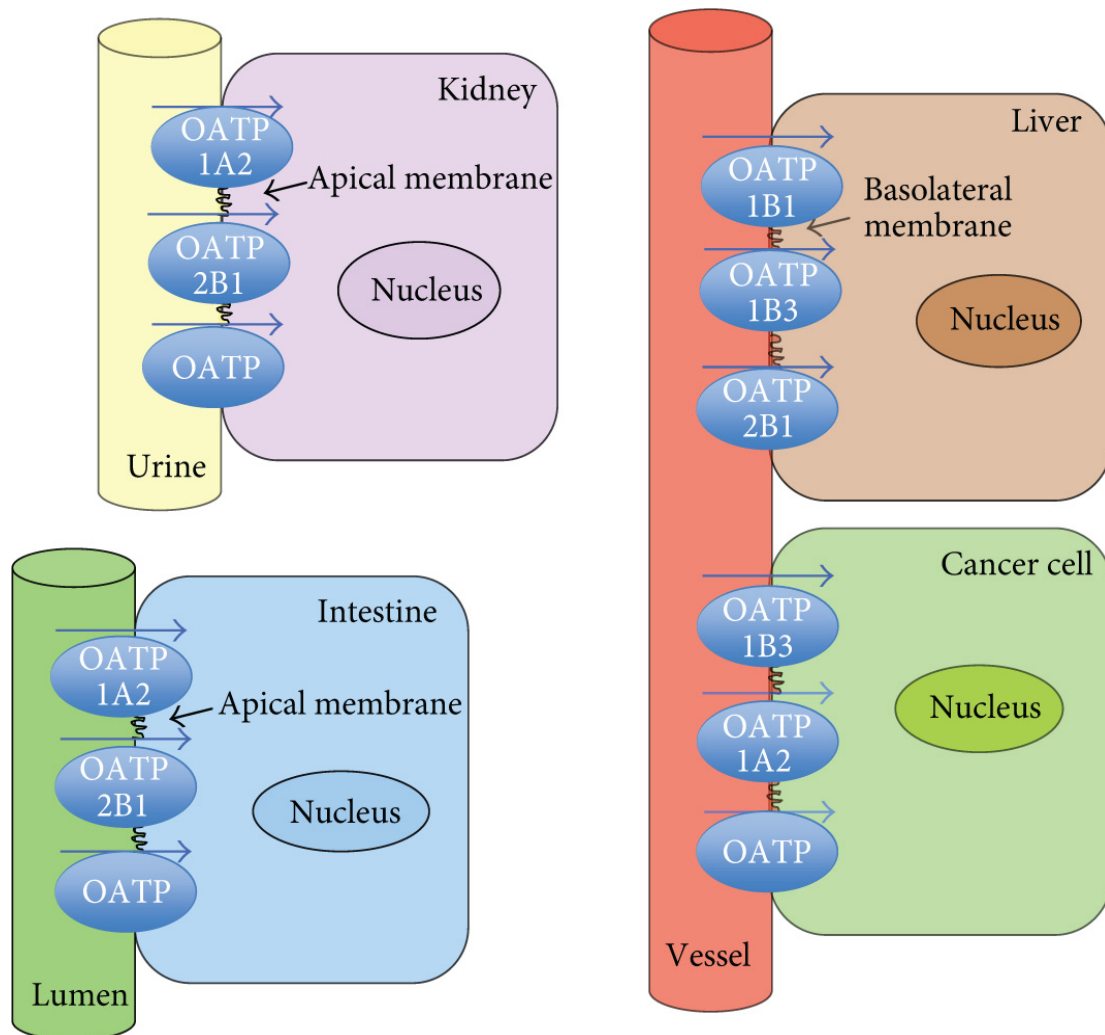
5.2 Η υπερ-οικογένεια των OATP διακομιστών

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των OATPs είναι η οικογένεια OATP1, και πιο συγκεκριμένα οι OATP1A2, OATP1B1, και OATP1B3 οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ενδοκυττάρια μεταφορά μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων, θυρεοειδικών ορμονών, προσταγλανδινών, χολικών οξέων και φαρμάκων όπως οι στατίνες και ορισμένα αντιβιοτικά και αντικαρκινικά φάρμακα (95). Το τέταρτο μέλος της οικογένειας, ο OATP1C1, θεωρείται ως ειδικός μεταφορέας της θυρεοειδικής ορμόνης (103), έχει όμως την ικανότητα να μεταφέρει και σύμπλοκα στεροειδών ορμονών (104).

Η οικογένεια OATP2, αποτελείται από δύο μέλη, τους OATP2A1 και OATP2B1. Ο OATP2A1 αναγνωρίστηκε αρχικά ως διακομιστής προσταγλανδινών (PGT). Πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση των επιπέδων των προσταγλανδινών (PG) σε ιστούς-στόχους, για παράδειγμα στους νεφρούς και στο παχύ έντερο (105). Ο OATP2B1 έχει μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων σε όξινο pH (pH 6.8) όπως για παράδειγμα διάφορα ενδογενή προϊόντα και φάρμακα, ενώ σε pH 7.4 έχει την ιδιότητα να μεταφέρει κυρίως συζευγμένες στεροειδείς ορμόνες (95).

Τα τυπικά για τους OATPs υποστρώματα όπως, προσταγλανδίνες και θυρεοειδικές ορμόνες μεταφέρονται επίσης από τους OATP3A1 και OATP4A1, αλλά με διαφορετική τάση (affinity). Για τον OATP3A1, έχουν ανιχνευθεί δύο splice-variants οι OATP3A1v1 και OATP3A1v2 που μεταφέρουν προσταγλανδίνες, θυροξίνη, βαζοπρεσίνη και πενικιλίνη (95). Επιπλέον υποστρώματα για το δεύτερο μέλος της οικογένειας 4, του

“kidney-specific” OATP4C1, ο οποίος είναι σημαντικός για την απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών, είναι τα κυκλικά νουκλεοτίδια, η μεθοτρεξάτη και άλλα κοινά OATP-υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων και των θυρεοειδικών ορμονών (106). Οι OATP5A1 και OATP6A1 δεν έχουν χαρακτηριστεί για συγκεκριμένη μεταφορική λειτουργία ακόμα. Κάποια πρώιμα στοιχεία δείχνουν ότι ο OATP5A1 πιθανά να εμπλέκεται με τη χημειοανθεκτικότητα του απο του στόματος αντικαρκινικού φαρμάκου satraplatin (107).



Σχήμα 5. Έκφραση των καλά χαρακτηρισμένων OATPs της οικογένειας 1 (OATP1A2, OATP1B1 και OATP1B3) και του OATP2B1 σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.

5.3. Έκφραση των OATPs σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς

Ανάλογα με τον τύπο της οικογένειας και της υποοικογένειας, ορισμένοι OATPs (πίνακας 1) έχουν ειδικότητα έκφρασης, δηλαδή, οι 1B1 και 1B3 βρέθηκαν να εκφράζονται στο ήπαρ (58, 92, 108, 109) και στα μονοπύρηννα κύτταρα (109), ενώ η έκφραση του *SLCO1B3* mRNA εντοπίστηκε και στον τράχηλο της μήτρας (109). Ο OATP6A1, επίσης γνωστός και ως ειδικός διακομιστής ανιόντων στις γονάδες, έχει

ανιχνευθεί κυρίως στους όρχεις (110, 111), αλλά επίσης και στο σπλήνα, στον εγκέφαλο, εμβρυϊκό εγκέφαλο και στον πλακούντα (111) (πίνακας 1).

Άλλοι OATPs δείχνουν λιγότερο ειδικό προφίλ έκφρασης. Ο OATP1A2 βρέθηκε στο ήπαρ (108, 112-114), στον εγκέφαλο (58, 108, 109, 113, 115, 116), τους νεφρούς (117), τον οφθαλμό (113), στον προστάτη (108) αλλά και στο μαζικό αδένα (118). Ο OATP1C1 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, τους όρχεις, την καρδιά, τον οφθαλμό και στο μαστό (109, 113, 116, 118). Ο OATP4C1 εντοπίστηκε στους νεφρούς (116, 119), στους πνεύμονες, το δέρμα, τα λευκά αιμοσφαίρια (ουδετερόφιλα, μονοπύρρηνα και περιφερειακά λευκοκύτταρα), το μαστό και το ήπαρ (109, 120). Ο OATP5A1 ανιχνεύθηκε κυρίως στον προστάτη, τους σκελετικούς μύες, το θύμο αδένα (109), στα περιφερικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (121), και το μαζικό αδένα (120). Άλλα μέλη των OATPs όπως οι 2A1, 2B1, 3A1 και 4A1 εκφράζονται γενικότερα χωρίς συγκεκριμένη εντόπιση (106, 109, 116, 122-127).

Ως εκ τούτου, ο εγκέφαλος και το ήπαρ φαίνεται να είναι οι ιστοί με την ισχυρότερη έκφραση OATPs μαζί με τους όρχεις, το μαστό και τους νεφρούς.

Approved gene symbol	Expression in human normal tissue	Expression in human tumor tissue
<i>SLCO1A2</i>	Liver (m; P), Brain (m), blood barrier (P), Kidney (m; P), Testis (m), Prostate (m), Breast (m), Retina (m)	Glioma (m;P); Bone tumors (m)
<i>SLCO1B1</i>	Liver (m; P), Mononuclear cells (m)	HCC (m; P); Colorectal Cancer (m)
<i>SLCO1B3</i>	Liver (m; P), Cervix (m), Mononuclear cells (m)	Colon Cancer (m; P); Breast cancer (P); Non Small Cell Lung Cancer (m); HCC (m; P)
<i>SLCO1C1</i>	Brain (m); Testis (m; P), Heart (m), Retina (m), Breast (m)	Glioma (m); Bone tumors (m)
<i>SLCO2A1</i>	Ubiquitous (protein detected only in GI tract tissue)	Colon cancer (m); Lung cancer (m); Bone tumor (m), Breast cancer (m)
<i>SLCO2B1</i>	Ubiquitous (protein detected only in liver tissue)	Glioma (m; P); Colon cancer (m); Lung cancer (m); Bone tumors (m); Breast cancer (m)
<i>SLCO3A1</i>	Ubiquitous and also in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (data available only on mRNA level)	Lung cancer (m); Colon cancer (m); Bone tumors (m); Breast cancer (m)
<i>SLCO4A1</i>	Ubiquitous (protein detected only in brain and placenta tissues)	Glioma (m); Lung cancer (m); colon cancer (m), Bone tumor (m); Breast cancer (m)
<i>SLCO4C1</i>	Kidney (m), Lung (m), Skin (m), PBMC (m), Kidney (m), Liver (m), Neutrophils (m), Breast (m), peripheral leukocytes (m)	Lung cancer (m); Bone tumor (m); Breast cancer (m)
<i>SLCO5A1</i>	Prostate (m), Skeletal muscles (m), Thymus (m), Classically activated macrophages (m), Breast (m).	Bone tumors (m); Breast cancer (m)
<i>SLCO6A1</i>	Testis (m), Spleen (m), Brain (m) (especially fetal brain), Placenta (m)	Non small cell lung cancer (m); Bladder cancer (m); Esophagus cancer (m); medulloblastoma (m)

Πίνακας 1. Έκφραση των OATPs σε επίπεδο πρωτεΐνης (P) και mRNA (m) σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ανθρώπινους ιστούς. Τα διαφορετικά χρώματα, καθορίζουν τις διαφορετικές υποοικογένειες.

5.4. Η έκφραση των OATPs στον καρκίνο και η σημασία της

5.4.1. Η ειδική έκφραση των OATPs στον καρκίνο μπορεί να επιτρέψει θεραπευτική στόχευση.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση των OATP1B1, OATP1B3, και OATP6A1 περιορίζεται σε ορισμένους ιστούς (σχήμα 5), αλλά αυτό το μοτίβο δεν διατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις (φλεγμονή, καρκίνος). Ενώ οι OATP1B1, OATP1B3 και OATP6A1 εκφράζονται στο φυσιολογικό ήπαρ και όρχεις αντίστοιχα, η κατάσταση στον καρκίνο είναι διαφορετική. Οι συγκεκριμένοι OATPs ανιχνεύονται σε έναν μεγάλο αριθμό μορφών καρκίνου. Για παράδειγμα, ο "ηπατο-ειδικός» διακομιστής OATP1B3 βρέθηκε ότι εκφράζεται επίσης σε καρκίνους παχέος εντέρου (128), παγκρέατος (129), μαστού (130), προστάτη (131), πνεύμονα (132) και ωοθηκών (96, 98).

Ο "ορχεο-ειδικός" OATP6A1 εκφράζεται επιπλέον σε καρκίνους ιδιαίτερα του πνεύμονα (133) και του εγκεφάλου (111). Η τροποποιημένη στους καρκίνους έκφραση των διακομιστών OATP μπορεί να χρησιμεύσει για διαγνωστικούς σκοπούς αλλά και για την ανάπτυξη στοχευμένων φαρμάκων.

5.4.2. Η έκφραση των OATPs και η σχέση τους με την εξέλιξη της νόσου του καρκίνου

5.4.2.1. Η δυνατότητα των OATPs να επηρεάζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των διάφορων χημειοθεραπευτικών στον καρκίνο.

Η πρόσληψη αντικαρκινικών φαρμάκων από συγκεκριμένους διακομιστές διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (α) στη κατανομή τους στους υγιείς ιστούς και (β) στην απέκκριση τους μέσω του ουροποιητικού συστήματος ή/και της χολής (134). Συνεισφέρουν επίσης στην επίτευξη των απαραίτητων - για την πρόκληση κυτταροτοξικότητας - ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων φαρμάκων λόγω της ειδικότητάς τους και το μεγάλος εύρος που διαθέτουν έναντι κυτταροτοξικών υποστρωμάτων (methotrexate, taxol, imatinib, irinotecan) (βλ. σχήμα 6). Μέχρι στιγμής, οι OATP1A2, OATP1B1, και OATP1B3 έχουν μελετηθεί διεξοδικά για τις διακομιστικές τους ιδιότητες στο πεδίο των αντικαρκινικών φαρμάκων με τη βοήθεια ωοκυττάρων *Xenopus laevis* ή καρκινικών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τους εν λόγω διακομιστές (99). Από τα δεδομένα που προκύπτουν είναι ξεκάθαρο ότι, η ειδική έκφραση OATPs στον καρκίνο είναι ικανή και υπεύθυνη για την πρόσληψη φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα για αυτούς. Ως εκ τούτου, το πρότυπο έκφρασης μπορεί να αποτελέσει καθοριστικό ρόλο στην ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων για συγκεκριμένα φάρμακα.

5.4.2.2. Ανθεκτικότητα στην απόπτωση μετά τη χημειοθεραπεία και OATPs

Μετά απο θεραπεία με τις ουσίες camptothecin και oxaliplatin, πιθανή υπερ-έκφραση του OATP1B3 φαίνεται να προσδίδει πλεονεκτήματα επιβίωσης για κυτταρικές σειρές που φέρουν το φυσικό γονίδιο p53 γονίδιο, μέσω τροποποίησης διάφορων μηχανισμών κυτταρικής επιβίωσης που εξαρτώνται από το p53 (91).

5.4.2.3. Οι OATPs μπορεί να συμβάλουν στην πρόσληψη στεροειδών ορμονών απο ορμονο-ευαίσθητους τύπους καρκίνου.

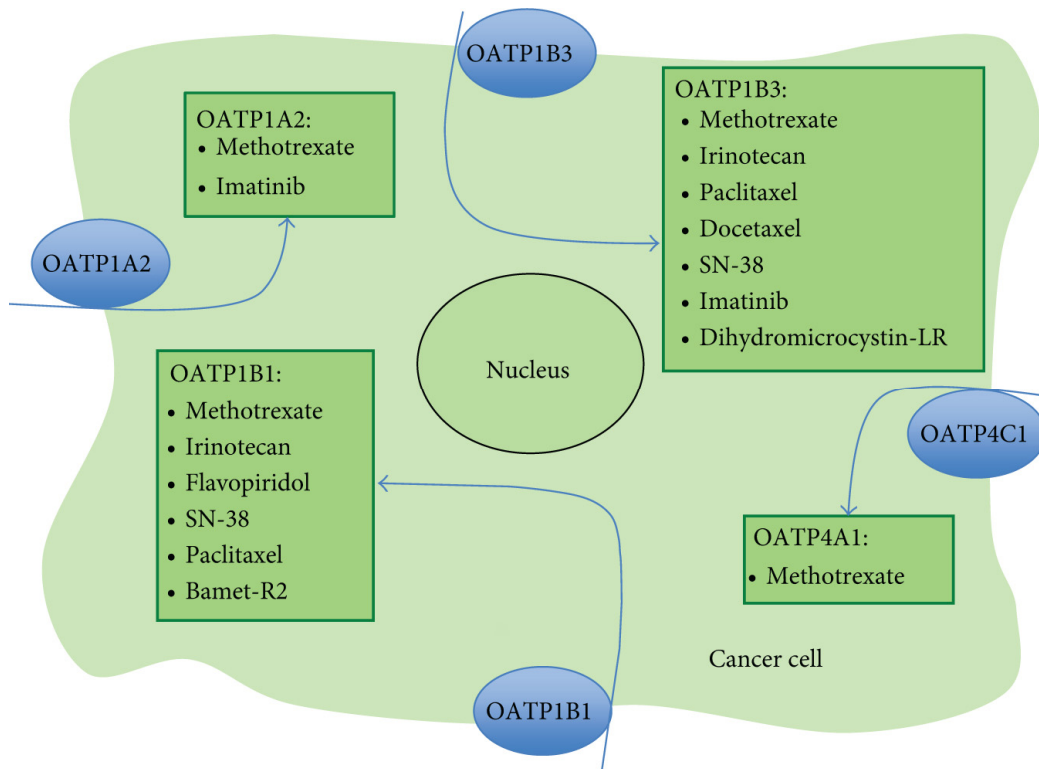
Οι πρόδρομες δομές στεροειδών ορμονών estron sulfate (E1S), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) καθώς και η τεστοστερόνη, αποτελούν υποστρώματα για διαφορετικούς OATPs (σχήμα 7). Υπερέκφραση αυτών των OATPs στον καρκίνο μπορεί να αυξήσει τα κυτταρικά επίπεδα ορμονών, για παράδειγμα, οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, τα οποία καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού ορμονο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων. Η E1S είναι μια από τις πιο διαδεδομένες πρόδρομες μορφές οιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και με κεντρικό ρόλο για στην ανάπτυξη ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων του μαστού (135). Επτά από τους έντεκα OATPs, διαπιστώθηκε ότι μπορούν να διαμεσολαβήσουν την πρόσληψη και διαμεμβρανική μεταφορά του E1S. Ο OATP1B3 για παράδειγμα, που εκφράζεται στον άνθρωπο και στην οιστρογονοεξαρτώμενη καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 βρέθηκε να συμβάλλει στην πρόσληψη E1S (130).

Επίσης η έκφραση των διακομιστών στεροειδών ορμονών OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, και OATP3A1 βρέθηκε να είναι υψηλότερη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού από ότι στην καλοήγη κυτταρική σειρά MCF10A. Επιπλέον, η OATP-διαμεσολαβούμενη E1S πρόσληψη, παρατηρήθηκε να λαμβάνει χώρα μόνο σε κακοήγη κύτταρα (136). Η ενισχυμένη έκφραση των συγκεκριμένων OATPs για τη μεταφορά οιστρογόνων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συσσώρευση στεροειδών ορμονών σε οιστρογόνο-ευαίσθητα καρκινικά κύτταρα.

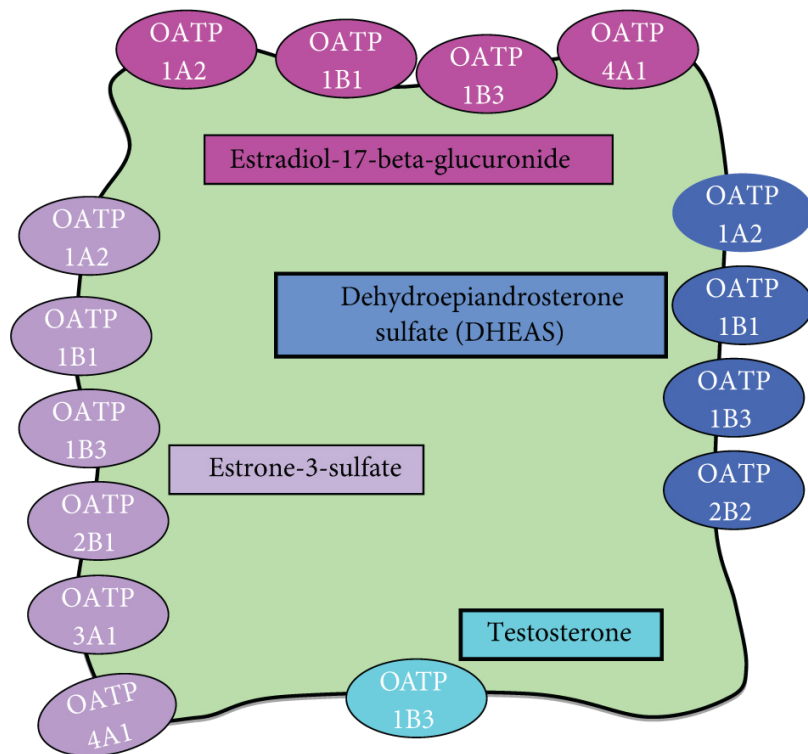
Ο OATP1A2 φαίνεται να έχει επίσης σημαντικό ρόλο και στον καρκίνο του προστάτη. Η ανάπτυξη της ανδρογονοευαίσθητης καρκινικής κυτταρικής σειράς του προστάτη LnCAP φαίνεται να ευνοείται από το DHEAS. Η πρόδρομος αυτή ένωση των στεροειδών ορμονών, προσλαμβάνεται απο τα κύτταρα αυτά με τη βοήθεια του OATP1A2 και εκεί μετατρέπεται μέσω της steroid sulfatase (STS), στην ενεργό DHEA. Έτσι, ο OATP1A2 μαζί με τη STS φαίνεται να αποτελούν πιθανό φαρμακολογικό στόχο στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη (137). Άλλοι σημαντικοί OATPs για την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη είναι ο OATP1B3 που διευκολύνει την πρόσληψη της τεστοστερόνης (σχήμα 7) και ο OATP2B1 του οποίου αποτελεί επίσης υπόστρωμα το DHEAS (99).

5.4.3. Η έκφραση των OATPs αποτελεί κλινικό προγνωστικό παράγοντα της έκβασης της νόσου

Σε ορισμένους όγκους, οι OATPs φαίνονται να έχουν συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης και υπάρχουν επίσης στοιχεία η έκφραση αυτή μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα πρόβλεψης για την εξέλιξη του όγκου. Για παράδειγμα, η λειτουργικότητα του OATP1B3 βρέθηκε να είναι ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για τον ανθρώπινο καρκίνο του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου.



Σχήμα 6. Επιλεγμένα αντικαρκινικά φάρμακα - υποστρώματα των διακομιστών οργανικών ανιόντων (95, 98, 99, 119)



Σχήμα 7. Μεταφορά στεροειδών ορμονών μέσω των OATPs (99)

5.5 Έκφραση OATPs στον καρκίνο του μαστού

Σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, βρέθηκε ότι ο OATP1B3 διατηρούσε ανιχνεύσιμη λειτουργικότητα στο 50% των εξεταζόμενων δειγμάτων. Η δε έκφραση του ήταν σημαντικά συσχετιζόμενη με τον ορμονοεξαρτώμενο μηχανισμό ανάπτυξης της νόσου. Οι ασθενείς που βρέθηκαν να εκφράζουν αυτόν τον διακομιστή στο όγκο φάνηκε να έχουν καλύτερη πρόγνωση (138). Επίσης σε άλλη μελέτη, καταγράφηκε καλύτερη πρόγνωση για ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως ER+ και βρέθηκαν να εκφράζουν τον OATP1B3. Αντίθετα ο OATP2B1, που είναι υπεύθυνος για την κυτταρική πρόσληψη του E1S, δε βρέθηκε να έχει σχέση με την κλινική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (139).

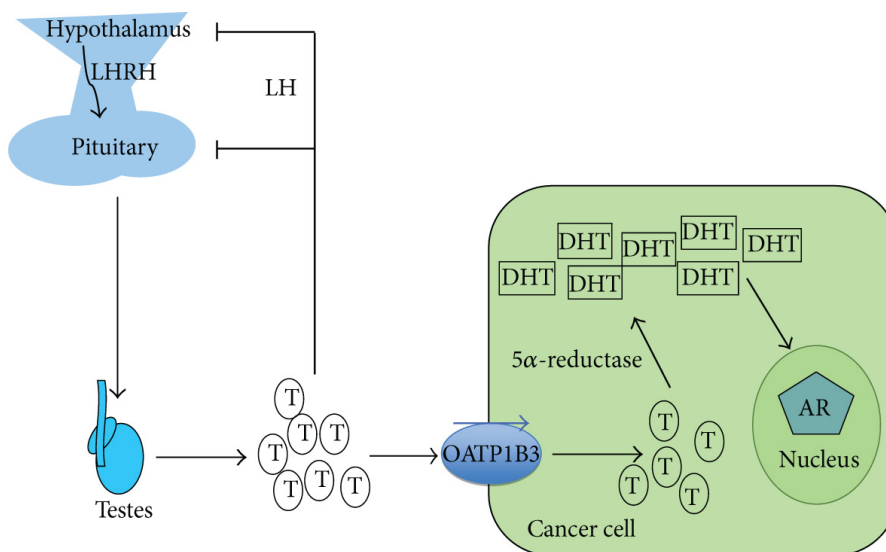
Αν και λόγω της έκφρασης των OATPs που ευθύνονται για τη μεταφορά των πρόδρομων μορφών οιστρογόνων, συμπεριλαμβανομένου και του E1S, κάποιος θα ανέμενε μάλλον μια αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των ορμονοεξαρτώμενων όγκων, εντούτοις η παρουσία αυτών των διακομιστών φαίνεται να ευνοεί επίσης και την πρόσληψη αντικαρκινικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα οι ασθενείς αυτοί να ανταποκρίνονται συνολικά καλύτερα.

Επιπλέον, για ορισμένους OATPs, οι οποίοι είναι γνωστοί για την ικανότητα τους να μεταφέρουν οιστρογόνα, όπως για παράδειγμα οι OATP2B1, OATP3A1, και OATP4A1 διαπιστώθηκε ιστική έκφραση στο μαστό (120). Για παράδειγμα, ο OATP3A1 πρόσφατα διαπιστώθηκε να έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του E1S σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (136), και υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτό μπορεί να συμβεί επίσης και σε καρκινούς ιστούς. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι εκτός από το ρόλο τους στην ομοιόσταση των οιστρογόνων, η έκφραση συγκεκριμένων OATPs που έχουν για υπόστρωμα διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα (όπως π.χ. οι OATP1B1 και OATP1B3 με την *ralitaxel*) (140) μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε καλύτερη θεραπευτική ανταπόκριση ασθενών με καρκίνο (138).

5.6 Έκφραση OATPs στον καρκίνο του προστάτη

Η θεραπεία στέρησης της τεστοστερόνης είναι εξόχως σημαντική για τη θεραπεία προχωρημένου ανδρογόνου-ευαίσθητου καρκίνου του προστάτη, αλλά η αποτελεσματικότητά τους ποικίλει. Επίσης η επίκτητη ανοχή στην θεραπεία αποστέρησης ανδρογόνων εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό θεραπευτικό πρόβλημα. Η παραγωγή τεστοστερόνης στους όρχεις ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Η έκκριση του «παράγοντα απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης» (*luteinizing hormone-releasing factor*) από τον υποθάλαμο και της γοναδοτρόπου-ωχρινοτρόπου ορμόνης (*gonadotropic luteinizing hormone*) από την υπόφυση, ρυθμίζουν τη γαμετογένεση και τη σύνθεση στεροειδών ορμονών συμπεριλαμβανομένης της τεστοστερόνης όρχεις. Τα προστατικά καρκινικά κύτταρα προσλαμβάνουν την τεστοστερόνη μέσω του OATP1B3 η οποία μετατρέπεται σε *dihydrotestosterone* (DHT) μέσω της 5- α -reductase. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων (*androgen receptor*) από την DHT οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (σχήμα 8).

Μεταλλάξεις του OATP1B3 αποδείχθηκαν αρχικά να περιορίζουν την απάντηση στη θεραπευτική προσέγγιση στέρησης ανδρογόνων σε ασθενείς (101). Αργότερα, αποδείχθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον OATP2B1 συσχετίζονταν με το διάστημα μέχρι την πρόοδο της νόσου. Η έκφραση του γονότυπου του OATP2B1, που επιτρέπει την αποτελεσματική κυτταρική πρόσληψη ανδρογόνων, φάνηκε να συνδέεται με ταχύτερη εξέλιξη του όγκου. Ασθενείς με μεταλλάξεις στους OATP2B1 και OATP1B3 που διαμεσολαβούν τη μεταφορά ανδρογόνων, βρέθηκαν να έχουν βραχύτερη περίοδο-επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (141). Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αυξημένων επιπέδων ανδρογόνων σε συνδυασμό με υπερ-έκφραση των OATP1B1, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1 και OATP4A1 σε ορμονο-ανθεκτικές μεταστάσεις σε σύγκριση με περιστατικά καρκίνου του προστάτη που δεν έτυχαν θεραπείας (101). Σύμφωνα με τα πιο πάνω ευρήματα, ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στους OATP2B1 ή/και OATP1B3 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν ανθεκτικές - στη θεραπεία στέρησης ανδρογόνων - μεταστάσεις. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα, στηρίζουν την υπόθεση ότι οι OATPs θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης μεταστάσεων μη-ανδρογόνο-ευαίσθητων, σε ασθενείς που πρέπει να τύχουν πρόωρης μη-ορμονικής θεραπευτικής αντιμετώπισης (101).



Σχήμα 8. Η παρουσία του OATP1B3 επιτρέπει την παρουσία ανδρογόνων για την ανάπτυξη και προαγωγή του ορμονοευαίσθητου καρκίνου του προστάτη. Η παραγωγή τεστοστερόνης (T) στους όρχεις ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης μέσω της έκκρισης της LHR (hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor) και της LH (gonadotropic luteinizing hormone). Τα ανδρογόνα που προκύπτουν μέσω αυτής της διαδικασίας εισέρχονται στα προστατικά καρκινικά κύτταρα μέσω του OATP1B3. Μέσα στα προστατικά κύτταρα η T μετατρέπεται σε DHT (dihydrotestosterone) μέσω της 5-alpha-reductase. Η DHT ενεργοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων AR (androgen receptor) που τελικά οδηγεί ανάπτυξη και αύξηση του καρκινικού κυτταρικού πληθυσμού (101, 142)

5.7. OATPs στο αδενοκαρκίνωμα του εντέρου

Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ιστών (tissue microarrays) για την μελέτη έκφρασης των OATP, ο OATP1B3 ήταν ανιχνεύσιμος στην πλειοψηφία (56%) δειγμάτων καρκίνου του παχέος εντέρου σε δείγματα όγκων από 278 ασθενείς όλων των σταδίων. Σε αντιδιαστολή με τον καρκίνο του προστάτη, όπου η έκφραση OATP1B3 βρέθηκε να σχετίζεται ισχυρά με το κατά Gleason σκόρ ως δείκτης αποδιαφοροποίησης του ιστού (98), υψηλότερα επίπεδα OATP1B3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνδέονται κυρίως με αρχικά στάδια της νόσου και απαντώνται σε διαφοροποιημένους ιστούς. Ωστόσο, δεν βρέθηκαν να έχουν προγνωστική αξία ούτε στην 5-ετή επιβίωση αλλά ούτε και για υποτροπή της νόσου. Για όγκους χαμηλότερης διαβάθμισης (lower grade), τα επίπεδα έκφρασης του OATP1B3 συνδέονται με βελτιωμένη 5-ετή επιβίωση, ενώ σε ασθενείς με υποτροπή όγκων πτωχής διαφοροποίησης η επιβίωση δεν σχετίστηκε με την έκφραση του συγκεκριμένου διακομιστή (128).

5.8. Έκφραση OATPs στον παγκρεατικό καρκίνο

Εντατική έρευνα των τελευταίων χρόνων στο πεδίο του παγκρεατικού καρκίνου, δεν έχει καταφέρει να παράγει οποιαδήποτε θεραπεία ικανή να επεκτείνει σημαντικά τη διάμεση επιβίωση των ασθενών πέραν των 6 μηνών. Οι διαθέσιμες θεραπείες που εφαρμόζονται επί του παρόντος, είναι κατά βάση παρηγορικές (142-144). Ως εκ τούτου, η ταυτοποίηση νέων μοριακών στόχων και η ανάπτυξη καινοτόμων στοχευμένων θεραπειών χαρακτηρίζονται ως προτεραιότητα στο πεδίο της έρευνας για τον καρκίνο του παγκρέατος.

5.9. Έκφραση OATPs στον καρκίνο του ήπατος

Στον καρκίνο του ήπατος, η έκφραση των OATP1B1 και OATP1B3 βρέθηκε να μειώνεται κατ' αναλογία με το βαθμό της ιστικής αποδιαφοροποίησης. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει τη μείωση των μεταβολικών λειτουργιών των ηπατοκυττάρων σε πιο προχωρημένους όγκους [5]. Σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που υφίστανται μεταμόσχευση ήπατος, τα επίπεδα έκφρασης αυτών των OATPs σχετίζονται αρνητικά με τους σχετιζόμενους με τη νόσο θανάτους μετά από υποτροπή (145). Αντίθετα έχει βρεθεί ότι κάποιοι OATPs (OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1 και OATP5A1) παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε πρωτοπαθή και μεταστατικό καρκίνο του ήπατος συγκρινόμενα με αυτά του φυσιολογικού ήπατος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι OATPs εντοπίστηκαν κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιστασιακά στο κυτταρόπλασμα. Για κάποια περιστατικά, η έκφραση ήταν θετική σε κύτταρα του χοληδόχου πόρου και στα στρωματικά κύτταρα (146). Το μοτίβο αυτό δηλώνει ότι συγκεκριμένοι OATPs ίσως είναι απαραίτητοι για την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, ορμονών ή ιστικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα και η λειτουργία τους τελικά συνδέει τον όγκο με το περιβάλλον του. Αυτοί οι OATPs θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω ως θεραπευτικοί στόχοι αντικαρκινικών μορίων (147).

5.10 Η υπερ-οικογένεια των OATPs: Ο ρόλος τους στη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων και ορμονών

5.10.1. OATP1A2

Ο OATP1A2 (*SLCO1A2*) διαμεσολαβεί την ενδοκυττάρια πρόσληψη ευρέως φάσματος ενδογενών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων, DHEAS, θυρεοειδικών ορμονών, προσταγλανδινών και χολικών οξέων. Έχει όμως ειδικότητα και για συγκεκριμένα φάρμακα. Στο σχήμα 6 αναφέρονται χαρακτηριστικά αντικαρκινικά φάρμακα που αποτελούν υποστρώματα για τους OATPs (95). Ο OATP1A2 είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά πολλών φαρμάκων, όπως οι στατίνες, παράγωγα της μορφίνης, αντιβιοτικά, και αντικαρκινικά φάρμακα όπως η μεθοτρεξάτη και η ιματινίμη (99).

Ο συγκεκριμένος διακομιστής εκφράζεται κυρίως στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, στον άπω-νεφρώνα, στα κύτταρα του χοληδόχου πόρου και στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, γεγονός που υποδηλώνει τον ιδιαίτερο του ρόλο στην απορρόφηση και κατανομή διαφόρων φαρμάκων. Ο OATP1A2 ανευρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλες τις περιοχές του εντέρου (147, 148) αλλά εκφράζεται έντονα μαζί με τον διακομιστή εξωκυττάρωσης MDR1 στην «ψηκτροειδή παρυφή» που αντιστοιχεί στις μικρολάχνες των απορροφητικών κυττάρων στο λεπτό έντερο (149). Ως εκ τούτου, ο OATP1A2 θα μπορούσε να αποκτήσει ιδιαίτερη κλινική φαρμακολογική σημασία αν τα επίπεδα έκφρασης του ενισχύονται μετά από χορήγηση βιταμίνης D(3) ή pregnane-X-receptor ligand (PXR) (150). Η βιοδιαθεσιμότητα των απο του στόματος χορηγούμενων αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως για παράδειγμα του imatinib θα μπορούσε να επηρεαστεί από την επαγωγή της εντερικής έκφρασης του OATP1A2 (151). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των OATP1A2-υποστρωμάτων μπορεί να αλλάξουν τελικά τις ενδοκυττάριας τους συγκεντρώσεις επηρεάζοντας την έκβαση της θεραπείας ή/και να οδηγήσουν σε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η εντόπιση του 1A2 στον άπω-νεφρώνα (basolateral membrane) σηματοδοτεί την ικανότητα να ρυθμίζει τη νεφρική απέκκριση αντικαρκινικών φαρμάκων. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζεται και από τη διαπίστωση ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SLCO1A2* επηρεάζουν την κάθαρση του imatinib σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (151). Αντίθετα, άλλη μελέτη έδειξε ότι η απορρόφηση του imatinib δεν συνδεόταν με μεταλλάξεις του OATP1A2 (152). Επίσης ο OATP1A2 μπορεί να μεσολαβήσει στη σωληναριακή επαναρρόφηση της μεθοτρεξάτης που αποβάλλεται κυρίως μέσω των νεφρών. Τροποποιημένη έκφραση του OATP1A2 στο νεφρό θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι πιθανά θα συνέβαλε στην πρόκληση τοξικότητας. Το αν οι OATP1A2-μεταλλάξεις είναι ικανές να επηρεάσουν την κάθαρση φαρμάκων σε ασθενείς δεν αποτελεί ακόμη επιβεβαιωμένη πληροφορία, αλλά υπάρχουν ενδείξεις προς αυτήν την κατεύθυνση αφού η πρόσληψη της μεθοτρεξάτης από ωάρια *Xenopus laevis* μεταβάλλεται για διαφορετικές παραλλαγές του OATP1A2 (153).

Τέλος, αυξημένη έκφραση του OATP1A2 σε κύτταρα καρκίνου μαστού, προστάτη και οστεοσάρκωμα βρέθηκε να επηρεάζουν τα επίπεδα μεθοτρεξάτης και να επηρεάζουν την δραστηριότητά τους (136, 137). Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Pregnane X receptor (PXR) είναι γνωστό ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση

μεταβολικών ενζύμων και διακομιστών. Δεδομένα απο μελέτες σε καρκίνο του μαστού, καταδεικνύουν ότι η ριφαμπικίνη ως ενεργοποιητής του PXR μπορεί να προκαλέσει έμμεση αύξηση της έκφρασης του OATP1A2. Αντίθετα, ανάλυση δεδομένων από περίπου 100 ασθενείς δείχνει ότι γενετικές αλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τα PXR, OATP 1A2, 1B1, 1B3, και 2B1 δεν συσχετίζονται με καρκινογένεση στο μαστό (154). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C) έδειξε να ρυθμίζει την ορθή τοποθέτηση του OATP1A2 μέσα στην κυτταρική μεμβράνη δια μέσου των εξαρτώμενων από την κλαριθίνη σηματοδοτικών μονοπατιών. Αναστολή της δραστηριότητας της PKC φαίνεται να σταματά τη διακομιστική λειτουργία αυτού του OATP (155, 156).

5.10.2. OATP1B1 και 1B3

Οι OATP1B1 και OATP1B3 εκφράζονται στο φυσιολογικό ήπαρ και έχουν χαρακτηριστεί ως ηπατοειδικοί "liver-specific"-OATPs. Ο OATP1B3 βρέθηκε επίσης να εκφράζεται σε διάφορους ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς και ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασής του συνδέονται με την πρόγνωση και την κλινική έκβαση της νόσου (138, 157).

Και οι δύο εκπρόσωποι της οικογένειας 1B, έχουν την ικανότητα να διαμεσολαβούν την πρόσληψη τυπικών OATP-υποστρώματων όπως, ορμονών, χολικών οξέων, στατινών, αντιβιοτικών και άλλων φαρμάκων (95). Επίσης ορισμένα αντικαρκινικά φάρμακα όπως για παράδειγμα, η μεθοτρεξάτη, η δοσεταξέλη, ο μεταβολίτης της ιρινοτεκάνης SN-38 και το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο ραπαμυκίνη, αποτελούν υποστρώματα μεταφοράς για τους δύο συγκεκριμένους OATPs (99). Τα παράγωγα της καπμοθεκίνης gimatecan και BNP1350 (158), ο κυκλινοεξαρτώμενος αναστολέας κινάσων φλαβοπυριδόλη (159), καθώς και παράγωγα σισπλατίνης (160) αποτελούν υποστρώματα για τον OATP1B1. Υποστρώματα για τον 1B3 είναι επίσης ο ανασταλτής του HER-2 CP-724,714 (161), η ιματινίμη (162) και ο εξειδικευμένος αναστολέας της τυροσίνης κινάσης δύο υποδοχέων επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, PKI166 (163). Οι δύο αυτοί OATPs παρουσιάζουν αρκετούς πολυμορφισμούς και μέχρι στιγμής έχει καταγραφεί και χαρακτηριστεί μια σειρά από παραλλαγές στην μεταφορική τους ικανότητα *in vitro* (164, 165). Έκφραση των διαφορετικών μορφών αυτών των διακομιστών σε ασθενείς θα μπορούσε να μεταβάλει τη βιοδιαθεσιμότητα αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως φάνηκε απο μελέτες σε ζώα, η απουσία του ανθρώπινου αναλόγου OATP1B1/1B3 οδήγησε σε μειωμένη κάθαρση της δοσεταξέλης. Ωστόσο, σε ασθενείς, η έκφραση παραλλαγών OATP1B1 ή/και OATP1B3 με μειωμένη λειτουργία δεν έδειξε να αλλάζει το ρυθμό της κάθαρσής της (166). Η πρόσληψη του SN-38 βρέθηκε να είναι ελαττωμένη σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τρεις κοινές παραλλαγές του OATP1B1, ενώ φάνηκε να επηρεάζεται η φαρμακοκινητική του SN-38 σε ασθενείς με τις αντίστοιχες παραλλαγές (167). Πράγματι, ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό SLC01B1 \square 15 παρουσίασαν χαμηλότερο ρυθμό κάθαρσης της ιρινοτεκάνης (168). Το Gadoteric acid, το οποίο χρησιμοποιείται στην μαγνητική απεικόνιση του ήπατος σε ασθενείς με καρκίνο του ήπατος, αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό υπόστρωμα των OATP1B1/OATP1B3. Αν και τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της ουσίας δεν επηρεάστηκαν από τις διάφορες SNP-παραλλαγές, σε ασθενείς, το απεικονιστικό σήμα ελέγχθηκε διαταραγμένο (169).

Η έκφραση των OATP1B1 και OATP1B3 βρέθηκε μειωμένη σε πρωτογενείς και μεταστατικές αλλοιώσεις καρκίνου του ήπατος. Ωστόσο, ο OATP1B3 παρουσιάζει έκφραση σε πολλές μορφές καρκίνου, όπως για παράδειγμα, στο παχύ έντερο, στο μαστό, στο πάγκρεας, στις ωοθήκες, στους όρχεις, στην ουροδόχο κύστη και τον προστάτη (98), με την δυνατότητα να επηρεάσει την ανάπτυξη του όγκου αλλά και την συνολική επιβίωση με όργανο-ειδικό τρόπο (93). Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, οι OATPs -1B1 και -1B3 χαρακτηρίστηκαν σαν μεταφορείς υψηλής-ευαισθησίας για την πακλιταξέλη. Εφόσον και οι δύο OATPs βρέθηκαν να εκφράζονται στο 50% των δειγμάτων του καρκίνου των ωοθηκών, μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στη απορρόφηση και ενδοκυττάρια κατανομή της πακλιταξέλης ως πρώτης γραμμής θεραπεία (140). Αν και ο OATP1B3 συναντάται συχνά σε διάφορους τύπους καρκίνου, η μοριακή οντότητα αυτού του διακομιστή που σχετίζεται με τη νόσο δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Πρόσφατα, εντοπίστηκε μια νέα παραλλαγή σε επίπεδο mRNA η οποία ονομάστηκε “cancer-type OATP1B3” και βρέθηκε να εκφράζεται ιδιαίτερα σε δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου και του πνεύμονα. Ωστόσο, το προϊόν μετάφρασης αυτού του γονιδίου δεν έγινε εφικτό να χαρακτηριστεί ακόμη και ως εκ τούτου δεν μπορούν να υπάρξουν σαφείς και ασφαλείς υποθέσεις για το ρόλο του στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (170).

Με την ιδιότητα τους να διαμεσολαβούν την απορρόφηση των στεροειδών ορμονών σε ορμονοευαίσθητα καρκινικά κύτταρα, η παρουσία αυτών των OATPs μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Η έκφραση του OATP1B3 ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο farnesoid-X-receptor (FXR), ο hepatocyte-nuclear-factor (HNF) 1-alpha και HNF3-beta. Οι HNF1-alpha και HNF3-beta είναι δυνατόν να συμβάλλουν στην ειδική στο ήπαρ έκφρασή του, και ο FXR θεωρείται ότι έχει ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση του από τα χολικά οξέα (171).

5.10.3 OATP1C1

Ο διακομιστής OATP1C1 παρουσιάζει επιλεκτικότητα για τις θυρεοειδικές ορμόνες και θα μπορούσε να αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη μεταφορά των ορμονών αυτών σε ιστούς-στόχους. Παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει ειδικότητα και για άλλα OATP-υποστρώματα δεν περιγράφηκε ικανότητα του για πρόσληψη αντικαρκινικών φαρμάκων. Εκφράζεται κυρίως σε όγκους των οστών (172) και μπορεί επίσης να συμβάλει στο απεκκριτικό σύστημα του παχέος εντέρου (173).

5.10.4 OATP2A1

Ο μεταφορέας προσταγλανδινών OATP2A1 εκφράζεται ευρέως σε πληθώρα οργάνων όπως τον εγκέφαλο, το γαστρεντερικό σωλήνα, νεφρούς, καρδιά, ήπαρ, ωοθήκες, πνεύμονα, προστάτη, σκελετικούς μύες και σπλήνα (174). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο ο 2A1 εντοπίστηκε στην αυλική μεμβρανική επιφάνεια (luminal membrane) των ενδοθηλιακών κυττάρων που σχηματίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και το φραγμό μεταξύ αίματος-όγκου (blood-tumor barrier) (175), στους πυλωρικούς αδένες του άντρου, στα τοιχωματικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα (176), καθώς και στο αυλικό και αδενικό επιθήλιο του ενδομητρίου (177). Ο συγκεκριμένος διακομιστής μεσολαβεί τη μεταφορά αρκετών προστανοειδών συμπεριλαμβανομένων των prostaglandin E(2) και PGF(2-alpha).

Αυξημένη έκφραση σε επίπεδο μεταγράφων mRNA εντοπίστηκε σε πολλούς άλλους όγκους συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, ήπατος, ωοθηκών, πνεύμονα, και των οστών. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται η έκφραση του στον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου φαίνεται να συμβάλει στη ρύθμιση των εξωκυτταρίων επιπέδων της προφλεγμονώδους PGE(2) (178). Η PGE(2) εισέρχεται στα κύτταρα μέσω του OATP2A1, όπου εκεί οξειδώνεται και απενεργοποιείται από τη 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase στο ανενεργό 15-keto PGE(2) (174).

5.10.5 OATP2B1

Ο ευρέως εκφραζόμενος OATP2B1 παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα στις στεροειδείς ορμόνες. Είναι όμως γνωστόν ότι μπορεί να μεταφέρει επίσης κι άλλα OATP-υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων των θυρεοειδικών ορμονών, τη PGE(2) και πληθώρα φαρμάκων. Η προγεστερόνη έδειξε να ευνοεί τη μεσολαβούμενη από τον OATP2B1 μεταφορά πρόδρομων ουσιών για τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών, E1S, DHEA και progesterone sulfate (179). Βρέθηκε επίσης να εκφράζεται σε ανθρώπινα γλοιώματα, όπου ήταν εντοπισμένος στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και του φραγμού αίματος και όγκου (blood-tumour barrier) (115). Αυξημένη έκφραση διαπιστώθηκε σε δείγματα καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με το φυσιολογικό μαζικό αδένα (120). Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του 2B1 φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση του σταδίου της νόσου (139).

5.10.6 OATP3A1

Για τον OATP3A1 έχει αποδειχθεί ότι έχει την ικανότητα να μεταφέρει ορμόνες, προσταγλανδίνες, βαζοπρεσίνη, όπως επίσης πενικιλίνη και άλλα αντιβιοτικά. Υψηλά επίπεδα αυτού του διακομιστή απαντούν στους όρχεις, στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, το σπλήνα, τα ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αυξημένη επίσης έκφραση βρέθηκε στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων μαστού (180).

5.10.7 OATP4A1

Το μοτίβο έκφρασης του OATP4A1 φαίνεται να είναι παρόμοιο με εκείνο του 3A1. Εκφράζεται ιδιαίτερα σε πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου και ωοθηκών, ενώ και σε μεταστατικούς όγκους του παχέος εντέρου στο ήπαρ. Οι 4A1 και 2B1 εκφράζονται ιδιαίτερα στο φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου ασθενών με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (147). Σε νεοπλασίες του παχέος εντέρου, η αυξημένη έκφραση των μεταφορέων της προσταγλανδίνης E(2), OATP4A1 και OATP2B1 μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα κυκλικά νουκλεοτίδια (173).

5.10.8 OATP4C1

Ο OAT4C1 εκφράζεται κυρίως στο νεφρό, αλλά βρίσκεται επίσης σε ορισμένους όγκους όπως του παχέος εντέρου. Έχει καταγραφεί η ικανότητα του OATP4C1 να μεταφέρει καρδιακά γλυκοσίδια, ορμόνες του θυρεοειδούς, cAMP και μεθοτρεξάτη (119). Σε νεφρό αρουραίου, έκφραση του OATP4C1 βρέθηκε να μειώνει την υπέρταση, την καρδιομεγαλία και τη φλεγμονή σε συνθήκες νεφρικής ανεπάρκειας λόγω της

απεκκριτικής του λειτουργίας στο νεφρό. Η αυξημένη έκφραση του 4C1 φάνηκε να μειώνει τα επίπεδα ουραιμικών τοξινών (guanidino succinate και dimethylarginine) στο πλάσμα (181). Οι στατίνες, οι οποίες λειτουργούν ως επαγωγείς πυρηνικών aryl-hydrocarbon υποδοχέων, ρυθμίζουν αυξητικά τη μεταγραφή του SLC04C1 (182).

5.10.9 SLC05A1

Ο 5A1 διακομιστής οργανικών ανιόντων, αποτελεί το μέλος της υπερ-οικογένειας των OATPs που έχει – μέχρι σήμερα – μελετηθεί στο μικρότερο βαθμό. Έκφραση του σε επίπεδο mRNA εντοπίστηκε σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, των σκελετικών μυών, του εγκεφάλου, του μαστού και των κυττάρων του αίματος. Έκφραση σε επίπεδο mRNA περιγράφηκε επίσης σε καρκίνους του ήπατος, των οστών, και του μαστού. Στο φυσιολογικό μαστό, ο OATP5A1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων που επενδύουν τους γαλακτοφόρους πόρους. Στον καρκίνο του μαστού, ο OATP5A1 φάνηκε να χάνει τη χαρακτηριστική μεμβρανική του εντόπιση, ενώ ο εντοπισμός του ήταν ορατός στο εσωτερικό διαμέρισμα των κυττάρων των γαλακτοφόρων πόρων (180). Απλοανεπάρκεια των γονιδίων που κωδικοποιούν τον OATP5A1 και τη heparan sulfate 6-O-endosulfatase-1, που ενεργούν ως ρυθμιστές των πολυάριθμων αυξητικών παραγόντων στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του σκελετικού ιστού διαπιστώθηκε ότι προκαλεί το σύνδρομο “mesomelia-synostoses”.(183).

5.10.10 OATP6A1

Ο OATP6A1 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως αντιγόνο καρκίνου του όρχεως (CT) που εκφράζεται έντονα σε επίπεδο mRNA μόνο στον φυσιολογικό όρχι. Χαμηλή έκφραση παρατηρήθηκε στο σπλήνα, τον εγκέφαλο και τον πλακούντα (111). Όπως όμως και άλλα αντιγόνα του καρκίνου του όρχεως, ο 6A1 εκφράζεται και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως εγκεφάλου, ουροδόχου κύστεως και πνεύμονα. Λόγω της υψηλής ανοσογονικότητάς τους, αυτά τα αντιγόνα CT θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την ανάπτυξη θεραπειών βασισμένων σε αντισώματα για διάφορους τύπους όγκων (184).

5.11 Ρύθμιση της έκφρασης των OATPs

Η μεταβολή της έκφρασης των OATPs, μετά από κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων, θέτει το ερώτημα για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης αυτών των πολυπεπτιδίων. Αν και τα δεδομένα για τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της έκφρασης των OATPs δεν είναι ακόμα αρκετά, οι OATP1B1, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1 και OATP4A1 μελετήθηκαν σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, DNA-εξαρτώμενη σίγαση γονιδίων (DNA-dependent gene silencing), και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης τους (140). Οι διαδικασίες αυτές στον καρκίνο, μπορεί ν' αποτελέσουν καθοριστικό παράγοντα για την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης των διακομιστών ή/και της μετατόπιση τους από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας έτσι σε λειτουργικές αλλαγές των OATPs (99).

Η μεταγραφική ρύθμιση από διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τελική έκφραση των OATPs. Για παράδειγμα, σε ιστούς καρκίνου μαστού αλλά και σε αντίστοιχες κυτταρικές σειρές, η έκφραση του OATP1A2 είναι στενά συνδεδεμένη με την έκφραση του pregnane-X-receptor (PXR) (185). Αυτός ο πυρηνικός υποδοχέας ενεργοποιείται από ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων και ξеноβιοτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της ριφαμπικίνης, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει επαγωγή του 1A2 σε κυτταρικές σειρές (186). Στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού T47-D, η επαγωγή του OATP1A2 από τη ριφαμπικίνη συνοδεύτηκε από αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ρυθμό ανάπτυξης, για το οποίο υπεύθυνη θα μπορούσε να θεωρηθεί η πρόσληψη του E1S. Επιπλέον η ικανότητα πρόσληψης αλλά και ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων μετά την έκθεση στη ριφαμπικίνη, μπορεί να ανασταλεί από PXR-ανταγωνιστές. Επίσης η έκφραση της OATP1B3 και OATP1B1 ρυθμίζεται επίσης από πυρηνικούς υποδοχείς, αλλά σε αντίθεση με τον OATP1A2, η ενεργοποίηση του PXR από τη ριφαμπικίνη αναστέλλει τελικά την έκφραση του OATP1B3.

Πιθανές αλλαγές στο μοτίβο κυτταροκινών μετά από ιογενή λοίμωξη ή φλεγμονή, προκαλούν μείωση της έκφρασης των OATP1B1, OATP1B3, και OATP2B1 όπως έδειξαν μελέτες σε ασθενείς που έπασχαν από ηπατίτιδα C (187). Η ιντερφερόνη γάμμα (IFN-γ), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-άλφα (TNF-α), η interleukin-1-β και -6, φάνηκε να μειώνουν έκφραση των ανωτέρω τριών OATPs σε απομονωμένα ηπατοκύτταρα (188). Η εξαρτώμενη από μεθυλίωση του DNA αναστολή έκφρασης των γονιδίων (DNA methylation-dependent gene silencing) αποδείχθηκε επίσης ικανή να ρυθμίζει την έκφραση των OATPs. Οι Holla και συνεργάτες έδειξαν (178), ότι έκθεση σε απομεθυλιωτικό παράγοντα (demethylating agent) ή σε αναστολείς ακετυλίωσης ιστονών (histone deacetylase inhibitor), μπορεί – εν μέρει τουλάχιστον – να αυξήσει τη μειωμένη έκφραση του OATP2A1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του εντέρου. Επιπλέον, ανάλυση του προφίλ DNA-μεθυλίωσης των OATPs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, αποκάλυψε ότι τα CpG νουκλεοτίδια πριν από τις περιοχές έναρξης της μεταγραφής (transcriptional start site) για το *SLC01B3* γονίδιο έχουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης το οποίο οδηγεί τελικά σε διαφορετικό μοτίβο έκφρασης του 1B3 σ' αυτές τις κυτταρικές σειρές (189). Σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, οι διαδικασίες φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης μπορούν να τροποποιήσουν την κυτταρική εντόπιση των OATPs. Για παράδειγμα, μεταβολή της φωσφορυλίωσης των διακομιστών αυτών στον καρκίνο του μαστού προκαλεί μετατόπιση του OATP2B1 από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C από phorbol ester, οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση του OATP2B1, επακόλουθη ταχεία κλαθρινο-διαμεσολαβούμενη εσωτερίκευση (clathrin-dependent internalization) και λυσοσωμική αποδιάταξη (155, 156).

5.12 Οι OATPs ως “Κερκόπορτες” στον καρκίνο και η αξιοποίησή τους

Παρά τη μικρή σταδιακή βελτίωση που έχει επιτευχθεί με την εισαγωγή των στοχευμένων θεραπειών στον καρκίνο, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι συστηματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για πολλές μορφές καρκίνου, σε προχωρημένο στάδιο, έχουν αποτύχει να ανταποκριθούν στις προσδοκίες ασθενών και της επιστημονικής κοινότητας (190-192). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ένας πυρήνας stem-like καρκινικών

κυττάρων ευθύνεται ουσιαστικά για τη μη ανταπόκριση των διάφορων μορφών καρκίνου (193, 194). Χρειάζεται να εξευρεθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, με περισσότερο εξειδικευμένους-επιλεκτικούς στόχους ώστε να γίνει δυνατή η βελτίωση των θεραπευτικών επιλογών (196, 197). Μέσα σ αυτή το πλαίσιο, οι OATPs και η επιλεκτική πρόσληψη των διάφορων υποστρώματων τους απο τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι μια επιλογή που δεν έτυχε ιδιαίτερης προσοχής μέχρι σήμερα παρά το γεγονός ότι έχει αποδειχθεί η κλινική τους σημασία (144, 198).

Όσον αφορά στη Μικροκυστίνη-LR, η χαμηλή δυνατότητα που επέδειξε στην αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών, (GI50 > 5 μ M σε 24h) (199) λόγω κυρίως της χαμηλής διαπερατότητα των κυττάρων ελλείψει των συγκεκριμένων διακομιστών απο τη μία, σε συνδυασμό με την μέτρια επιλεκτικότητα στην αναστολή των PP1 και PP2A απο την άλλη, οδήγησε την επιστημονική κοινότητα να παραβλέψει τις θεραπευτικές τους δυνατότητες για χρόνια (200). Το ενδιαφέρον για τις μικροκυστίνες επανέρχεται μετά από την αναθεώρηση και επανεκτίμηση των γνώσεων επί των ειδικών διακομιστών ενδοκυττάριας πρόσληψης.

Ωστόσο, για να επιτευχθεί μια κλινικά σημαντική προοπτική για χρήση θεραπευτικών μορίων προερχόμενων απο τις μικροκυστίνες, θα πρέπει πρώτα να επιλυθεί το ζήτημα της αναμενόμενης ηπατικής τοξικότητας αυτών των παραγόντων. Το γεγονός ότι στα OATP-διαμολυσμένα κύτταρα HeLa, οι συγκεντρώσεις μικροκυστίνης που απαιτούνται για την πρόκληση κυτταροτοξικής απάντησης βρίσκονται σε χαμηλές ναομοριακές συγκεντρώσεις, δηλαδή χαμηλότερα από τα επίπεδα που απαιτούνται για την πρόκληση εξεσημασμένης ηπατικής τοξικότητας σε πειραματόζωα, είναι εξαιρετικά σημαντικό (12). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η ευαισθησία των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων στη Μικροκυστίνη είναι δυνατόν να διαφέρει από αυτήν των καρκινικών για μεταβολικούς κυρίως λόγους.

Έκθεση ηπατοκυττάρων απο αρουραίους σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις MC-LR είχε ως αποτέλεσμα την οξεία αύξηση των ενδοκυττάριας επιπέδων GSH και παράλληλη αύξηση των ROS (16). Η προσθήκη N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC), ενός παράγοντα που ευνοεί την ενδοκυττάρια σύνθεση GSH, στο μέσο καλλιέργειας, ήταν η αιτία για τη μείωση της ευαισθησίας των εν λόγω κυττάρων στη μικροκυστίνη. Αντιθέτως, όταν τα ηπατοκύτταρα εκτέθηκαν σε buthionine sulfoximine, ένα παράγοντα που προκαλεί μείωση την ενδοκυττάριας GSH, η ευαισθησία τους στην τοξίνη αυξήθηκε (82). Αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν ότι η γλουταθειόνη (GSH) παίζει σημαντικό ρόλο στην την *in vivo* προστασία των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων απο την επιβλαβή δράση των μικροκυστινών. Αντίθετα, οι ουσίες NAC και buthionine sulfoximine, δεν κατάφεραν να μεταβάλουν την τοξικότητα της μικροκυστίνης στο γενετικά τροποποιημένο μοντέλο HeLa κυττάρων (όπως αναφέρθηκε πιο πάνω), γεγονός που υποστηρίζει την ύπαρξη ουσιαστικών μεταβολικών διαφορών μεταξύ φυσιολογικών ηπατοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων (12).

Τέλος, με βάση την ιστική κατανομή, την απέκκριση αλλά και την ηπατική βιομετατροπή της MC-LR, η τοξικότητα θεωρείται ότι σχετίζεται με την παρατεταμένη ενδοκυττάρια παραμονή της ουσίας, πιθανώς μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης της ή των μεταβολιτών της με άλλα κυτταρικά στοιχεία μεγάλου μοριακού βάρους (201).

6. Ανάλογα Μικροκυστινών: Δυνατότητες και Προοπτικές

Η ανάπτυξη δομικών αναλόγων της MC-LR με υψηλότερη δυνατότητα επιλεκτικότητας και ασφαλέστερο προφίλ ασφάλειας, αποτελεί μια δυνητικά εξαιρετικά σημαντική προοπτική ανάπτυξης καινοτόμων αντικαρκινικών φαρμάκων μοριακής στόχευσης (202). Αυτή η προοπτική φαίνεται να εξυπηρετείται σε μεγάλο βαθμό από την ιδιαίτερη χημική δομή των φυσικών αυτών κυανοτοξινών, όπως φαίνονται παρακάτω.

6.1. Χημική συνδυαστική σύνθεση

6.1.1. Το ζήτημα Adda

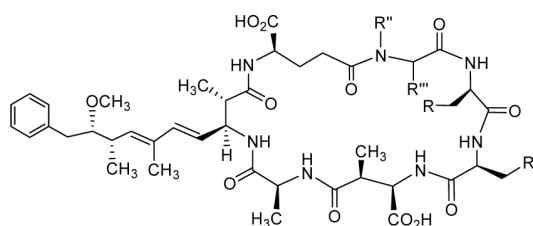
Δεδομένα συσχέτισης δομής-δραστηκότητας (Structure-Activity Relationship -SAR) αποκάλυψαν ότι το Adda και το D-glutamic acid έχουν κεντρικό ρόλο στην ηπατοτοξικότητα που προκαλούν οι Μικροκυστίνες, παρέχοντας μια στερική ρύθμιση που εμπλέκεται άμεσα τόσο στην πρωτεΐνη μεταφορέα, που αποδίδει επιλεκτική πρόσληψη από τα κύτταρα, όσο και στην ενεργό περιοχή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (203). Η κρυσταλλοποιημένη δομή του συμπλόκου της PP1 με την MC-LR επιβεβαίωσε τις σημαντικότερες πτυχές του συντηρημένου τομέα δέσμευσης οξέων (conserved acid binding domain) στο φαρμακοφόρο μοντέλο (204). Η καρβοξυλική ομάδα του γλουταμινικού οξέος και η καρβονυλική ομάδα του Adda έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μέταλλο-δεσμευτικές περιοχές. Επιπλέον, η καρβοξυλομάδα του MeAsp συνδέεται με τα Arg 96 και Tyr 134.

Η μεγάλη υδρόφοβη ουρά του Adda τοποθετείται στην υδρόφοβη περιοχή της PP1, δίπλα ακριβώς από την ενεργό περιοχή, ενώ η πλευρική αλυσίδα της L-arginine παραμένει πλήρως εκτεθειμένη στον διαλύτη και δεν σχηματίζει σημαντικές συνδέσεις με τις PP1 ή PP2A. Ο άνθρακας στην πλευρική αλυσίδα του N-methyldehydroalanine συνδέεται ομοιοπολικά με την Cys 273 της PP1, μια σύνδεση που γίνεται μετά την αρχική ανασταλτική δράση της τοξίνης και πιθανόν αποτελεί καθυστερημένη αντίδραση στο διάλυμα (204, 205). Ωστόσο, η βιολογική σημασία αυτής της αντίδρασης παραμένει ακόμα άγνωστη. Αν και οι MCs και οι Nodularins έχουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες, παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές σε σχέση με την αλληλεπίδρασή τους με τις PP1 και PP2A. Αν και οι δύο τοξίνες αρχικά συνδέονται μη-ομοιοπολικά αναστέλλοντας τη λειτουργία αυτών των ενζύμων, δεδομένα από κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν ότι οι nodularins, συμπεριλαμβανομένων των moturogins, δεν δεσμεύονται ομοιοπολικά με την PP1 ή την PP2A ούτε και ως αποτέλεσμα μιας καθυστερημένης αντίδρασης (206). Το γεγονός λαμβάνει χώρα παρά την παρουσία της N-methyldehydrobutyrine (NMdhb) που θα μπορούσαν να λάβει μέρος σε μια αντίδραση προσθηκών τύπου "Michael" με την Cys 273, παρόμοια εκείνης της NMdha με την MC-LR.

Λόγω των μοναδικών τους βιολογικών ιδιοτήτων, οι MCs και οι Nodularins υπήρξαν στόχος έρευνας για την δημιουργία δομικά τροποποιημένων αναλόγων. Αυτή η προσπάθεια είχε ως αποτέλεσμα τη συνολική σύνθεση της MC-LA (207). Σε μια προσπάθεια να σχεδιάσει ενώσεις με αυξημένη επιλεκτικότητα για την PP1, ο

Chamberlin συνέθεσε νέες παραλλαγές της MC-LA (πίνακας 2) εμπνευσμένος από την αρχική συνολική σύνθεση της MC-LA (207). Αντικατάσταση του καταλοίπου της L-leucine με εκείνο της cyclohexylalanine οδήγησε στο σχηματισμό μιας παραλλαγής της MC-LA με επταπλάσια επιλεκτικότητα έναντι της PP1 και μεγαλύτερης ισχύος-δραστηριότητας (0,52 nM) (208). Παρά την μεγαλύτερη δραστηριότητα και το καλύτερο προφίλ επιλεκτικότητας που αναφέρθηκαν μέχρι σήμερα, η χαμηλή κυτταρική διαπερατότητα της MC-LA ήταν ο λόγος που περιόρισε την περαιτέρω ανάπτυξη του μορίου. Επίσης, έγιναν προσπάθειες σύνθεσης μιας σειράς από απλοποιημένα ανάλογα που αποτελούνταν μόνο από το Adda και από ένα επιπλέον αμινοξύ, ή από συνθετικά πεπτίδια και τα οποία τελικά είχαν μέτρια ανασταλτική δραστηριότητα έναντι των PP1/PP2A (209).

Στον αντίποδα, γραμμικά ανάλογα μικροκυστινών όπως MC-RR, MC-YM και MC-LA στα οποία η περιοχή Adda δεν ενσωματώθηκε ούτε αντικαταστάθηκε από κάποιο άλλο υδροφοβικό υπόλειμμα, ήταν ανενεργά και δεν έδειξαν σημεία τοξικότητας σε πειραματόζωα (210, 211). Επιπλέον, ένα μόριο βασιζόμενο στο-Adda, που μιμείται τη δράση του RVXF πεπτιδίου, βρέθηκε να δεσμεύει την ρυθμιστική περιοχή της PP1 και τελικώς να ενεργοποιεί το ένζυμο, σε αντίθεση με την έντονη ανασταλτική δράση της MC-LR (212).



Inhibitor	R	R'	R''	R'''	Inhibition (IC ₅₀ nm)		
					PP1c	PP2Ac	PP1 selectivity
MC-LA (synthetic)	H	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	=CH ₂	0.3	0.3	1
1	H	Cyclohexyl	CH ₃	CH ₂	0.52	3.4	7
2	H	<i>i</i> -Propyl	Cyclohexyl	H	0.8	1.5	2
3	H	<i>i</i> -Propyl	CH ₃	H	0.8	1.5	2
4	NH ₃ ⁺	<i>i</i> -Propyl	CH ₃	CH ₂	3	9	3

Πίνακας 2. Σύγκριση των τιμών IC₅₀ (nM) της συνθετικής MC-LA και αναλόγων σε σχέση με τις απομονωμένες καταλυτικές υπομονάδες των PP1 και PP2A.

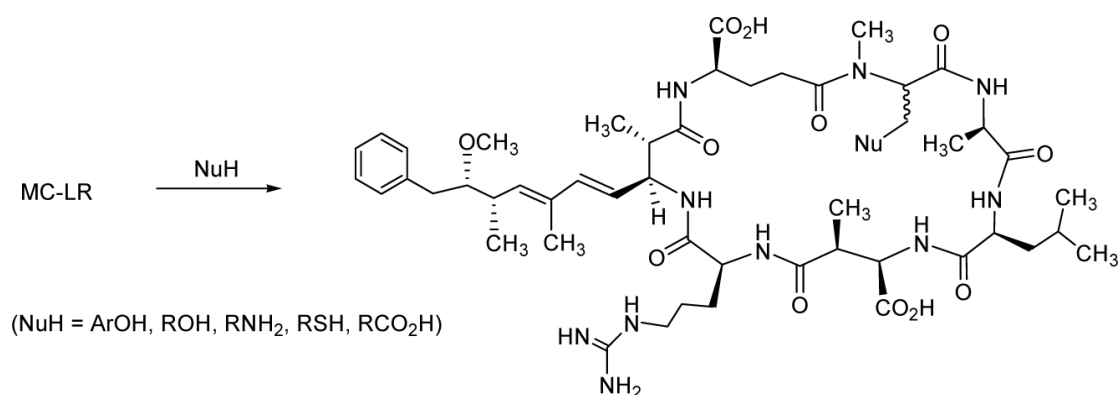
6.1.2. Συνθετικές προσεγγίσεις

Η παρούσα εργασία είχε μεταξύ άλλων στόχων και τη διαδικασία της εκμετάλλευσης της συνθετικής οργανικής χημείας για να καταφέρει να μετριάσει την τοξικότητα των μικροκυστινών, σχεδιάζοντας διαρθρωτικές παραλλαγές της τοξίνης με βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ.

Τέτοια ανάλογα μικροκυστινών μπορούν θεωρητικά να επιτευχθούν με (α) την άμεση χημική επεξεργασία του αρχικού μορίου της μικροκυστίνης εκμεταλλευόμενοι την αυξημένη πυκνότητα των λειτουργικών της ομάδων ή/και (β) τον *de novo* σχεδιασμό και σύνθεση νέων αναλόγων MC. Όμως, αν και η επεξεργασία των αρχικών μορίων

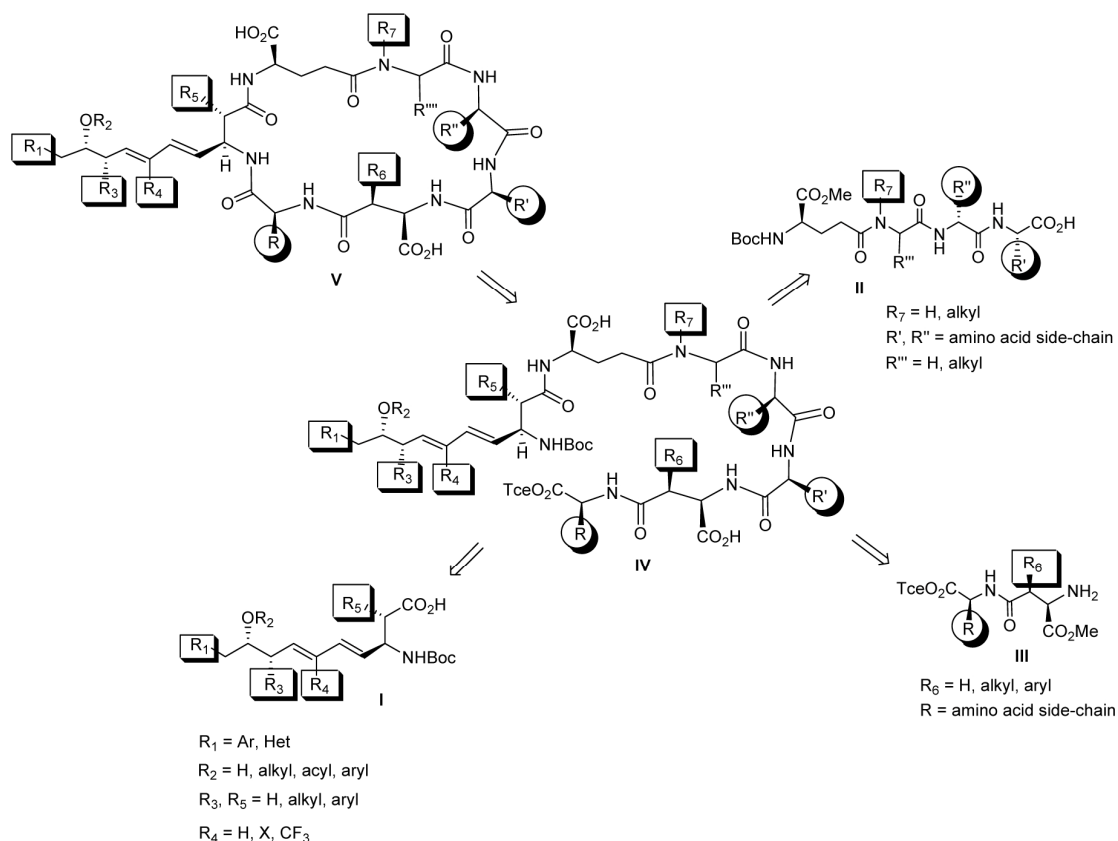
των μικροκυστινών μπορεί να προσφέρει άμεση πρόσβαση σε νέα ανάλογα, το πεδίο δράσης τους φαίνεται να είναι περιορισμένο, δεδομένου ότι η τροποποίηση των εύκολα-προσβάσιμων λειτουργικών ομάδων (δηλαδή του Adda και του D-Glu) μπορεί να οδηγήσει σε ενώσεις με πλήρη απώλεια της κυτταροτοξικότητάς τους.

Η προσθήκη γλουταθειόνης (GSH) και κυστεΐνης (Cys) στο κατάλοιπο N-methyldehydroalanine των μικροκυστινών οδήγησε στο σχηματισμό ενώσεων με μειωμένη τοξικότητα, όπως αποδείχτηκε κατά την αξιολόγηση των επιπέδων LD50 που έγινε χρησιμοποιώντας ποντίκια (213). Λαμβάνοντας υπόψη ότι το κατάλοιπο N-methyldehydroalanine μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη παρατεταμένη παραμονή των MCs στα ηπατοκύτταρα και εμμέσως έτσι για την τοξικότητά τους, η σύζευξη ευρέως φάσματος νουκλεόφιλων μορίων όπως του οξυγόνου, αζώτου και του θείου, στο διπλό δεσμό N-methyldehydroalanine θα μπορούσε να δώσει γένεση σε νέα ανάλογα μικροκυστινών με μειωμένη τελικά ηπατική τοξικότητα (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Προσθήκη διάφορων νουκλεόφιλων ενώσεων στο μόριο της MC-LR

Αυτή η στρατηγική θα μπορούσε να δώσει μια γρήγορη απάντηση κατά πόσον οι εστέρες της dehydroalanine εμπλέκονται στην παρατεταμένη κατακράτηση της Μικροκυστίνης-LR εντός των ηπατικών κυττάρων. Ωστόσο, η περιορισμένη διαθεσιμότητα της συγκεκριμένης τοξίνης μπορεί να αποδειχτεί ένα σοβαρό εμπόδιο στην εφαρμογή αυτής της στρατηγικής. Ως εκ τούτου, η πρόσβαση σε μια σειρά από ανασυνδυασμένα ανάλογα Μικροκυστινών με το επιθυμητό φαρμακολογικό προφίλ απαιτεί μια συνδυαστική προσέγγιση.



Σχήμα 10. Ανασυνδυαστική προσέγγιση των διάφορων μικροκυστινών

6.2. Συνδυαστική συνολική βιοσύνθεση

Ο “μακροκυκλικός” δακτύλιος που χαρακτηρίζει το μόριο των μικροκυστινών, τους δίνει τη δυνατότητα να προ-οργανώνονται κατά τρόπο τέτοιο, ώστε οι κρίσιμες λειτουργικές ομάδες να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορα πρωτεϊνικά κατάλοιπα, χωρίς σοβαρές εντροπικές απώλειες (204, 214-217). Αυτή η προ-οργανωμένη δομή του δακτυλίου μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε υψηλή συγγένεια και επιλεκτικότητα έναντι πρωτεϊνών στόχων, διατηρώντας ταυτόχρονα την αναγκαία βιοδιαθεσιμότητα. Παρά τις πιθανές τους θεραπευτικές δυνατότητες και το γεγονός ότι περισσότερα από 100 “μακροκυκλικά” φαρμακευτικά μόρια προερχόμενα από φυσικά προϊόντα, έχουν εμπορική χρήση, τα κυκλοπεπτίδια των κυανοβακτηρίων έχουν μελετηθεί στον ελάχιστο βαθμό με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών ενώσεων (200).

6.3. Επιλεκτικότητα και Λειτουργία

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης υποθέσαμε ότι η βέλτιστη επιλεκτικότητα και ασφάλεια των αναλόγων μικροκυστίνης σε ένα βαθμό θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσα από στρατηγικές βελτιστοποίησης του αρχικού μορίου με την ανάπτυξη συζευγμένων αντίδοτων-ενώσεων της μικροκυστίνης. Θεωρήσαμε επίσης σημαντική

την εκμετάλλευση των γενετικών και μεταβολικών διαφορών μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων στην προσπάθεια για ανάπτυξη επιλεκτικών MC-αναλόγων κατά καρκινικών ιστών.

Για σκοπούς της παρούσας ερευνητικής εργασίας επικεντρώσαμε τις προσπάθειες μας στη σύζευξη της NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη) στο μόριο της Μικροκυστίνης. Η λογική πίσω από τη χρήση της NAC είναι η εκμετάλλευση της γνωστής ιδιότητας της να απομακρύνει/εξουδετερώνει τα ROS, έναν από τους κυριότερους παράγοντες τοξικότητας της MC-LR στα φυσιολογικά κύτταρα. Η σύνδεση θα μπορούσε δυνητικά να γίνει μέσω της sulfhydryl ομάδας του μορίου της MC-LR, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη συμπλόκων microcystin-NAC, τα οποία θα μπορούν από τη μια να καταστρέφουν επιλεκτικά, καρκινικά κύτταρα που θα εκφράζουν συγκεκριμένους OATPs (ως ανωτέρω), ενώ από την άλλη, να ελαχιστοποιείται η τοξική της επίδραση σε υγιείς ιστούς. Αυτή η προσέγγιση υποστηρίζεται από δεδομένα που καταδεικνύουν ότι η NAC λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο στα υγιή απ' ότι στα καρκινικά κύτταρα και ιστούς. Χαρακτηριστικά, μελέτες σε ζώα και σε ανθρώπους έδειξαν ότι φυσιολογικά ηπατοκύτταρα που εκτίθενται σε διάφορους ηπατοτοξικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων και η μικροκυστίνη (μελέτες σε ζώα) μπορούν τελικά να διασωθούν εάν συνεκτεθούν έγκαιρα σε NAC (240-243), κάτι που δεν ισχύει και για τα καρκινικά κύτταρα (12, 244).

Ένα σημαντικό βιοχημικό χαρακτηριστικό της τοξικότητας που προκαλείται από τις μικροκυστίνες, είναι η γένεση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (40, 245). Αυτή η βιολογική επίδραση θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι είναι ένα πλεονέκτημα για τα ανάλογα των MCs εάν θεωρηθούν ως υποψήφια αντικαρκινικά μόρια, δεδομένου ότι η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS πέραν ενός ορίου, φαίνεται να αποτελεί την βιοχημική βάση διαφόρων αντικαρκινικών φαρμάκων (246). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα ζούν σε μια κατάσταση αυξημένου οξειδωτικού στρες, γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα σε εξωγενείς παράγοντες ικανούς να αυξήσουν περαιτέρω το ενδοκυττάριο επίπεδο των ROS (247-249). Ως εκ τούτου, τα ανάλογα Μικροκυστίνης θα μπορούσαν αξιοποιώντας τις οξειδοαναγωγικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων, να οδηγήσουν σε θάνατο-απόπτωση επιλεκτικά όσα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν συγκεκριμένους OATPs (σ.σ. 1A2, 1B1 και 1B3), χωρίς παράλληλα να προκαλούν σημαντική τοξικότητα στα φυσιολογικά.

Επιπλέον, τα ανάλογα μικροκυστίνης θα ήταν δυνατό να προσφέρουν μια ριζική θεραπευτική προσέγγιση για τον καρκίνο μέσω της διατάραξης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν OATPs, τα οποία θεωρείται ότι μοιράζονται αφενώς κάποια χαρακτηριστικά των φυσιολογικών stem-κυττάρων αλλά και παρουσιάζουν κάποια χαρακτηριστικά κακοήθων κυττάρων σχετικά με τη δυνατότητα οξειδοαναγωγικής ρύθμισης (246, 252).

Τέλος υπολογιστικές δομικές-λειτουργικές προσεγγίσεις σε συνδυασμό με φαρμακολογικές μελέτες, μπορούν να βοηθήσουν να επιλεγούν για ανάπτυξη τα ισχυρότερα ανάλογα με την ελάχιστη δράση στους υγιείς ιστούς (256, 257).

7. Στοχευμένες θεραπείες για τον παγκρεατικό καρκίνο

Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο επιθετικές και θανατηφόρες μορφές καρκίνου και κατατάσσεται παγκοσμίως ως η 4η αιτία θανάτου από καρκίνο (258, 259). Χαρακτηριστικό της επιθετικότητας της νόσου είναι η καταγραφή ίσης επίπτωσης νεοδιαγνωσθέντων περιστατικών και θανάτων κατά το έτος 2008 στην Ευρώπη (260). Η χειρουργική αντιμετώπιση παραμένει η υπ' αριθμόν ένα θεραπευτική προσέγγιση εφόσον η νόσος διαγνωσθεί σε πρώιμα στάδια. Η πλειονότητα των ασθενών διαγιγνώσκονται με προχωρημένη μη χειρουργήσιμη ή μεταστατική νόσο και μόνο το 15-% των πρωτοδιαγνωσκόμενων ασθενών μπορούν να υποβληθούν σε επέμβαση εκτομής της βλάβης (261)

Η κυριότερη χημειοθεραπευτική επιλογή της τελευταίας δεκαετίας μετά την 5-Φθόριοουρακίλη (5-FU) για το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα υπήρξε η gemcitabine (143, 262). Πρόκειται για ένα πρότυπο νουκλεϊκό ανάλογο (difluorodeoxycytidine dFdC) το οποίο φωσφορυλιώνεται ενδοκυτταρίως και μετατρέπεται στην ενεργή μορφή dFdCTP όπου συναγωνίζεται τη φυσιολογική δράση του dCTP (deoxycytidine triphosphate), εισέρχεται στο DNA και αναστέλει τελικά τη διαδικασία αντιγραφής και μεταγραφής (263, 264). Η gemcitabine έδειξε στατιστικά σημαντικό κλινικό όφελος και αύξησε το την διάμεση επιβίωση αναφορικά με την 5-FU από 4,4 σε 5,6 μήνες (143). Πρόσφατα ο συνδυασμός gemcitabine με τη νέα ταξάνη nab-paclitaxel (265) ή ο συνδυασμός FOLFIRINOX (Leucovorin Calcium, Fluorouracil, Irinotecal HCL και Oxaliplatin) (266) καταφεραν να δείξουν περαιτέρω βελτίωση στην επιβίωση συγκρινόμενα με το μονοθεραπευτικό σχήμα της gemcitabine (262). Παρά τη συνεχιζόμενη όμως έρευνα στο πεδίο της θεραπείας του καρκίνου του παγκρέατος, η διάμεση συνολική επιβίωση δεν ξεπερνά τους 11,1 μήνες (266) γεγονός που καταδεικνύει την αδήριτη ανάγκη για συνέχιση της ερευνητικής προσπάθειας και εξεύρεση αποτελεσματικότερων στοχευμένων θεραπευτικών μορίων.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η εκμετάλλευση αφενός νέων μοριακών στόχων με εξειδίκευση έκφρασης στον καρκίνο και αφετέρου η στόχευση τους με φυσικά μόρια τα οποία διατηρούν ιδανικές φαρμακολογικές ιδιότητες.

Οι Μικροκυστίνες λόγω της δομής τους, θα μπορούσαν να υποστούν εξωγενείς βιοχημικές μεταβολές, τέτοιες ώστε να περιοριστεί κατα το δυνατόν τους τοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα, καθιστώντας τις υποψήφιες προς περαιτέρω φαρμακολογική ανάπτυξη.

Οι κύριοι άξονες – αρχικές υποθέσεις που διερευνήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι είναι οι ακόλουθοι:

1. Μελέτη έκφρασης των διακομιστών οργανικών ανιόντων σε δείγματα ανθρώπινων καρκίνων και κυτταρικών σειρών

2. Λογικός *in silico* σχεδιασμός των τριασδιάστατων μοντέλων των:

I. Μικροκυστίνη-LR

II. Αναλόγων συμπλόκων της Μικροκυστίνης-LR με N-acetylcystein και L-Cystein

III. Των OATPs

IV. Της αλληλεπίδρασης της Μικροκυστίνης με τους διακομιστές οργανικών ανιόντων

3. Έλεγχος της τοξικότητας της Μικροκυστίνης-LR σε κυτταρικά μοντέλα

4. Έλεγχος της κυτταροπροστατευτικής ικανότητας της N-acetylcystein

5. Σύζευξη των μορίων της Μικροκυστίνης-LR και N-acetylcystein

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΥΛΙΚΑ

1. Βιολογικό Υλικό

1.1 Δείγματα ιστού εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE)

Για την μελέτη έκφρασης των OATP, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ανθρώπινου ιστού μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) από ασθενείς με διεγνωσμένη νεοπλασματική νόσο, παραχωρήθηκαν από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων «Γ. Χατζηκώστα» για τους σκοπούς αυτής της εργασίας.

Σύνοψη των δειγμάτων καρκινικού ιστού FFPE που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 3

Όργανο	n (φύλο m,f)	Διαφοροποίηση (=n)				
		καλή(K)	Καλή/Μέτρια(KM)	Μέτρια (M)	Μέτρια/Χαμηλή(MX)	Χαμηλή (X)
Πάγκρεας	12 (6, 6)	K=00	KM=01	M=03	MX=05	X=03
Π. Έντερο	30 (17, 13)	K=02	KM=03	M=18	MX=03	X=03
Στόμαχος	20 (8, 12)	K=00	KM=02	M=04	MX=00	X=12 A=02
Πνεύμονας	1				MX=01	
Ήπαρ	2	φυσιολογικό				

Πίνακας 3. Δείγματα καρκινικού ιστού εγκλεισμένου σε παραφίνη.

1.2 Φρέσκος κατεψυγμένος ανθρώπινος ιστός

Φρέσκος κατεψυγμένος (FF) ανθρώπινος Ιστός από Φυσιολογικό Ήπαρ (L), Ηπατική Μετάσταση (LM), Φυσιολογικό Π. Έντερο (C) και Αδενοκαρκίνωμα εντέρου (CA), ασθενούς με διεγνωσμένο πρωτοπαθή καρκίνο παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις παραχωρήθηκε από το Κέντρο Βιοτράπεζας Καρκίνου του Παν/μίου Ιωαννίνων.

Ο ιστός άμα τη λήψη του στο χειρουργείο, εμβαπτίστηκε άμεσα σε υγρό άζωτο (LN₂) και αποθηκεύτηκε στους -80°C υπό άσηπτες συνθήκες.

1.3 Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες

Ανθρώπινα Περιφερικά Μονοκύτταρα με Αυτόλογο ορό. (Human Peripheral Blood Monocytes (HPBMC) – Autologous serum)

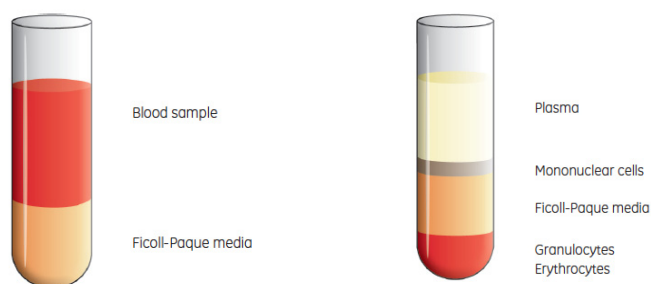
Περιφερικό αίμα από υγιή εθελοντή δότη αναρροφήθηκε σε ηπαρινισμένη σύριγγα (για απομόνωση κυττάρων) και σε σωλήνες BD Vacutainer® Plus (BD 367986) (για απομόνωση ορού).

Απομόνωση Μονοκυττάρων

Το ηπαρινισμένο περιφερικό αίμα, αραιώθηκε 1:1 με PBS 1x (Invitrogen 70013016) και σε 50ml σωλήνες, τοποθετήθηκε στάγδην επί Φικόλης Histopaque® (Sigma-Aldrich® 10771) σε αναλογία 2:1. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30' στα 400g με σταδιακή επιτάχυνση και επιβράδυνση (brake OFF).

Την απομόνωση της ενδιάμεσης στοιβάδας εικόνα 1 που περιέχει τα μονοπύρηνια κύτταρα, ακολούθησαν 3 στάδια πλύσιματος, 2 φορές με PBS 1x αρχικά και ένα πλύσιμο με Iscove's Medium (Biosera LM-I1090) στα 400g για 5' έκαστο.

Τα απομονωθέντα κύτταρα είτε μπήκαν άμεσα σε καλλιέργεια είτε καταψύχθηκαν σταδιακά σε freezing medium 70% Iscove's Medium, 20% αυτόλογο heat-inactivated (h.i.) ορό και 10% DMSO (Sigma-Aldrich® D5879)(267) και αποθηκεύτηκαν σε αέρια φάση LN₂ για κατοπινή χρήση.



Εικόνα 1 Διαχωρισμός των στοιχείων του αίματος με φυγοκέντρηση παρουσία “Φικόλης Histopaque®” εικόνες απο LG Healthcare εγχειρίδιο (268)

Προετοιμασία αυτόλογου ορού

Ποσότητα 20-30ml περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση ορού με σκοπό τη χρήση του για *in vitro* καλλιέργεια των HPBMCs ή για σκοπούς αποθήκευσης των κυττάρων σε LN₂.

Το αίμα αφού συλλέχθηκε στα ειδικά σωληνάρια (όπως περιγράφονται ανωτέρω), φυγοκεντρήθηκε στις 2500rpm για 10'. Ο υπερκείμενος ορός μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

1.4 Χαρακτηρισμένες – εμπορικά διαθέσιμες Κυτταρικές Σειρές

Για την μελέτη δραστηριότητας της μικροκυστίνης LR, της Gemcitabine και της N-acetylcystein, χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι κυτταρικές σειρές

1.4.1 CHO – Chinese Hamster Ovary

Διαμολυσμένα (transfected) CHO κύτταρα κατα τρόπον ώστε να εκφράζονται οι OATP1B1 και OATP1B3, καθώς και τα CHO-WT (wild type), παραχωρήθηκαν ευγενώς απο τον Professor Bruno Steiger, Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, Switzerland

Πλήρες μέσο καλλιέργειας: D-MEM (Gibco 22320-022), 100U/mL Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140-122), 10% FBS (Gibco 26140-079),

25mg/500ml L-Proline (ALFA A10199). Επιπλέον για τα διαμολυσμένα κύτταρα, στα προηγούμενα αντιδραστήρια, προστίθεται και 500μg/ml Geneticin G-418 (Gibco 11811-031)

1.4.2 CACO-2 – colorectal adenocarcinoma (ECACC 86010202)

Πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα του εντέρου απο 72-χρονο καυκάσιο άνδρα.
Πλήρες μέσο καλλιέργειας: EMEM (ATCC 30-2003), 20% FBS (Invitrogen 10270106)

1.4.3 HepG2 – Hepatocellular carcinoma (ECACC 85011430)

Πρωτοπαθές διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα απο 15-χρονο καυκάσιο άρρεν.
Πλήρες μέσο καλλιέργειας: EMEM (ATCC 30-2003), 10% FBS (Invitrogen 10270106)

1.4.4 Bx-PC3 – Pancreatic Cancer (ECACC 93120816)

Πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος απο 61-χρονη ασθενή
Πλήρες μέσο καλλιέργειας: RPMI-1640 (ATCC 30-2001), 10% FBS (Invitrogen 10270106)

1.4.5 MIA PaCa2 – Pancreatic Cancer (ECACC 85062806)

Πρωτοπαθές αδιαφοροποίητο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος απο 65-χρονο καυκάσιο άνδρα.
Πλήρες μέσο καλλιέργειας: DMEM (ATCC 30-2002), 10% FBS (Invitrogen 10270106)
Παραχωρήθηκε ευγενώς απο την Associate Professor Theresia Thalhammer, Department of Pathophysiology and Allergy Research, Medical University of Vienna, Austria

1.4.6 MRC-5 – Fibroblasts

Φυσιολογικοί ινοβλάστες απο ιστό πνευμονικού παρεγχύματος, άρρεν εμβρύου ηλικίας 14-εβδομάδων.
Πλήρες μέσο καλλιέργειας: EMEM (ATCC 30-2003), 10% FBS (Invitrogen 10270106)
Παραχωρήθηκαν ευγενώς απο τον Δρ Γεώργιο Παναγιώτου, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών, «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Κυτταρικές Καλλιέργειες

Η *in vitro* καλλιέργεια κυτταρικών σειρών προγραμματοποιήθηκε κατά το σύνηθη τρόπο, σε “humidified” κλίβανο επώασης σε θερμοκρασία 37°C και τελική συγκέντρωση CO₂ 5%.

2. Αντισώματα Ανοσοϊστοχημείας και Western Blot

2.1 mMDQ (PROGEN 651140)

Μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα παντικού (mouse monoclonal antibody), που στοχεύει τους OATP1B1 και 1B3 κοντά στο N-τελικό τους άκρο

2.2 mESL (PROGEN 651139)

Μονοκλωνικό IgM αντίσωμα παντικού (mouse monoclonal antibody), που στοχεύει τον OATP1B1 κοντά στο C-καρβόξυτελικό άκρο

2.3 p1A2 (Atlas Antibodies AHPA027537)

Πολυκλωνικό IgG αντίσωμα απο κουνέλι με ικανότητα στόχευσης του OATP1A2

2.4 p1B3 (Atlas Antibodies HPA004943)

Πολυκλωνικό IgG αντίσωμα απο κουνέλι, με ικανότητα στόχευσης επίτοπο κοντά στο C- καρβόξυτελικό άκρο του OATP1B3

Τα πλήρη στοιχεία των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον πίνακα 4

Table 1 Antibodies and technical data used for immunohistochemistry

Ab symbol	OATP target	Clonality	Host species	Immunoglobulin subclass	Working dilution	Incubation time (minutes)	Epitope target	Company	Cat #
mMDQ	IB1/IB3	Monoclonal	Mouse	IgG1	1:10	70	MDQHQLNKTAESASSEKKKTRRC for IB3 (N-terminus) MDQNQHNLNKTAEAQPSSEKKKTRYC for IB1 (N-terminus)	Progen Biotechnik	651140
mESL	IB1	Monoclonal	Mouse	IgM	1:5	70	ESLNKKNKHFVPSAGADSETHC (C-terminus)	Progen Biotechnik	651139
p1A2	IA2	Polyclonal	Rabbit	IgG	1:250	60	SSVVGINTSYEGIPQDLYENDIFADCNVDCNCPSKIWDP VCGNNGLSYLSACLACGCTSIGTGINMVFQNC CIQTSG NSSAVLGLCDKGPDC (C-terminus)	Atlas Antibodies	HPA027537
p1B3	IB3	Polyclonal	Rabbit	IgG	1:250	60	QKDKTKASDNERKVMDEANLEFLNNGEHFV PSAGTDSKTCNLD MQDNAAA (C-terminus)	Atlas Antibodies	HPA004943

Abbreviation: OATP, organic anion-transporting polypeptide.

Πίνακας 4. Αντισώματα κατά των OATPs που χρησιμοποιήθηκαν. (Ιδία Δημοσίευση (129))

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ανοσοϊστοχημεία

Τομές ιστού πάχους 3-4μm κόπηκαν με ειδικό μικροτόμο και τοποθετήθηκαν σε πλακίδια μικροσκοπίου. Τα πλακίδια με τις τομές ιστού επώαστηκαν ολονύκτια στους 65°C, για την επίτευξη της βέλτιστης πρόσφυσης μεταξύ ιστού-πλακιδίου. Στη συνέχεια, βυθίστηκαν στο προθερμασμένο (65° C) DAKO PT-Link σε διάλυμα με pH 9 για αποκάλυψη των πρωτεϊνικών επιτόπων (target retrieval solution) (S2375 κώδικα DAKO) για 20' στους 93°C και για να επιτευχθεί αποπαραφινποίηση (deparaffinization), ενυδάτωση, και αποκάλυψη των ειδικών στόχων-επιτόπων (HIER).

Κατά το τέλος της διεργασίας, η θερμοκρασία ορίσθηκε στους 65°C. Η διαδικασία χρώσης των ιστικών τομών, έγινε στο DAKO Autostainer σύστημα για το υπόλοιπο της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημείας.

Η διάρκεια έκθεσης των ιστών στα mESL και mMDQ αντισώματα, ήταν διάρκειας 70', ενώ για τα πολυκλωνικά anti-OATP1A2 και anti-OATP1B3 αντισώματα, ο χρόνος επώασης ήταν 60 λεπτά.

Η ενδογενής peroxidase μπλοκαρίστηκε, χρησιμοποιώντας το DAKO REAL peroxidase blocking solution (κωδικός S2023) για 10'.

Η ειδικά κατασκευασμένη DAKO's Dextran backbone ενισχυμένη με μόρια peroxidase και αίγεια δευτερογενή αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών απο κουνέλι και ποντικό (DAKO REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse ENV, Code κωδικός K5007) εφαρμόσθηκε στα δείγματα ιστών για 20', ακολουθούμενη από το ειδικό σύστημα ανίχνευσης της Dako REAL™ DAB + Chromogen (DAKO, κωδικός K5007) για 5 λεπτά και έκθεση σε αιματοξυλίνη (hematoxyline) (Vector Laboratories QS H-3404) για 2'. Τέλος, τα δείγματα αφυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε αλκοόλη και ξυλόλη προς μονιμοποίηση.

Εκτίμηση αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής αποτύπωσης των μελετούμενων πρωτεϊνικών μορίων έγινε σε συνεργασία με πεπειραμένο παθολογοανατόμο. Χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα και μακραφάγα ιστών ως εσωτερικοί μάρτυρες. Η κλίμακα για τη έκφραση ορίσθηκε ως ακολούθως: αρνητική (-), ασθενής (+), μέτρια (++) και ισχυρή (+++).

Για την ομάδα ασθενών με καρκίνο παγκρέατος, έγινε επιπλέον ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για την έκφραση των διακομιστών με τη μέθοδο HistoQUEST (TissueGnostics, Vienna, Austria) με βάση την ένταση του γκρι-χρώματος από 0 έως 250 (269, 270)

2. Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση RNA από κύτταρα ή/και ιστούς, έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους-τεχνολογίες, ανάλογα με τις ανάγκες και απαιτήσεις των μετέπειτα εφαρμογών (σχετική ή απόλυτη ποσοτικοποίηση)

Το Real time ready Cell Lysis kit (ROCHE 05943523) χρησιμοποιήθηκε για την σε ένα-βήμα απομόνωση του κυτταρικού RNA με πατέντα της εταιρείας (271), στη βάση της ολικής λύσης των κυττάρων παρουσία αναστολέων των ειδικών RNases. Ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Το εκχύλισμα θεωρείται κατάλληλο για απ' ευθείας χρήση του σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription) για σύνθεση cDNA παρουσία ειδικών σταθερών στις εναλλαγές της θερμοκρασίας (thermostable) DNase, για τον κατακερματισμό του συναπομονωθέντος DNA (Σχετική ποσοτικοποίηση με rtPCR). Σημείωση: Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε RNA δεν είναι εφικτός λόγω της τεχνολογίας της μεθόδου.

Το Nucleospin® RNA II – Total RNA isolation kit (Macherey-Nagel 740955) χρησιμοποιήθηκε για την σε-στήλη απομόνωση του ολικού κυτταρικού RNA με ταυτόχρονη πέψη του γενωμικού DNA με ειδικό “on-column DNase digestion” βήμα. Ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο χρήσης του κατασκευαστή (272).

Trizol/Macherey Nagel

Για σκοπούς απομόνωσης RNA από ανθρώπινο ιστό, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός των μεθόδων TRIzol® LS Reagent (ambion life technologies™) και Nucleospin® RNA II ως ακολούθως:

Τεμάχια φρέσκου κατεψυγμένου ιστού (βάρους 50-100mg) τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες με 0.75ml TRIzol® LS και ομογενοποιήθηκαν αρχικά με τη βοήθεια ειδικού ομογενοποιητή με μεταλλικά σφαιρίδια τεχνολογίας “bead-beater” μέχρι να παρατηρηθεί πλήρης διάσπαση των ιστικών στοιχείων, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση στα 12000g για 10' στους 4°C για την απομάκρυνση των κυτταρικών συγκριμάτων και τελικά από μία περίοδο 5' ομογενοποίησης του δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για τον διαχωρισμό των φάσεων, προστέθηκε στο κάθε δείγμα 0.2ml χλωροφόρμιο (chloroform) και μετά από έντονη ανακίνηση 15'' και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15' φυγοκεντρήθηκαν στις 12000g για 15' στους 4°C.

Τον διαχωρισμό των φάσεων, ακολούθησε η καταβύθιση του RNA από την υδάτινη στοιβάδα με 0.5ml ισοπροπανόλης (isopropanol), 10' επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 12000g για 10' στους 4°C.

Το απομονωθέν RNA ανασυστάθηκε σε 0.35ml αιθανόλης 70% (DEPC-H₂O Sigma-Aldrich 95284) και η διαδικασία συνεχίστηκε με τη μέθοδο Nucleospin® RNA II με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Έλεγχος ποσοτικοποίησης, καθαρότητας και ποιότητας του RNA-εκχυλίσματος έγινε με τα όργανα NanoDrop 2000 (Thermoscientific) και Agilent 2100 bioanalyzer.

3. Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription) και σύνθεση cDNA

Για την αντίστροφη μεταγραφή των RNA δειγμάτων που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε το Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche 4897030). Για τη σύνθεση cDNA, χρησιμοποιήθηκε κατ' αποκλειστικότητα η μέθοδος των τυχαίων εξαμερών (random hexameres) για να επιτραπεί έτσι η σύνθεση ολόκληρου του κλάσματος του RNA.

Δυο διαφορετικά πρωτόκολλα χρησιμοποιήθηκαν αναλόγως της μεθόδου απομόνωσης RNA.

Όλα τα βήματα έγιναν σε αποστειρωμένο περιβάλλον και με εξοπλισμό (αναλώσιμα κλπ) ελεύθερα από RNases.

Σε κάθε περίπτωση χρήσης του Transcriptor first strand cDNA synthesis kit, για το α) ή το β) όπως φαίνονται πιο κάτω, τα επιμέρους “Mastermixes” ετοιμάστηκαν με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

α) RNA που απομονώθηκε με το Real time ready Cell Lysis (Roche)

Ποσότητα 2μl κυτταρικού εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα ανά 20μl αντίδρασης υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή (RT) στο Bio-Rad iCycler™ Thermal Cycler.

Της ενζυματικής αντίδρασης, προηγήθηκε ένα βήμα “πέψης του γενωμικού DNA” με ενεργοποίηση της DNase στους 29°C για 10’.

Στη συνέχεια τα δείγματα ανάλογα με το μήκος των mRNA στόχων, στους 50°C για 60’ ώστε να επιτραπεί η σύνθεση του cDNA. Την αντίδραση RT σταμάτησε η μέσω θερμότητας αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 85°C για 5’. Τα δείγματα φυλαχθηκαν στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

β) RNA που απομονώθηκε με το Nucleospin® RNA II (Macherey Nagel)

Ποσότητα 250ng RNA από το κάθε δείγμα ανά 10μl αντίδρασης υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή (RT) στο Bio-Rad iCycler™ Thermal Cycler.

Της ενζυματικής αντίδρασης, προηγήθηκε ένα επιπλέον βήμα “RNA-secondary structure denaturation step” όπου το αρχικό RNA και τα τυχαία εξαμερή (random hexameres), εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 65°C για 10’. Το mastermix-διάλυμα που περιείχε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase) ετοιμάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή και προστέθηκε στο κάθε δείγμα σε πάγο, στο τέλος του βήματος της αποδιάταξης (denaturation step). Βασισμένοι στο μήκος των mRNA στόχων, οι συνθήκες της αντίδρασης τέθηκαν ως εξής: α) extension of primers (random hexameres) βήμα 25°C για 10’, β) βήμα σύνθεσης του cDNA 50°C for 60’. Την αντίδραση RT σταμάτησε η μέσω θερμότητας γ) αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας της αντίστροφης μεταγραφάσης στους 85°C για 5’. Τα δείγματα φυλαχθηκαν στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

4. rtPCR

Για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το “LightCycler® 480 SybrGreen I Master” kit (Roche 4707516). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στο LightCycler® 480 (Roche).

Για τους σκοπούς αυτής της ερευνητικής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν rtPCR αντιδράσεις για *σχετική* (relative) και για *απόλυτη* (absolute) έκφραση αναλόγως των αναγκών των επιμέρους πειραμάτων.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα primers και οι επιμέρους παράμετροι.

Η επιλογή των house keeping genes έγινε με βάση προηγούμενη ερευνητική δουλειά των Jonge και συνεργατών (273).

Τα rtPCR primers σχεδιάστηκαν και ελέγχθηκαν για την ειδικότητα και την αναμενόμενη απόδοση τους με το λογισμικό primer-BLAST (NCBI) (274).

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξης των primers (T_m) έγινε με βάση τους Schildkraut & Breslauer (275, 276)

Gene symbol	NM_ID	Forward primer	Reverse primer	length (bp)	T _m °C	GC%
OATP1A2 var1 and var2	NM_134431 NM_021094	GGGGCATGCAGGA TATATGA	TGGAACAAAGCTT GATCCTCTTA	87	F60 R60	F50 R39
OATP1B1	NM_006446	ACTGATTCTCGATG GGTTGG	TTTCCAGCACATGC AAAGAC	154	F60 R60	F50 R45
OATP 1B3	NM_019844	TAATTTGGACATG CAAGACAATG	AGTGAAAGACCAG GAACACCTC	90	F60 R60	F35 R50
UBC	NM_021009.5	TTAGAACCCCGAG TATCAGCAGAA	GAAAGAAAACCA GTGCCCTAGA	73	F60 R60	F43 R45
CYC1	NM_001916.3	AGAGCACGACC ATCGAAAAC	TCAGGACTGAC CACTTGTGC	104	F60 R60	F50 R55
RP-L13 var1 var2	NM_033251.1 NM_000977.2	GGAGTACCGCT CCAAACTCA	GCCATACGGAG ACTAGCGAAG	201	F60 R61	F55 R57

Πίνακας 5. Αλληλουχίες των ειδικών primers για τα συγκεκριμένα γονίδια στόχους (γαλάζιο χρώμα) καθώς και τα house-keeping γονίδια (λευκό χρώμα)

α) Για τη σχετική έκφραση OATPs χρησιμοποιήθηκαν για σκοπούς κανονικοποίησης και σύγκρισης των αποτελεσμάτων τα House Keeping γονίδια UBC και CYC-1

β) Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση της έκφρασης των OATPs, χρησιμοποιήθηκε γνωστή αρχική συγκέντρωση ολικού RNA με λόγους καθαρότητας κατά τον έλεγχο με το NanoDrop A_{260/280} και A_{260/230} >1.8.

Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με ομόλογα δείγματα των υπο-μελέτη γονιδίων “Homologous Standard”, δηλαδή δίκλωνα μόρια DNA της ίδιας ή παρόμοιας (κατά μεγάλο βαθμό) ομοιότητας με τα cDNA στόχους που έτυχαν PCR ενίσχυσης με το ίδιο ζεύγος primers στις ίδιες ακριβώς συνθήκες (277).

Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο “2nd derivative maximum” όπως αυτή αναφέρεται στο εγχειρίδιο χρήσης του LightCycler[®] 480 (Roche) (278).

Τελική ποσότητα cDNA 20ng ανα αντίδραση των 10μl ανα δείγμα χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η ενδογενής έκφραση των γονιδίων υπο μελέτη (OATP1A2, 1B1 και 1B3). Οι συνθήκες της αντίδρασης για την σε πραγματικό χρόνο ποσοτικοποίηση των αντιγράφων ήταν οι ακόλουθες:

Αρχικά ένα βήμα για την ενεργοποίηση της FastStartTaq DNA πολυμεράσης και την αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου cDNA ορίστηκε στους 95°C για 10’.

Ακολούθησαν συνολικά 40 κύκλοι ενίσχυσης, όπου ο κάθε ένας αποτελείτο από τα ακόλουθα υπο-βήματα: 10” (αποδιάταξη) denaturation, (πρόσφυση) annealing και επιμήκυνση (elongation) στους 95°C, 62°C και 72°C αντίστοιχα.

Στο τέλος κάθε αντίδρασης, τα προϊόντα ελέγχθηκαν και αναγνωρίστηκαν σε σχέση με τα πρότυπα “Homologous standards” με ανάλυση ειδικών καμπυλών τήξεως (melting-curve analysis). Για το βήμα αυτό τα δείγματα εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 95°C και 65°C για 5” και 60” αντίστοιχα, ακολουθούμενα από συνεχή έκθεση στους 97°C.

Σύνθεση “Homologous standards” για πρότυπες καμπύλες

Το cDNA από το απομονωθέν ολικό RNA από κύτταρικές σειρές ή ιστούς, υποβλήθηκε σε αντίδραση PCR με τα διαφορετικά ζεύγη primers για το κάθε γονίδιο. Αφού ελέγχθηκε η ποιότητα και απόδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με

κλασική ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 1%, τα δείγματα των PCR αντιδράσεων υπέστησαν καθαρισμό (DNA purification) με το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel 740609) κιτ και έτυχαν ανάλυσης με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop για την καθαρότητα και τη συγκέντρωση των δίκλωνων μορίων DNA.

Ο υπολογισμός και μετατροπή της συγκέντρωσης [ng]/μl σε [Αριθμό αντιγράφων]/μl έγινε με το λογισμικό DNA concentration to copy number version 1.5 (διαθέσιμο από την ιστοσελίδα <http://stanice.euweb.cz/bio>)

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq™ PCR κιτ (KAPABIOSYSTEMS KK1040) στις εξής συνθήκες: 1 κύκλος αρχικής αποδιάταξης στους 94°C για 5' ακολοθούμενος από 45 κύκλους αντιγραφής αποτελούμενος από τα εξής βήματα: Αποδιάταξη στο 94°C για 10", πρόσφυση των primers (annealing) 59°C για 20" και επέκταση (extension) στους 72°C για 30". Η PCR αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα βήμα τελικής επέκτασης (final extension) στους 72°C για 7'. Στο τέλος της αντίδρασης η θερμοκρασία των δειγμάτων κατέβηκε σταδιακά σε 4°C. Αποθήκευση στους 4°C ή στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

5. Western Blot

Protein expression - Western Blot (Cell extracts –Western Blot)

Κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν για 48h σε 6-well τριβλία (κάτω από κανονικές συνθήκες καλλιέργειας) και τεμάχια από φρέσκο κατεψυγμένο ιστό υποβλήθηκαν σε απομόνωση ολικού κλάσματος πρωτεϊνών με τη μέθοδο TRIzol LS® (Ambion life Technologies™) ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας και εκλούστηκαν (elution) σε φρέσκο διάλυμα SDS συγκέντρωσης 1%. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για κατοπινή χρήση. Ίσες ποσότητες ολικού "cell lysate" (20-60 μg) επώαστηκαν με sample buffer για 30' στους 37°C και διαχωρήστηκαν με SDS-PAGE (8% separating gels). Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη nitrocellulose (Hybond-C Extra membrane, Amersham Biosciences) και μπλοκαρίστηκαν (blocked) για 2h σε διάλυμα Tris-Buffered Saline με 0,1% Tween 20 (TBS-T) και 5% γάλα χωρίς λιπαρά (non-fat milk) σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες επώαστηκαν επιπλέον για 2h σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των πρωτογενών αντισωμάτων (primary antibodies) α) mMDQ (όπως περιγράφηκε πίνακα 4) σε αραιώση 1:100 και β) το μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό έναντι της ανθρώπινης β-actin σε αραιώση 1:5000 (Sigma, A5441). Αμφότερα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε διάλυμα TBS-T συγκέντρωσης 5% γάλακτος χωρίς λιπαρά. Επιπλέον οι μεμβράνες επώαστηκαν παρουσία του goat anti-mouse IgG HRP-conjugated (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc.) δευτερογενούς (secondary) αντισώματος (αραιώση 1:2000 σε διάλυμα TBS-T, 5% γάλακτος χωρίς λιπαρά) για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνικών επιτόπων, έγινε πάνω σε X-ray φιλμ με το ECL Detection System (GE Healthcare Life Sciences) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

6. Έλεγχος τοξικότητας διάφορων παραγόντων (agents)

Ο έλεγχος της τοξικότητας των διάφορων παραγόντων και ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς αυτής της ερευνητικής εργασίας και η σε πραγματικό χρόνο παρατήρηση της επίδρασης τους στην ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό

και επιβίωση (cell growth, proliferation, morphology and viability) των κυττάρων *in vitro* μελετήθηκε με το σύστημα xCELLigence RTCA DP system (ACEA biosciences Inc.). Ως βέλτιστος αρχικός αριθμός κυττάρων για τα επιμέρους πειράματα, ορίστηκαν τα 5×10^3 κύτταρα ανα well (πηγάδι) των ειδικών xCELLigence E-plates 16 (Roche 546983) τρυβλίων καλλιέργειας. Οι IC50 τιμές υπολογίστηκαν με το RTCA λογισμικό (ACEA biosciences)

Η έκθεση των κυττάρων στα διάφορα ελεγχόμενα μόρια έγινε χρονικά στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων (συνήθως 48 ή 72 ώρες μετά την έναρξη των πειραμάτων). Στην περίπτωση της azacytidine η έκθεση έγινε στις 24 ώρες (λεπτομερής περιγραφή των επιμέρους παραμέτρων γίνεται πιο κάτω).

DMSO (ως διαλύτης) (Sigma Aldrich D5879) σε 0.1% συγκέντρωση.

Microcystin-YR (Abraxis MICROYRSTD-0.1) 100pM to 100nM

Microcystin-RR (Abraxis MICRORSTD-0.1) 100pM to 100nM

Microcystin-LR (Enzo[®] Lifesciences ALX-350-012), 1nM – 100μM

5-Azacytidine (Sigma Aldrich A2385) 100nM – 10μM

GemcitabineHCl (Sigma Aldrich G6423) and their 1nM – 100μM

N-Acetyl-L-Cysteine (Sigma Aldrich A7250) 1nM – 100μM

GemcitabineHCl 10nM, 100nM και 1μM σε συνδυασμό με Microcystin-LR 1μM

Όλα τα δείγματα έτυχαν επανάληψης τουλάχιστον 2 φορές.

7. Εκτίμηση της διαδικασίας Απόπτωσης – Κυτταρομετρία Ροής

Για τον έλεγχο της ικανότητας των: Microcystin-LR, Gemcitabine HCl και του συνδυασμού τους να προκαλέσουν απόπτωση σε *in vitro* καλλιεργούμενες κυτταρικές σειρές, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικός πληθυσμός 1×10^5 κυττάρων, καλλιεργήθηκε για 48h σε 24-well plates (τριβλία) σε πλήρες μέσο καλλιέργειας πριν απο την έκθεση τους στους ανωτέρω παράγοντες α) 1μM, 10μM και 100μM MC-LR β) 10nM, 100nM και 100μM GemcitabineHCl γ) 100nM GemcitabineHCl παρουσία 1μM MC-LR. Η έκθεση στους παράγοντες υπο μελέτην, διήρκησε 48 ώρες και κατα το τέλος της περιόδου αυτής τα κύτταρα συνελέγησαν και πλύθηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο ακολουθούμενο απο ένα επιπλέον βήμα πλύσιματος με κρύο PBS (Invitrogen 70013016). Τα κύτταρα μετά τα στάδια εκπλύματος, αναδεύτηκαν σε 1x FITC Annexin V Binding Buffer (BD Pharmigen™ 556454) σε τελική συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml. Κλάσματα των 100μl (1×10^5 κύτταρα) απο κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα 5ml και προστέθηκαν 5μl απο έναστο: Annexin V (BD Pharmigen™ 556420) και PI (Propidium Iodide, Invitrogen P3566, final concentration 50μg/ml) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15' στο σκοτάδι. Επιπλέον 1x FITC Annexin V Binding Buffer προστέθηκε στο κάθε δείγμα μέχρις τελικού όγκου 1ml.

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με τη μέθοδο πρόσδεσης FITC Annexin V και χρώσης PI (10,000 events ανα δείγμα) έγινε με το Partec ML flow cytometer (CyFlow®ML, Partec, Munster, Germany) το οποίο φέρει argon laser, και χρησιμοποιηθηκαν τα FL1 και FL3 κανάλια ανίχνευσης αντίστοιχα. Τα δεδομένα αναλήθηκαν με το λογισμικό FloMax.

Το κλάσμα βιώσιμων κυττάρων στις 48 ώρες απο την έκθεση των κυτταρικών μοντέλων στους υπο μελέτην παράγοντες (viable cell fraction – VCF48) ορίστηκε ως το άθροισμα των θετικά μετρήσιμων γεγονότων Annexin V και αρνητικών PI (ιωδιούχο Propidium), και δίδεται ως ποσοστό του συνολικού πληθυσμού κυττάρων

(βιώσιμα κύτταρα ή μη μετρήσιμη απόπτωση) (279). Θετική μέτρηση για Annexin V και αρνητική για PI, δείχνει απόπτωση σε αρχικό στάδιο με ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Τέλος, θετική μέτρηση για Annexin V και PI υποδηλώνει απόπτωση τελικού σταδίου και κυτταρικό θάνατο.

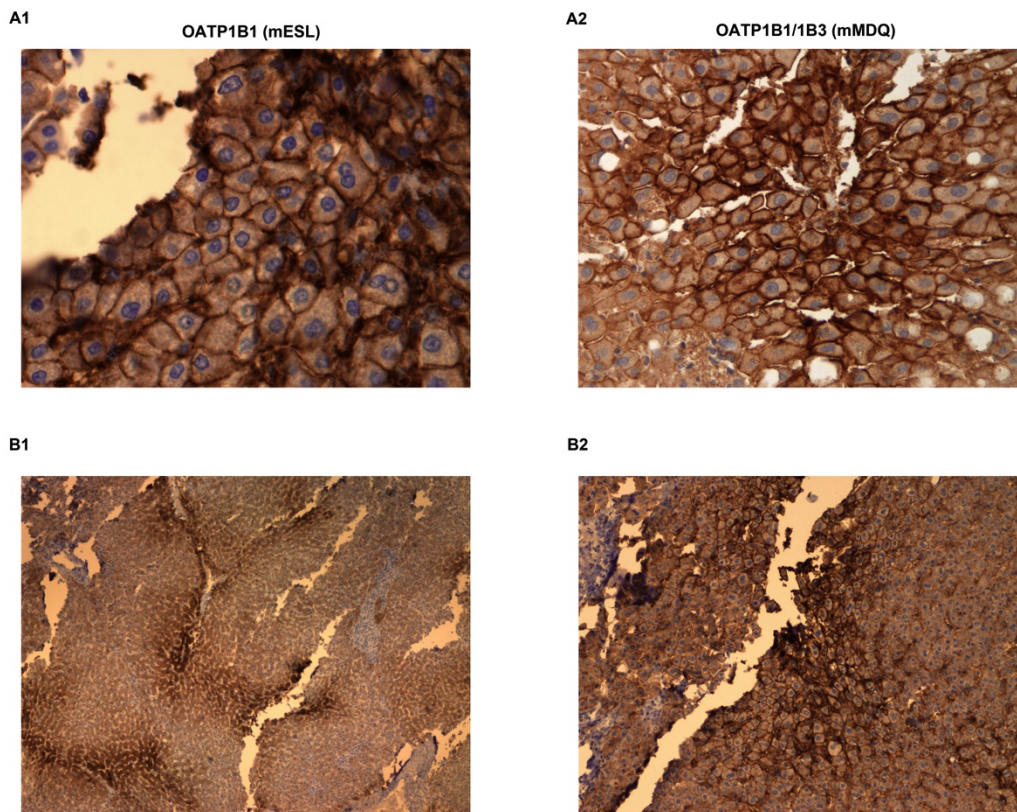
8. Λογισμικό

Το GraphPad Prism (ver. 5) χρησιμοποιήθηκε για σχεδιασμό γραφημάτων και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο TissueGNOSTICS – HistoQuest (Vienna, Austria).
in silico Σχεδιασμός:Modeller 9.11 (San Francisco, CA, USA)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Πρωτεϊνική έκφραση διακομιστών οργανικών ανιόντων σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό.

Η έκφραση των χαρακτηριζόμενων στη διεθνή βιβλιογραφία ως “Liver Specific” διακομιστών οργανικών ανιόντων OATP1B1 και OATP1B3, εξετάστηκε σε δείγματα (n=2) ανθρώπινου φυσιολογικού ήπατος και χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο θετικού ελέγχου (+ve control). Η ανοσοϊστοχημική χρώση για τα δύο υπο μελέτην πολυπεπτιδικά μόρια, αποδείχθηκε καθολική και εντοπισμένη κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη σχήμα 11 (A1), (A2). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια ξεκάθαρη αύξημένη έκφραση στα περι-πυλαία διαστήματα (periportal area) σχήμα 11 (B1), (B2).

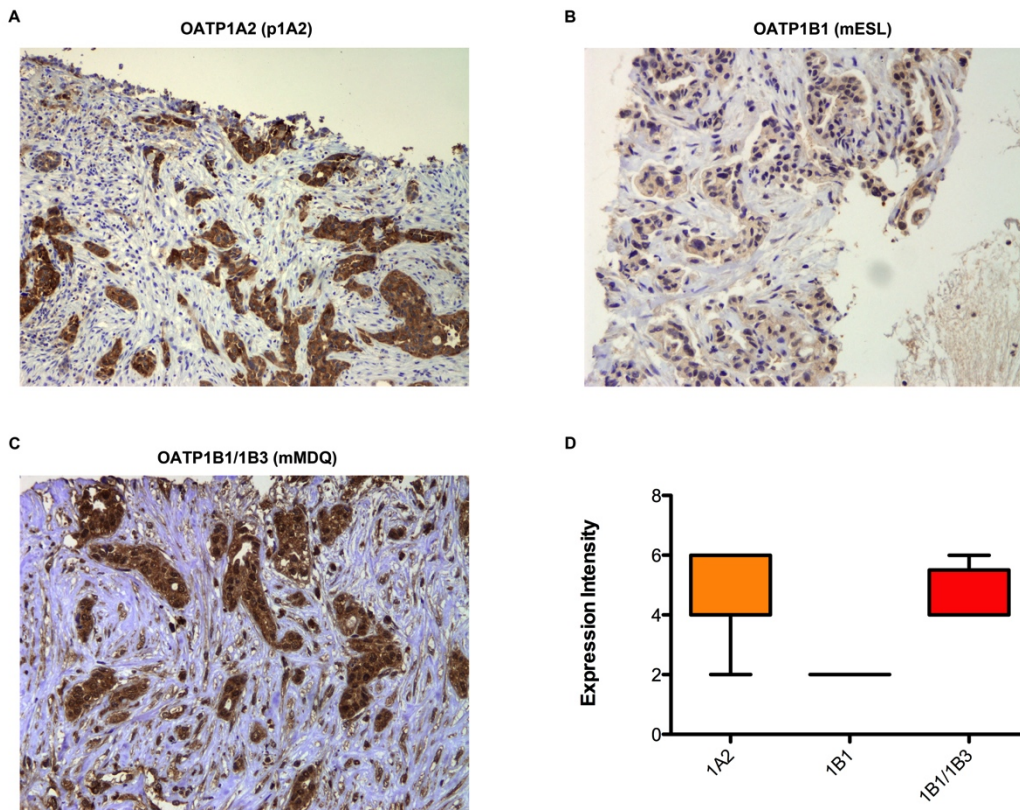


Σχήμα 11 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των OATP1B1 και OATP1B1/1B3 με τα αντισώματα mESL (A1, B1) και mMDQ (A2, B2).

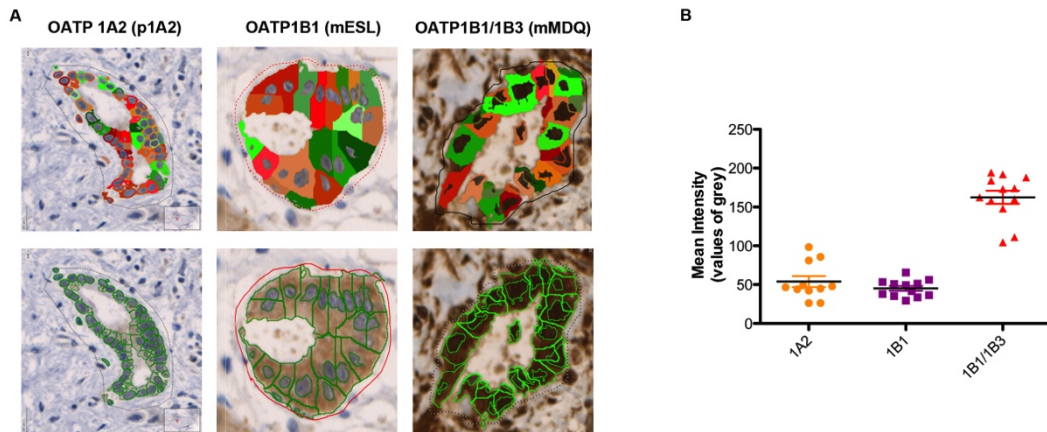
Διακρίνεται ο σαφής κυτταρομεμβρανικός εντοπισμός των OATPs 1B1 και 1B3 (A1 και A2) καθώς και η αυξημένη ένταση της χρώσης στην περιπυλαία περιοχή (periportal area) φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος.

2. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs σε παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα.

Οι διακομιστές οργανικών ανιόντων OATP1A2, 1B1 και 1B3, βρέθηκαν να παρουσιάζουν καθολική έκφραση σε όλα τα υπό μελέτην δείγματα βιοψίας παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος. Η εκτεταμένη και καθολική ανοσοϊστοχημική χρώση του καρκινικού κυτταρικού παρεγχύματος επιβεβαιώθηκε απο αμφότερες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ονομαστικά α) παθολογοανατομική εκτίμηση σχήμα 12 (D) και β) με την αυτοματοποιημένη μέθοδο TissueGNOSTICS σχήμα 13 (B).



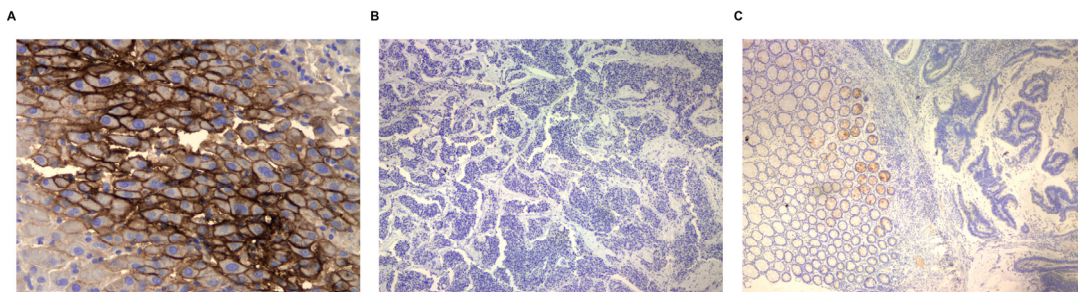
Σχήμα 12 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των OATP- (A) 1A2, (B) 1B1 και (C) 1B1/1B3 σε δείγματα ανθρώπινου ιστού ασθενών με διεγνωσμένο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα. (D) Παθολογοανατομικός προσδιορισμός της έντασης της έκφρασης των OATP1A2, 1B1 και 1B3 (n=12)



Σχήμα 13 Ανάλυση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των ιστικών δειγμάτων της εικόνας 2 με τη μέθοδο TissueGNOSTICS. (A) Εντόπιση των καρκινικών κυττάρων και χαρακτηρισμός της έντασης της χρώσης ανά κύτταρο. (B) Συνολικά αποτελέσματα της έκφρασης των OATP1A2, 1B1 και 1B3 (n=12) μετά την ανάλυση με τη μέθοδο TissueGNOSTICS

Συγκεκριμένα η έκφραση για τον OATP1A2, χαρακτηρίστηκε ως ασθενής για ένα δείγμα και μέτρια έως ισχυρή για τα υπόλοιπα έντεκα. Η ποσοτική ανάλυση με τη μέθοδο TissueGNOSTICS – HistoQUEST ανέδειξε έκφραση με μέση ένταση 53.88 μονάδων (SE 7.19). Η έκφραση του OATP1B1 βρέθηκε να είναι ασθενής και για τα 12 δείγματα με μέση ένταση 45.10 μονάδες (SE 3.15). Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος με το αντίσωμα mMDQ για τους OATP1B1/1B3 ανέδειξε τη μεγαλύτερη ένταση. Σε εννέα περιπτώσεις η χρώση ήταν μέτρια και σε τρεις ισχυρή. Η δε ανάλυση με τη μέθοδο HistoQUEST έδειξε μέση ένταση 167.90 μονάδων (SE 8.27) σχήμα 12 και 13.

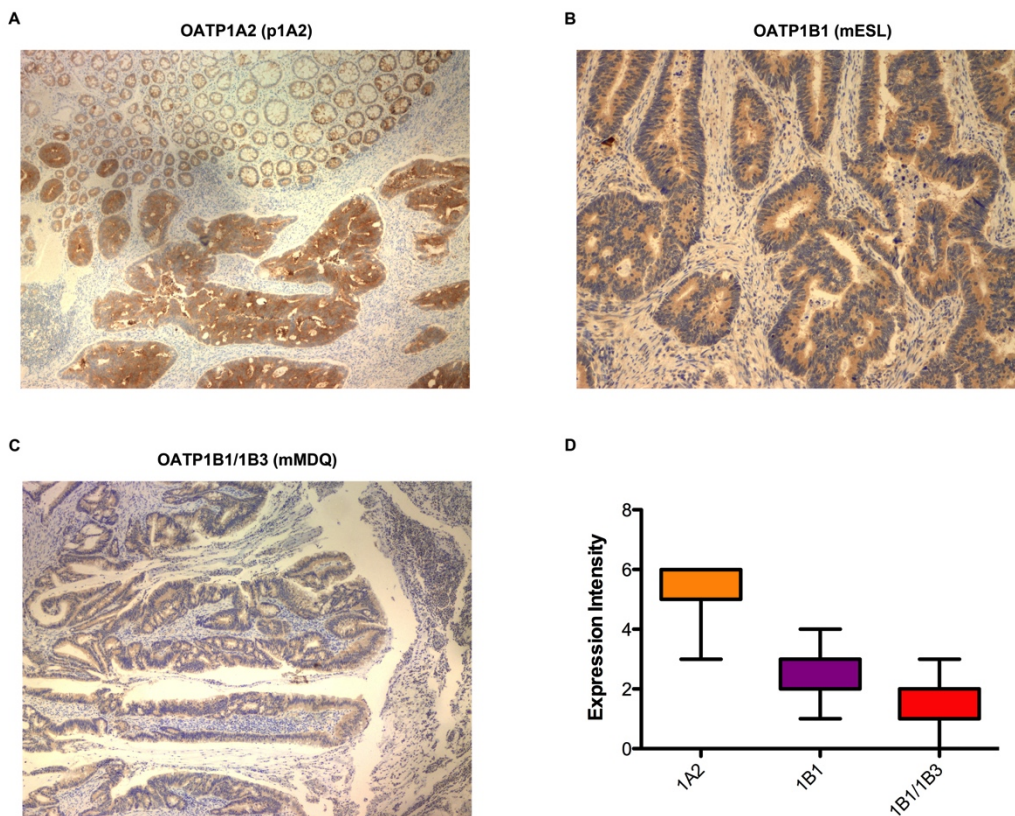
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση αδυναμίας ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού του OATP1B3 με το πολυκλωνικό αντίσωμα p1B3 το οποίο ανιχνεύει συγκεκριμένο επίτοπο κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του διακομιστή. (σχήμα 14 B). Σε όλα τα δείγματα (n=12) αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος που μελετήθηκαν. Η ειδικότητα και λειτουργικότητα του p1B3 αντισώματος ελέγχθηκε επιτυχώς σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό σχήμα 14 (A).



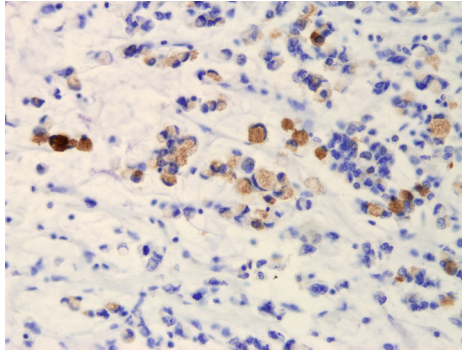
Σχήμα 14. Ανοσοϊστοχημική χρώση για εντοπισμό επίτοπου στο καρβοξυ-τελικό άκρο του OATP1B3 με το πολυκλωνικό αντίσωμα p1B3 σε ιστό (A) φυσιολογικού ήπατος, και αδενοκαρκίνωμα του (B) παγκρέατος (n=12) και (C) του εντέρου (n=30)

3. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs σε αδενοκαρκίνωμα του εντέρου

Η μελέτη έκφρασης και εντοπισμού των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε σειρά 31 δειγμάτων ιστού ασθενών με διεγνωσμένο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, ανέδειξε ως τον ισχυρότερα εκφραζόμενο διακομιστή τον 1A2 ακολουθούμενο από τους 1B1 και 1B3 των οποίων η έκφραση χαρακτηρίστηκε ως ασθενής προς μέτρια και ασθενής αντίστοιχα σχήμα 15 (A), (B) και (C). Αναλυτικότερα η παθολογοανατομική κατάταξη και βαθμονόμηση έδειξε ότι τα πολυπεπίδια 1A2, 1B1 και 1B3 παρουσίασαν μέση έκφραση 5.58 (SE 0.14), 2.65 (SE 0.16) και 1.68 (SE 0.13) αντίστοιχα σε κλίμακα από το 0 (αρνητική έκφραση) – 6 (ισχυρή έκφραση) όπως περιγράφεται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο της Μεθοδολογίας σχήμα 15 (D). Χαρακτηριστική ήταν η εντόπιση των OATP1B1/1B3 (mMDQ) σε πρωτοπαθή επιθηλικής προέλευσης νεοπλάσματα του παχέος εντέρου με κύτταρα «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet-ring cell carcinoma) σχήμα 16



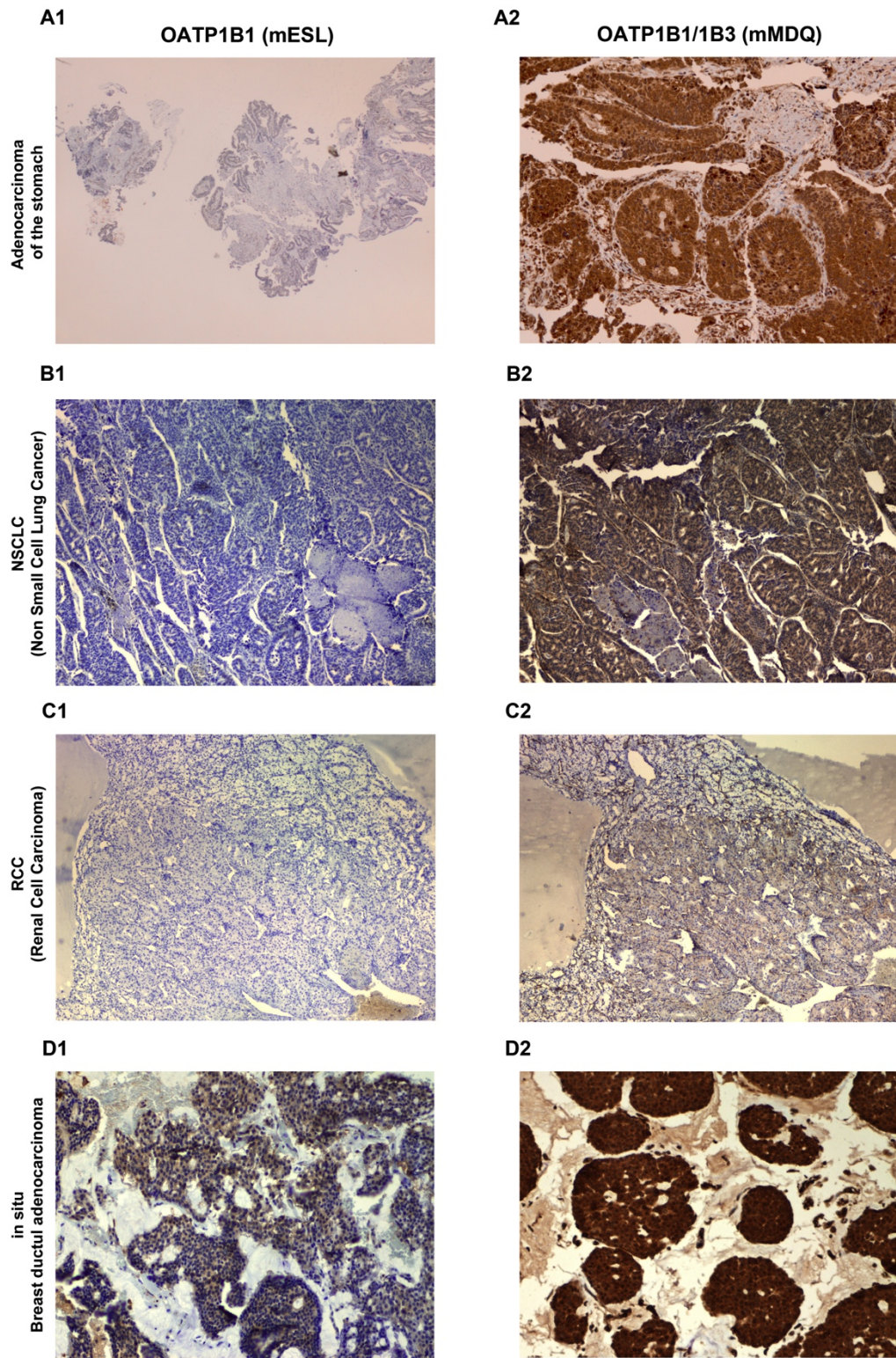
Σχήμα 15. Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έκφρασης των (A) OATP1A2, (B) OATP1B1 και (C) OATP1B1/1B3 σε αδενοκαρκίνωμα του εντέρου (n=30). (D) Παθολογοανατομική εκτίμηση για την ένταση της έκφρασης στο σύνολο των υπο μελέτην δειγμάτων.



Σχήμα 16. Χαρακτηριστική έκφραση του OATP1B1/1B3, όπως αποτυπώθηκε ανοσοϊστοχημικά με το αντίσωμα mMDQ σε επιθηλιακής προέλευσης νεοπλασία του παχέος εντέρου, με κύτταρα τύπου «σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet ring cell carcinoma)

4. Ενδεικτική μελέτη έκφρασης των OATPs σε διάφορους τύπους καρκίνου

Αντιπροσωπευτικός ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έκφρασης των δύο διακομιστών της OATP1B- υπο-οικογένειας σε διάφορους τύπους νεοπλασιών χαμηλής διαφοροποίησης: αδenoκαρκίνωμα του στομάχου (n=10), καρκίνωμα απο πλακώδες επιθήλιο του πνεύμονος και νεφροκυτταρικό, έδειξαν εξεσημασμένη έκφραση του OATP1B3, ενώ ήταν αδύνατο να επιβεβαιωθεί η παρουσία του 1B1. Αντίθετα σε δείγμα διηθητικού πορογενούς καρκίνωματος του μαστού, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος παρουσιάστηκε θετικός και για τους δύο διακομιστές με τον 1B3 να δείχνει εντονότερη έκφραση σχήμα 17.

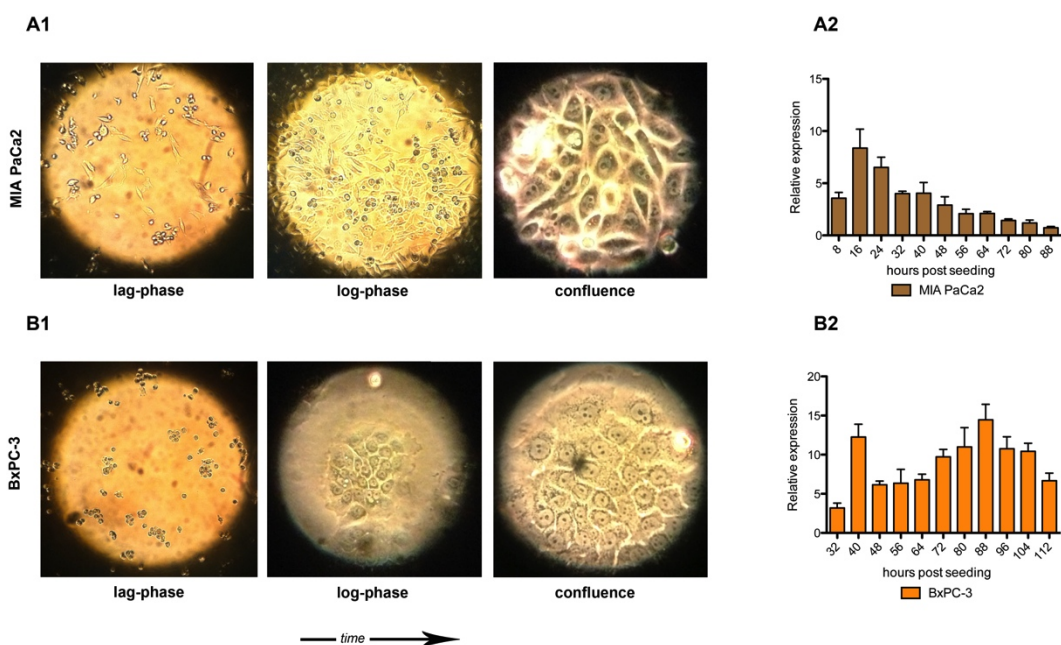


Σχήμα 17 Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έκφρασης των (1) OATP1B1 και (2) OATP1B1/1B3 σε δείγματα (A) αδενοκαρκινώματος στομάχου, (B) Μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, (C) νεφροκυτταρικού καρκινώματος και (D) in situ πορογενούς αδενοκαρκινώματος του μαστού

5. Σχετική mRNA έκφραση του OATP1B3 σε *in vitro* καλλιέργεια κυτταρικών σειρών καρκίνου παγκρέατος

Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του διακομιστή οργανικών ανιόντων 1B3, και το πως αυτή μεταβάλλεται σε σχέση με το χρόνο που παραμένουν τα κύτταρα σε καλλιέργεια *in vitro*, ανέδειξε μια σαφώς δυναμική αύξηση της έκφρασης στα πρώτα στάδια της καλλιέργειας για τα κύτταρα MIA PaCa2 με μέγιστη σχετική έκφραση στις 16 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας (8.36 μονάδες, SE 1.82) που αργότερα ελαττώθηκε εκθετικά και με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (0.74 μονάδες, SE 0.12) να παρατηρούνται κατά το τέλος της καλλιέργειας στις 88 ώρες σχήμα 18 B1. Αντίθετα, τα κύτταρα BxPC-3 βρέθηκε να παρουσιάζουν σχετικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του OATP1B3 καθ' όλη τη μελετούμενη χρονική διάρκεια με μέγιστη έκφραση στις 88 ώρες (14.46 μονάδες, SE 1.99) από την έναρξη της καλλιέργειας και με την ελάχιστη έκφραση (3.20 μονάδες, SE 0.60) να παρατηρείται στην αρχή της καλλιέργειας σχήμα 18 B2.

Συγκρίνοντας την έκφραση του OATP1B3, για τις δύο κυτταρικές σειρές, φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) με τα κύτταρα BxPC-3 να έχουν αυξημένη εκφραση κατά 2.65- φορές σε σχέση με την κυτταρική σειρά MIA PaCa2. Η μέση σχετική έκφραση για τις δύο κυτταρικές σειρές όπως υπολογίστηκε, έφτασε τις 8.89 (SE 1.00) και 3.36 (SE 0.70) μονάδες αντίστοιχα.



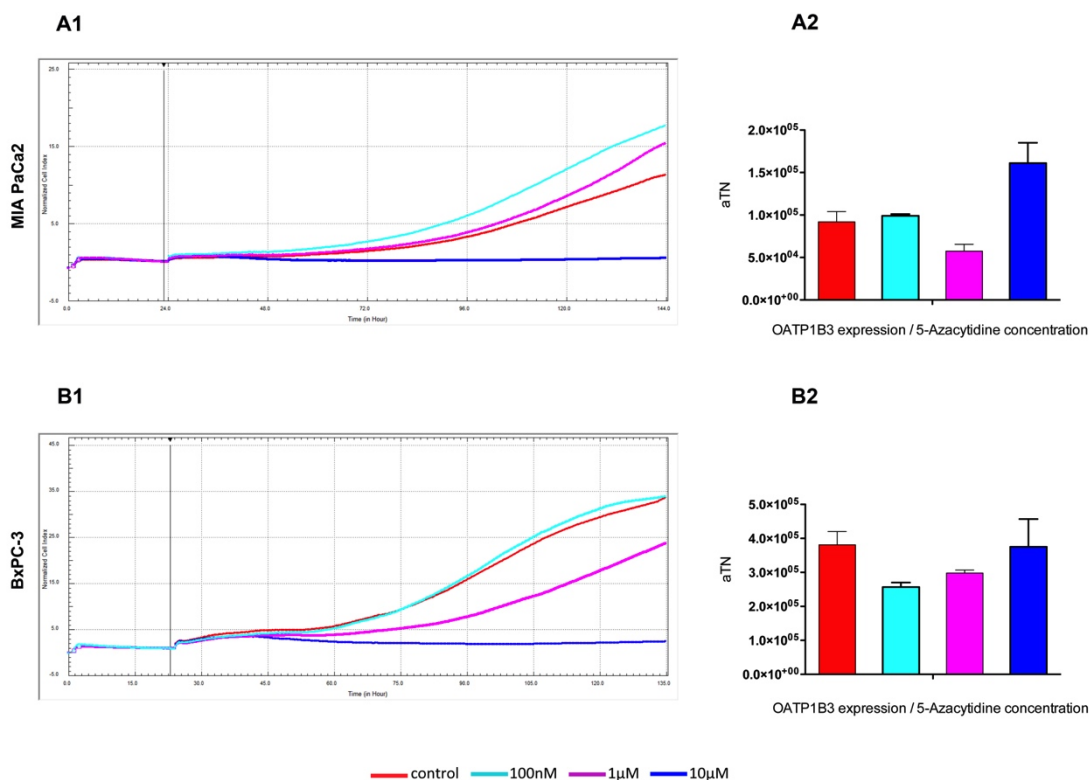
Σχήμα 18 Μικροσκοπική παρατήρηση των σταδίων (προσκόλλησης, λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης και πλήρους ανάπτυξης) της *in vitro* καλλιέργειας των παγκρεατικών καρκινικών σειρών (A1) MIA PaCa2 και (B1) BxPC-3. (A2) και (B2) Κινητική της σχετικής ενδογενούς έκφρασης (mRNA) του OATP1B3 στα διάφορα χρονικά στάδια της *in vitro* ανάπτυξης των δύο κυτταρικών μοντέλων.

6. Έλεγχος επίδρασης και επιγενετικοί χειρισμοί για μεταβολή της έκφρασης των OATPs με την υπομεθυλωτικό παράγοντα 5-Azacytidine.

6.1 Μονήρης έκθεση των κυτταρικών σειρών σε 5-azacytidine

Η μελέτη σε πραγματικό χρόνο με τη μέθοδο xCELLigence, ανέδειξε ότι η επίδραση μονήρους έκθεσης 5-Azacytidine σε τελική συγκέντρωση 100nM δεν προκάλεσε σημαντική διαφορά στην κινητική ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών MIA PaCa2 και BxPC-3 σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου αντίθετα με την συγκέντρωση των 10μM όπου παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της ανάπτυξης. Η ενδιάμεση συγκέντρωση 1μM 5-Azacytidine στα κύτταρα BxPC-3 έδειξε να προκαλεί σημαντική παράταση στην κινητική της λογαριθμικής ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σχήμα 19 (A1), (B1)

Η έκθεση των MIA PaCa2 κυττάρων σε 1μM και 10μM 5-AZA, βρέθηκε να προκαλεί μείωση κατά 40.0% και αύξηση κατά 75.1% της έκφρασης του OATP1B3 αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του 1B3 δε βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά σχήμα 19 (A2), (B2) από την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου.

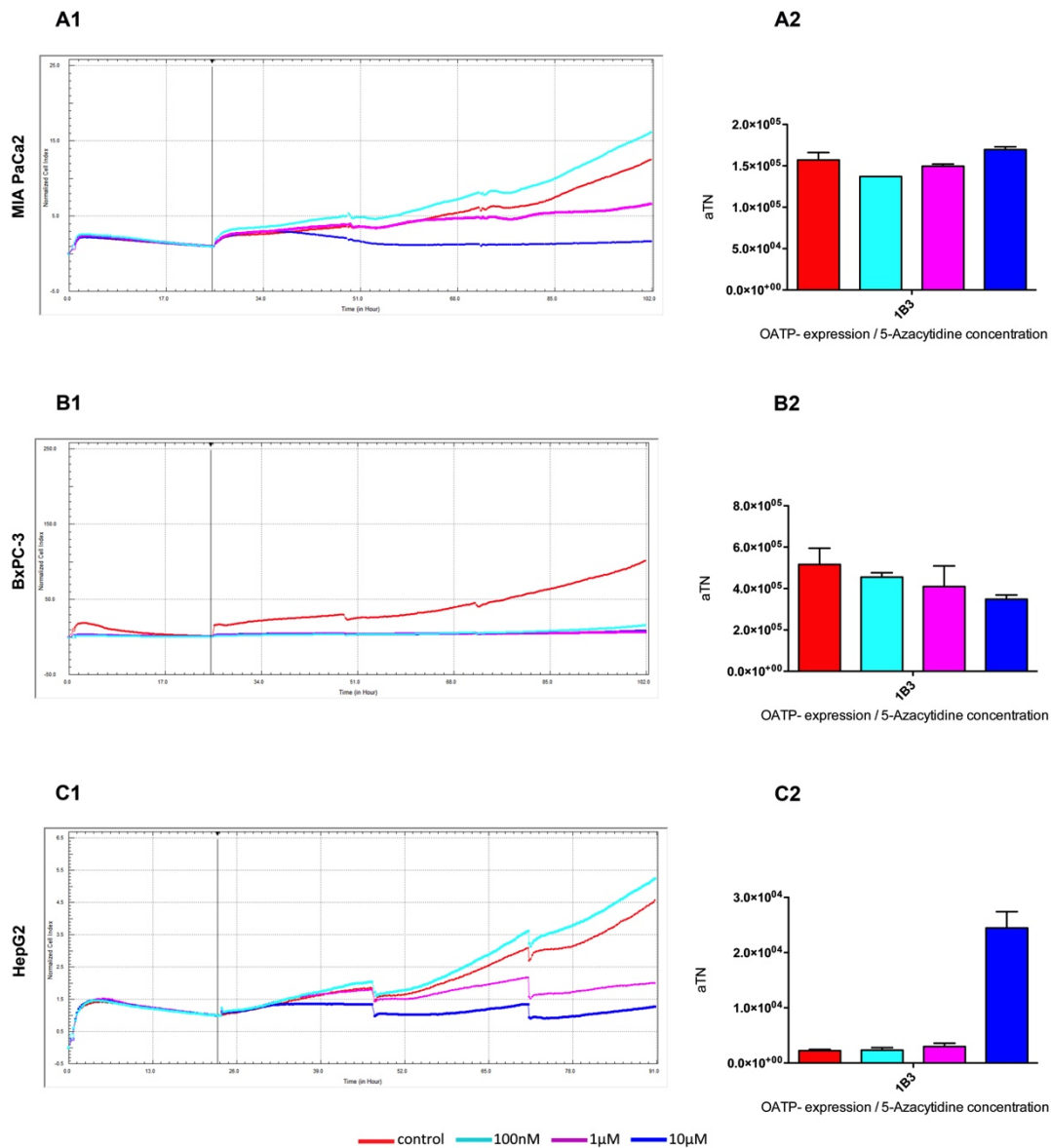


Σχήμα 19 Μελέτη με το σύστημα xCELLigence της επίδρασης του παράγοντα 5-azacytidine (100nM – 10μM) στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό και βιωσιμότητα των (A1) MIA PaCa2 και (B1) BxPC-3 κυτταρικών σειρών. Στα γραφήματα xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης που συμπίπτει με την έκθεση των κυτταρικών μοντέλων στον παράγοντα 5-azacytidine. Απόλυτη έκφραση σε επίπεδο mRNA του διακομιστή OATP1B3 στα κύτταρα (A2) MIA PaCa2 και (B2) BxPC-3 μετά την έκθεση των κυττάρων σε 100nM – 10μM 5-Azacytidine και σύγκριση τους με την αντίστοιχη έκφραση στην ομάδα ελέγχου κάθε σειράς (κόκκινο).

6.2 Καθημερινή (ανά 24ώρο ανανέωση) έκθεση κυτταρικών σειρών σε 5-azacytidine.

Για τις κυτταρικές σειρές MIA PaCa2 και HepG2, φάνηκε ότι η για 72ώρες έκθεση σε 100nM 5-Azacytidine με ανά 24-ωρο ανανέωση του παράγοντα, δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στην κινητική ανάπτυξης των εν λόγω κυττάρων όπως αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο xCELLigence. Η χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων, 1μM και 10μM έδειξαν σαφή απόκλιση του ρυθμού ανάπτυξης ή/και της μορφολογίας σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου σχήμα 20 (A1) και (C1). Η χρήση 5-Azacytidine σε όλες τις συγκεντρώσεις (100nM – 10μM) προκάλεσε πλήρη αναστολή ανάπτυξης και μεταβολή στη μορφολογία της κυτταρικής σειράς BxPC-3, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στο σχήμα 20 (B1).

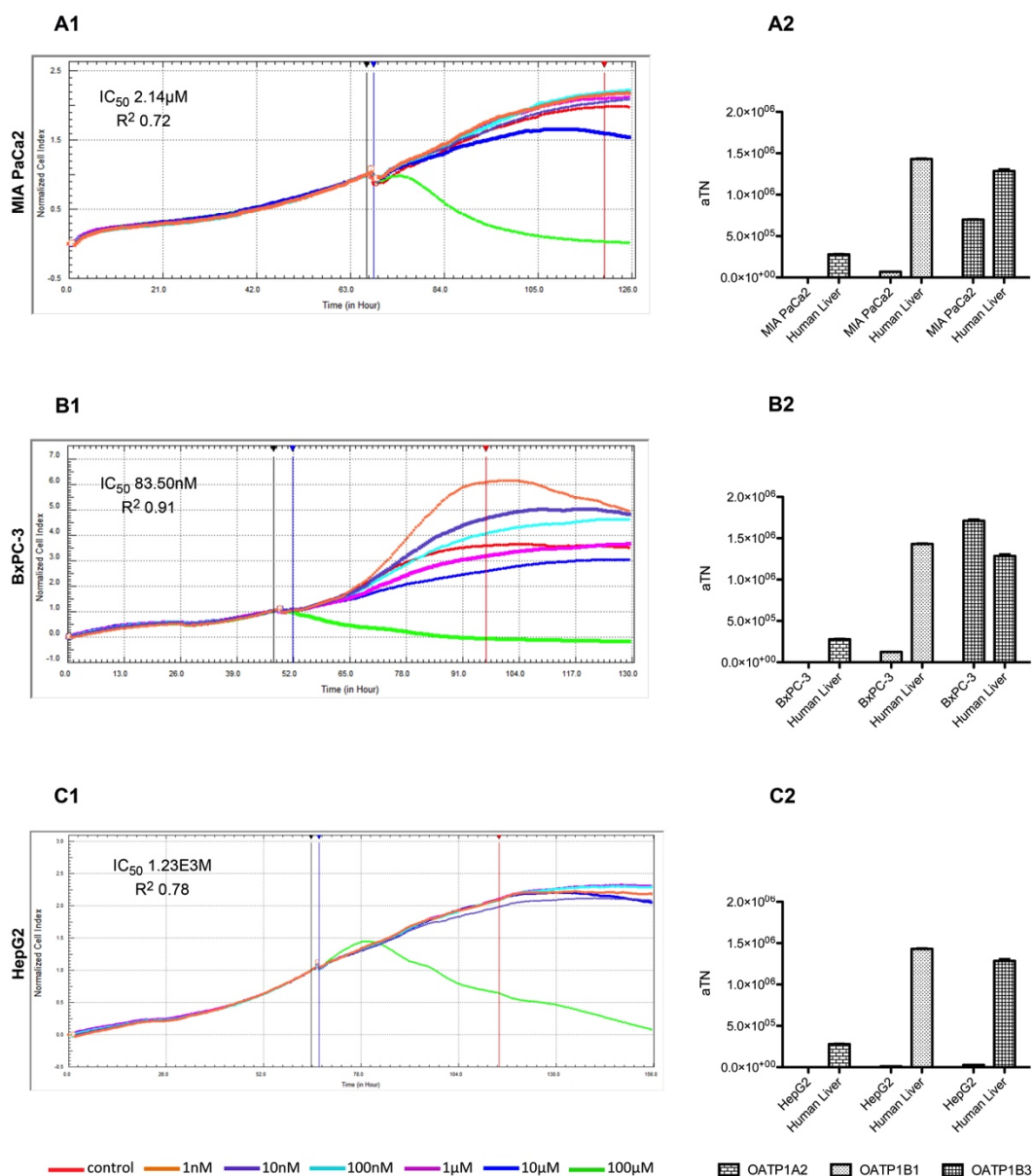
Η καθημερινή ανανέωση των επιπέδων της 5-Azacytidine προκάλεσε τελικά αύξηση κατά 10.99 φορές της απόλυτης έκφρασης του OATP1B3 σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όταν χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10μM στην κυτταρική σειρά HepG2. Η εν λόγω έκφραση του διακομιστή OATP1B3 στην κυτταρική σειρά HepG2 μετρήθηκε στα 24.5×10^3 αντίγραφα (aTN) (SE 2.95×10^3) σχήμα 20 (C2), περίπου 6.4- και 21.1- φορές χαμηλότερα από ότι η ενδογενής έκφραση στις ομάδες ελέγχου των MIA PaCa2 (1.57×10^5 aTN, SE 9×10^3) και BxPC-3 (5.17×10^5 aTN, SE 7.9×10^4) αντίστοιχα σχήμα 20 (A2), (B2).



Σχήμα 20 Μελέτη με το σύστημα xCELLigence της επίδρασης στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό και βιωσιμότητα των (A1) MIA PaCa2, (B1) BxPC-3 και (C1) HepG2 κυτταρικών σειρών, καθημερινής έκθεσης στον παράγοντα 5-azacytidine (100nM – 10μM). Στα γραφήματα xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης που συμπίπτει με την 1^η έκθεση των κυτταρικών μοντέλων στον παράγοντα 5-azacytidine. Απόλυτη έκφραση σε επίπεδο mRNA του διακομιστή OATP1B3 στα κύτταρα (A2) MIA PaCa2, (B2) BxPC-3 και (C2) HepG2 μετά την καθημερινή έκθεση σε 100nM – 10μM 5-Azacytidine. Η σύγκριση γίνεται με την αντίστοιχη έκφραση στην ομάδα ελέγχου κάθε σειράς (κόκκινο). Σημειώνεται δε, ότι η έκφραση των OATP1A2 και OATP1B1 ελέγχθηκε και βρέθηκε μηδενική για όλες τις κυτταρικές σειρές και συγκεντρώσεις 5-Azacytidine. Για σκοπούς καλύτερης παρουσίασης των αποτελεσμάτων, τα αρνητικά αποτελέσματα έκφρασης των συγκεκριμένων διακομιστών, δεν συμπεριλαμβάνεται στα αντίστοιχα γραφήματα

7. Μελέτη της κυτταροτοξικής επίδρασης της MC-LR σε καρκινικές σειρές παγκρέατος.

Η Μικροκυστίνη-LR όπως καταδεικνύει η μελέτη της μορφολογίας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη μέθοδο xCELLigence, παρουσιάζεται ικανή να αναστείλει σε μερικό βαθμό την ανάπτυξη των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών MIA PaCa2 και BxPC-3, ενώ οι αντίστοιχες IC₅₀ συγκεντρώσεις (half maximal inhibitory concentration) ήταν 2.14μM (R² 0.72) και 83.50nM (R² 0.91) αντίστοιχα για τα δύο κυτταρικά μοντέλα σχήμα 21 (A1) και (B1). Η καλής διαφοροποίησης κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2 παρουσίασε ευασθησία μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση MC-LR (100μM) σχήμα 21 (C1).

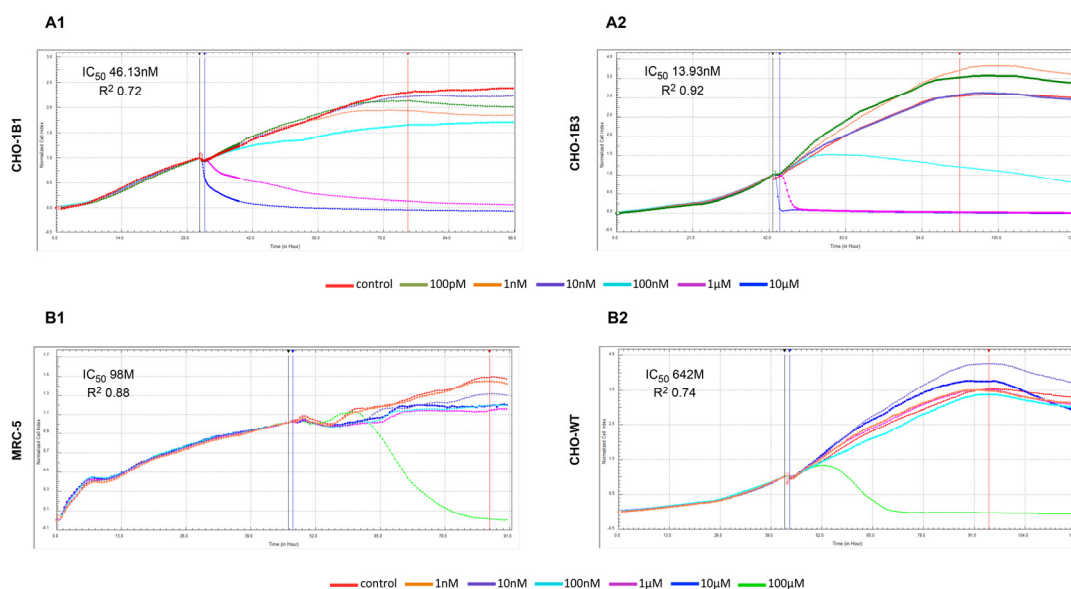


Σχήμα 21 Επίδραση της μικροκυστίνης-LR (1nM – 100μM) στις κυτταρικές σειρές (A1) MIA PaCa2, (B1) BxPC-3 και (C1) HepG2. Μελέτη με το σύστημα xCELLigence των μεταβολών στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό, βιωσιμότητα και υπολογισμός των αντίστοιχων IC₅₀ συγκεντρώσεων. Στα γραφήματα του συστήματος xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης που συμπίπτει με

την έκθεση των κυτταρικών μοντέλων στην MC-LR, ενώ οι μπλέ και κόκκινες αφορίζουν το χρονικό διάστημα για το οποίο υπολογίζεται η τιμή IC₅₀ για κάθε κυτταρική σειρά. Στα γραφήματα (A2), (B2) και (C2) καταγράφεται η απόλυτη έκφραση σε επίπεδο αντιγράφων mRNA των διακομιστών OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 για την κάθε σειρά συγκρινόμενα με τη αντίστοιχη ενδογενή έκφραση τους σε ιστό ανθρώπινου ήπατος.

Τα διαμολυσμένα και γενετικά τροποποιημένα CHO- (Chinese Hamster Ovary) κύτταρα που εκφράζουν τους ανθρώπινους OATPs -1B1 και -1B3 παρουσίασαν διάμεση ανασταλτική συγκέντρωση μικροκυστίνης-LR (IC₅₀) 46.13nM (R² 0.72) και 13.93nM (R² 0.92) αντίστοιχα σχήμα 22 A1 και A2.

Τα κύτταρα CHO-WT που αποτέλεσαν μοντέλο αρνητικού ελέγχου (-ve control) για τα CHO-1B1 και CHO-1B3 και η κυτταρική σειρά φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών MRC-5 γνωστή για τη μη έκφραση διακομιστών οργανικών ανιόντων (ref) (-ve control) έδειξαν αμφότερα πληρη ανοχή στην τοξική επίδραση της μικροκυστίνης-LR με IC₅₀ τιμές 98M (R² 0.88) και 642M (R² 0.74) σχήμα 22 B1 και B2.

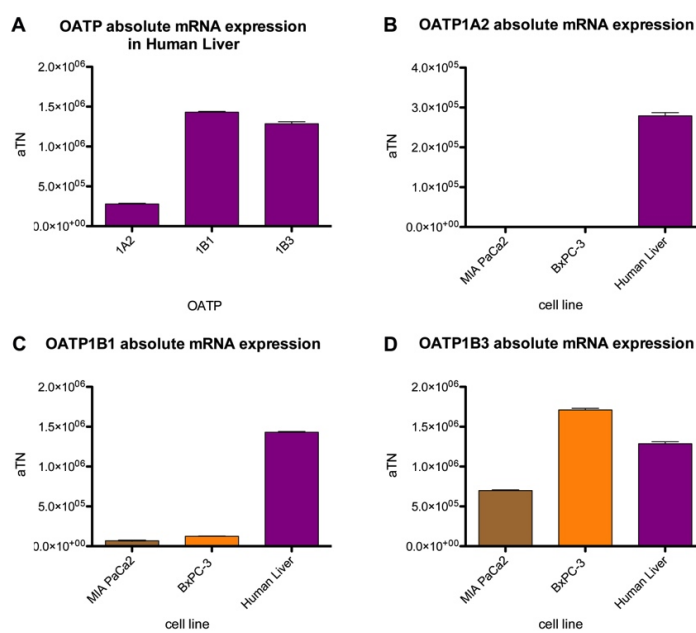


Σχήμα 22 Επίδραση της μικροκυστίνης-LR στις κυτταρικές σειρές (A1) CHO-1B1, (A2) CHO-1B3, (B1) MRC-5 και (B2) CHO-WT. Μελέτη με το σύστημα xCELLigence των μεταβολών στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό, βιωσιμότητα και υπολογισμός των αντίστοιχων IC₅₀ συγκεντρώσεων. Στα γραφήματα του συστήματος xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης που συμπίπτει με την έκθεση των κυτταρικών μοντέλων στην MC-LR, ενώ οι μπλέ και κόκκινες αφορίζουν το χρονικό διάστημα για το οποίο υπολογίζεται η τιμή IC₅₀ για κάθε κυτταρική σειρά.

8. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε παγκρεατικές σειρές.

Η έκφραση των τριών βασικών εκπροσώπων της οικογένειας OATP1 αξιολογήθηκε με rt-PCR, που επιβεβαίωσε ισχυρή παρουσία του OATP1B3, πλήρη έλλειψη έκφρασης του OATP1A2 (σχήμα 23 D και B) και μικρότερη έκφραση του OATP1B1 στις MIA PaCa2 και BxPC-3 κυτταρικές σειρές (σχήμα 23 C).

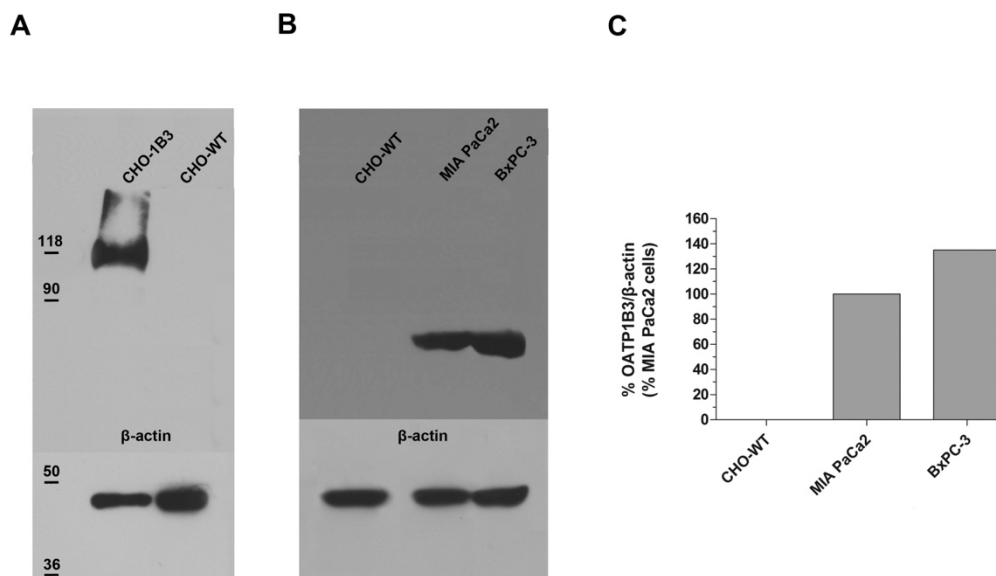
Τα mRNA επίπεδα του OATP1B3 στα BxPC-3 κύτταρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη τιμή (1.71×10^6 aTN, SE 21.3×10^4), 2.44-φορές περισσότερο από την αντίστοιχη έκφραση στα κύτταρα MIA PaCa2 (7×10^5 aTS, SE 8.4×10^3) και 33.1% υψηλότερο σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης του διακομιστή στο ανθρώπινο ήπαρ (1.29×10^6 aTS, SE 2.5×10^4) (σχήμα 23 D). Ο διακομιστής OATP1B1 έδειξε τα υψηλότερα επίπεδα στον ιστό έλεγχου (ήπαρ) (1.43×10^6 aTS) το οποίο είναι σημαντικά χαμηλότερο στις MIA PaCa2 και BxPC-3 κυτταρικές σειρές κατά 11.35- και 20.72- φορές αντίστοιχα (σχήμα 23 C). Επιπλέον, στο ανθρώπινο ήπαρ το προφίλ έκφρασης των υπο μελέτην διακομιστών, κατατάσσει τον 1B1 ως τον ισχυρότερα εκφραζόμενο (1.43×10^6 aTS, 1×10^4 SEM) με τον 1B3 να ακολουθεί στη δεύτερη θέση (1.29×10^6 aTS, 2.5×10^4 SEM) και τον 1A2 να παρουσιάζει μια σχετικά μικρότερη έκφραση σε σχέση με τα δύο προαναφερθέντα πολυπεπτιδικά μόρια (2.79×10^5 , 8×10^3 SEM) (σχήμα 23 A).



Σχήμα 23 Απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός χρησιμοποιώντας rt-PCR, της έκφρασης mRNA (A) των OATP -1A2, -1B1 και -1B3 σε ιστό ανθρώπινου ήπατος και (B) OATP1A2, (C) OATP1B1 και (D) OATP1B3, στις MIA PaCa2 και BxPC-3 κυτταρικές σειρές συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες στο ήπαρ

9. Πρωτεϊνική έκφραση OATPs – Western Blot / Densitometry

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του OATP1B3 στις δύο παγκρεατικές καρκινικές σειρές όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Western Blot, επιβεβαίωσαν την ισχυρή έκφραση του OATP1B3 (εικόνα 24B). Ψηφιακή ανάλυση των αποτελεσμάτων του Western Blot με τη μέθοδο της «πυκνομετρίας» (densitometry) έδειξε ότι στα BxPC-3, ο OATP1B3 παρουσίασε ποσοτική αύξηση κατά 38% σε σύγκριση με τα MIA PaCa-2 κύτταρα (σχήμα 24C).



Σχήμα 24 (A) και (B) Πρωτεϊνική έκφραση (Western Blot) και (C) Densitometric ανάλυση για την ποσοτικοποίηση του OATP1B3 στις MIA PaCa2, BxPC-3 και CHO (μοντέλο αρνητικού ελέγχου) κυτταρικών σειρών.

10. Έλεγχος τοξικότητας MC-LR, Gemcitabine και του συνδυασμού MC-LR/Gemcitabine σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

10.1 xCELLigence – παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο

Η επίδραση, διαφορετικών συγκεντρώσεων των παραγόντων microcystin-LR, gemcitabine και συνδυασμών τους στις κυτταρικές σειρές BxPC-3 και MIA PaCa2, μελετήθηκε με α) το σύστημα xCELLigence και β) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, δοκιμασία απόπτωσης Annexin-V/PI, με βάση την κανονικοποιημένη DRC (dose response curves) για χρονική διάρκεια 48 ώρες από την έκθεση. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν στο χρόνο της έκθεσης (48 ώρες από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας) για έγκυρη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ομάδων. Η microcystin-LR παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση στην κινητική ανάπτυξης των BxPC-3 κυττάρων, 2.71-φορές πιο πάνω σε σύγκριση με αυτήν της gemcitabine (σχήμα 25 A1 και A2), Αντίθετα, η gemcitabine βρέθηκε να είναι 168.11-φορές πιο αποτελεσματική από τη MC-LR στα MIA PaCa2 κύτταρα (σχήμα 25 B1 και

B2). Επιπλέον, τα BxPC-3 κύτταρα βρέθηκαν να είναι πιο επιρρεπή κατά 25.63-φορές, στην τοξική επίδραση της MC-LR συγκρινόμενα με τα MIA PaCa2 κύτταρα. Όταν τα MIA PaCa2 κύτταρα εκτέθηκαν στην gemcitabine έδειξαν 17.8-φορές περισσότερη ευαισθησία από ότι η κυτταρική σειρά BxPC-3. Ταυτόχρονη έκθεση και στους δύο παράγοντες, έδειξε ότι η προσθήκη 1 μM MC-LR ενισχύει την τοξική επίδραση της gemcitabine στα κύτταρα MIA PaCa2 και BxPC-3 κατά 2.89- και 79.02- φορές αντίστοιχα (σχήμα 25 C1 και C2).

10.2 Κυτταρομετρία Ροής

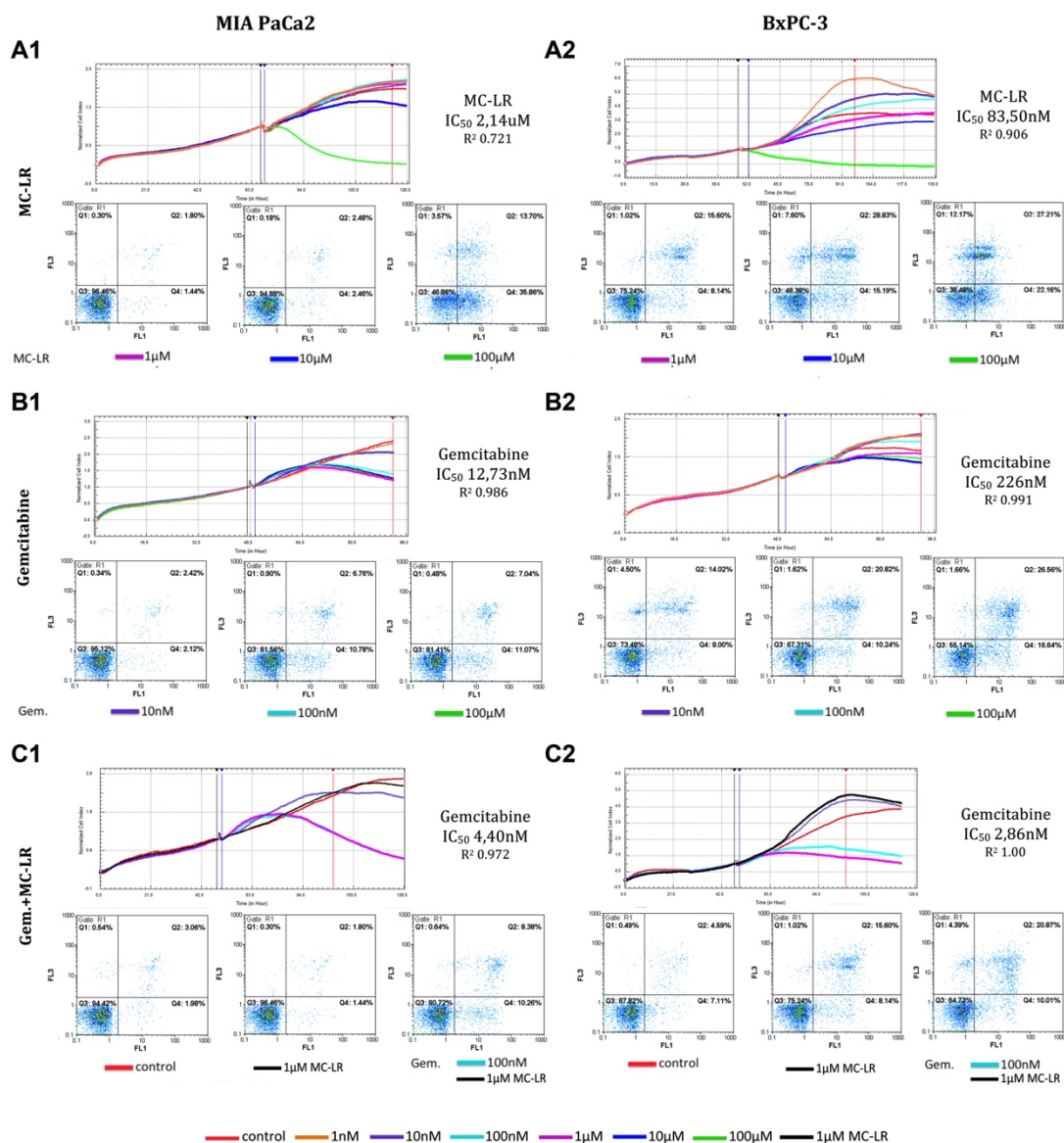
Οι ομάδες ελέγχου MIA PaCa2 και BxPC-3 παρουσίασαν (viable cell fraction 48h) VCF48 τιμές 94,42% και 87,82% αντίστοιχα (σχήμα 25 A1 και A2).

10.2.1 Τοξικότητα MC-LR

Η κυτταρική σειρά MIA PaCa2 έδειξε ευαισθησία στην τοξική δράση της MC-LR όταν η τελευταία χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 μM (VCF48 45.86%) (Σχήμα 25 A1), ενώ η έκθεση σε gemcitabine, εμφανίζει πιο έντονη ευαισθησία με VCF48 81.41% και 81.56% για συγκεντρώσεις 100 μM και 100nM αντίστοιχα (σχήμα 25 B1). Η έκθεση σε microcystin-LR έδειξε μια σαφή δόσο-εξαρτώμενη απόπτωση στα κύτταρα BxPC-3, με το VCF48 να μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης της τοξίνης. Τα VCF48 για τα BxPC-3 κύτταρα, υπολογίστηκαν σε 75.24%, 48.38% και 38.46% για 1 μM , 10 μM και 100 μM MC-LR αντίστοιχα (σχήμα 25 A2).

10.2.2 Τοξικότητα Gemcitabine

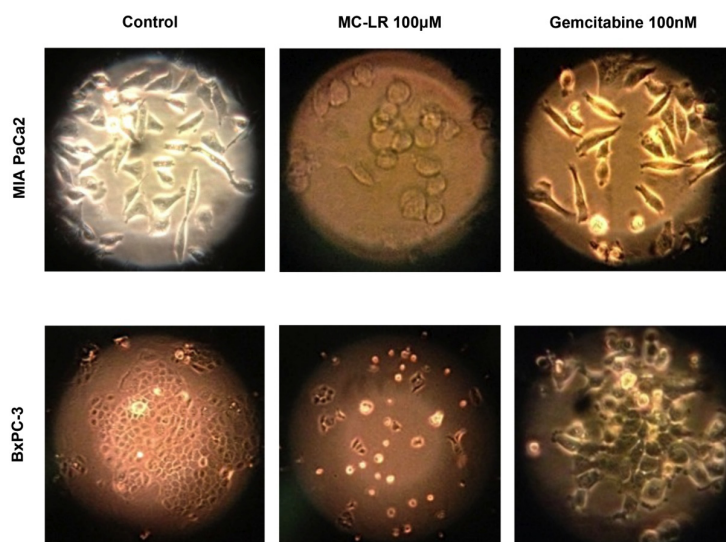
Δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα παρατηρήθηκε και για την gemcitabine με 73.48%, 67.31% και 55.14% VCF48 για τα BxPC-3 κύτταρα όταν εκτέθηκαν σε 10 nM, 100nM και 100 μM αντίστοιχα (σχήμα 25 B2). Αντίθετα η κυτταρική σειρά MIA PaCa2, παρουσίασε μη-δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα όταν εκτέθηκε στη gemcitabine με VCF48 που κυμάνθηκαν από 81.56% σε 81.41% για συγκεντρώσεις 100nM και 100 μM . Έκθεση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις gemcitabine δεν έδειξαν τοξική επίδραση στα εν λόγω σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (σχήμα 25 B1).



Σχήμα 25. Επίδραση στην κινητική ανάπτυξης, τη μορφολογία και τη βιωσιμότητα των κυττάρων όπως έχει αξιολογηθεί από το σύστημα xCELLigence σε πραγματικό χρόνο και μελέτη της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής Annexin-V/PI αντίστοιχα για (A1) και (A2) microcystin-LR, (B1) και (B2) gemcitabine και (C1) και (C2) συνδυασμός microcystin-LR με gemcitabine στις κυτταρικές σειρές MIA PaCa2 και BxPC-3. Στα διαγράμματα xCELLigence που απεικονίζονται οι DRC (dose response curves) καμπύλες, οι μαύρες κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στο χρονικό σημείο κανονικοποίησης, ενώ οι μπλε και κόκκινες κάθετες γραμμές καταδεικνύουν το χρονικό διάστημα για το οποίο υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα IC_{50}

Οι μικροσκοπικές μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται από έκθεση διάρκειας 24 ωρών των κυτταρικών δειρών στους δύο παράγοντες φαίνονται στο σχήμα 26. Σε αντίθεση με τη MC-LR, που όπως απεικονίζεται, προκάλεσε αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων και συνέβαλε επίσης και στην αποκόλληση τους από το τρυβλίο καλλιέργειας. Η έκθεση σε gemcitabine, έδειξε να είναι ικανή να αναστείλει την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό (proliferation), διατηρώντας ταυτόχρονα τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά των κυττάρων (σχήμα 26). Επιπλέον, θεωρούμε

σκόπιμο να επισημάνουμε ότι ο συνδυασμός των δύο ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παρουσίασε συνεργική κυτταροτοξική δράση με δυναμική αναστολή ανάπτυξης, καθώς και ικανότητά να προκαλέσει μη-αναστρέψιμη βλάβη και τελικά να οδηγήσει τα κύτταρα στην απόπτωση.



Σχήμα 26 Μικροσκόπηση παρατήρηση των κυτταρικών μοντέλων MIA PaCa2 και BxPC-3, 24 ώρες μετά απο έκθεση σε microcystin-LR (100 µM) και gemcitabine (100 nM). Γίνεται σύγκριση με τη μορφολογία κυττάρων που δεν έτυχαν χειρισμών (μοντέλο ελέγχου).

11. Έλεγχος της κυτταροπροστατευτικής δράσης/ικανότητας της N-acetylcystein

Ο ρόλος της N-acetylcysteine ως κυτταροπροστατευτικό μόριο μελετήθηκε και αξιολογήθηκε ως το τελικό αποτέλεσμα και το ρυθμό μεταβολής της προκαλούμενης απο MC-LR τοξικότητας σε κυτταρικές σειρές.

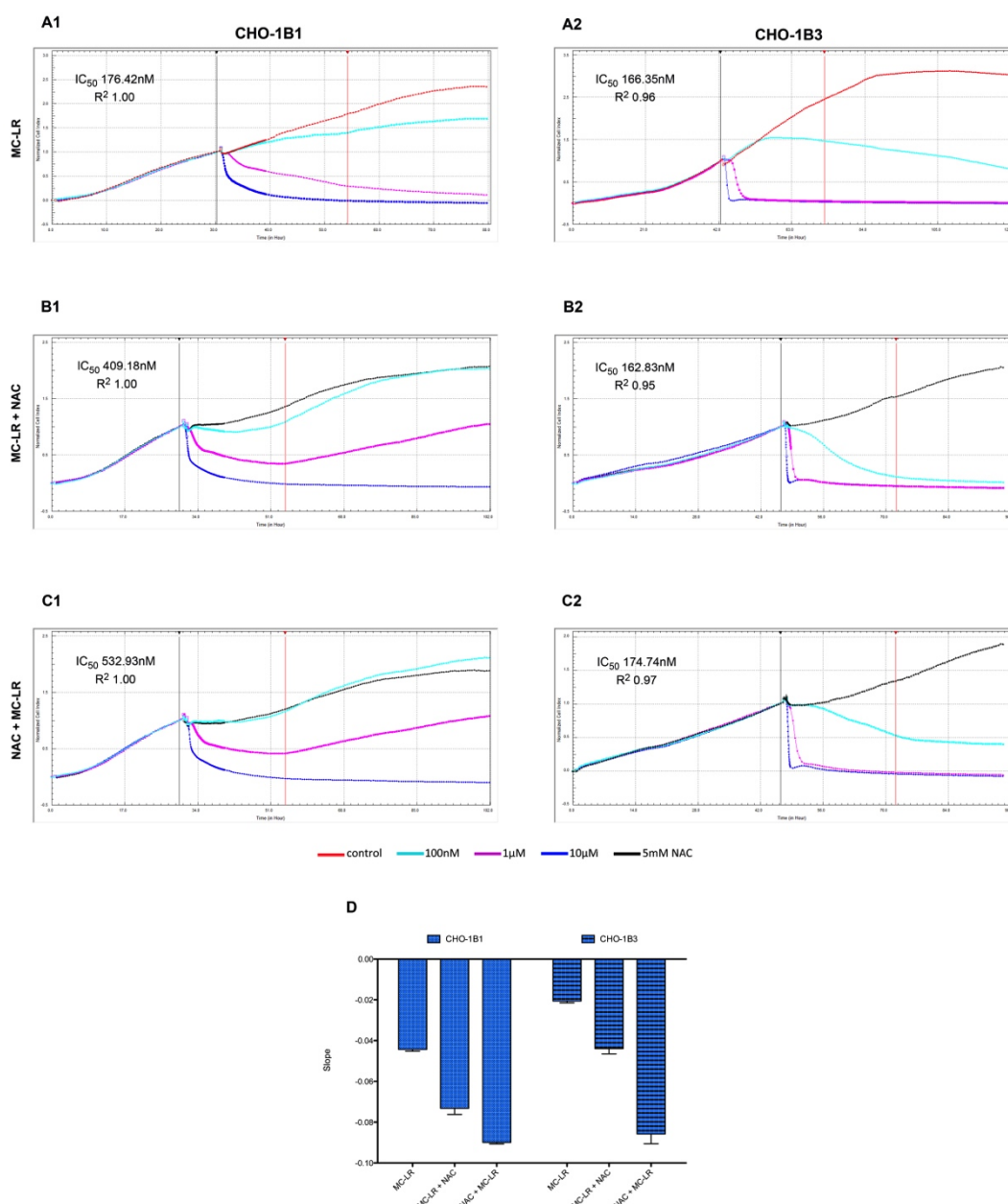
Η συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος έκθεσης σε μικροκυστίνη για τα διαμολυσμένα CHO-1B1 και CHO-1B3, έδειξε αρχικά σαφή κυτταροτοξικότητα με IC50 176.42nM (R2 1.00) και 166.35nM (R2 0.96) αντίστοιχα μετά το πρώτο 24 ώρο απο την έκθεση (σχήμα 27 A1 A2).

Η προσθήκη 5mM N-acetylcystein στο μέσο καλλιέργειας κατά 30 λεπτά μετά- (MC-LR + NAC) ή προ- (NAC + MC-LR) την έκθεση στην τοξίνη προκάλεσε μείωση κατά 2.3- και 3- φορές της ευαισθησίας των CHO-1B1 σχήμα 27 B1 C1.

Λεπτομερέστερη ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε εφικτή προσέγγιζοντας τη μέση κλίση των DRCs (dose response curves) για χρονικό διάστημα 12 ωρών απο τους διάφορους χειρισμούς (έκθεση σε MC-LR ± NAC) με σκοπό την ορθολογιστική αξιολόγηση του ρυθμού μεταβολής στην ανάπτυξη, μορφολογία και βιωσιμότητα όπως καταγράφηκε απο το σύστημα xCELLigence.

Η απ' ευθείας σύγκριση της κλίσης των καμπυλών αναπτυξης για τις CHO-1B1 και CHO-1B3 κυτταρικές σειρές μετά την έκθεση τους σε 10µM μικροκυστίνης-LR, καταδεικνύει την κατά 52% ελάττωση του ρυθμού πρόκλησης τοξικότητας απο MC-LR στα κύτταρα που εκφράζουν αποκλειστικά τον OATP1B1 (σχήμα 27 D). Επιπλέον

μελέτη και σύγκριση της κλίσης των DRCs ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες για κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά, δείχνει ότι και στις δύο περιπτώσεις (CHO-1B1 και CHO-1B3) η προσθήκη 5mM NAC 30 λεπτά μετά την αρχική σε μικροκυστίνη έκθεση, προκάλεσε ελάττωση του ρυθμού πρόκλησης τοξικότητας κατά 40% και 52% αντίστοιχα σε σχέση με τη χρήση της μικροκυστίνης ως μόνο παράγοντα έκθεσης. Κατά παρόμοιο τρόπο, η προσθήκη 5mM NAC προ της έκθεσης σε μικροκυστίνη κατάφερε να προκαλέσει επιπλέον 19% και 49% ελάττωση του ρυθμού τοξικότητας απ' ότι όταν το υποψήφιο κυτταροπροστατευτικό μόριο προστέθηκε μετά την έκθεση στον τοξικό παράγοντα. Συνολικά, η μεγαλύτερη μείωση στο ρυθμό πρόκλησης τοξικότητας (2.1- και 4.1- φορές) παρατηρήθηκε όταν ο χειρισμός των κυττάρων με NAC προηγήθηκε της έκθεσης στην MC-LR για τις CHO-1B1 και CHO-1B3 αντίστοιχα σχήμα 27 D.

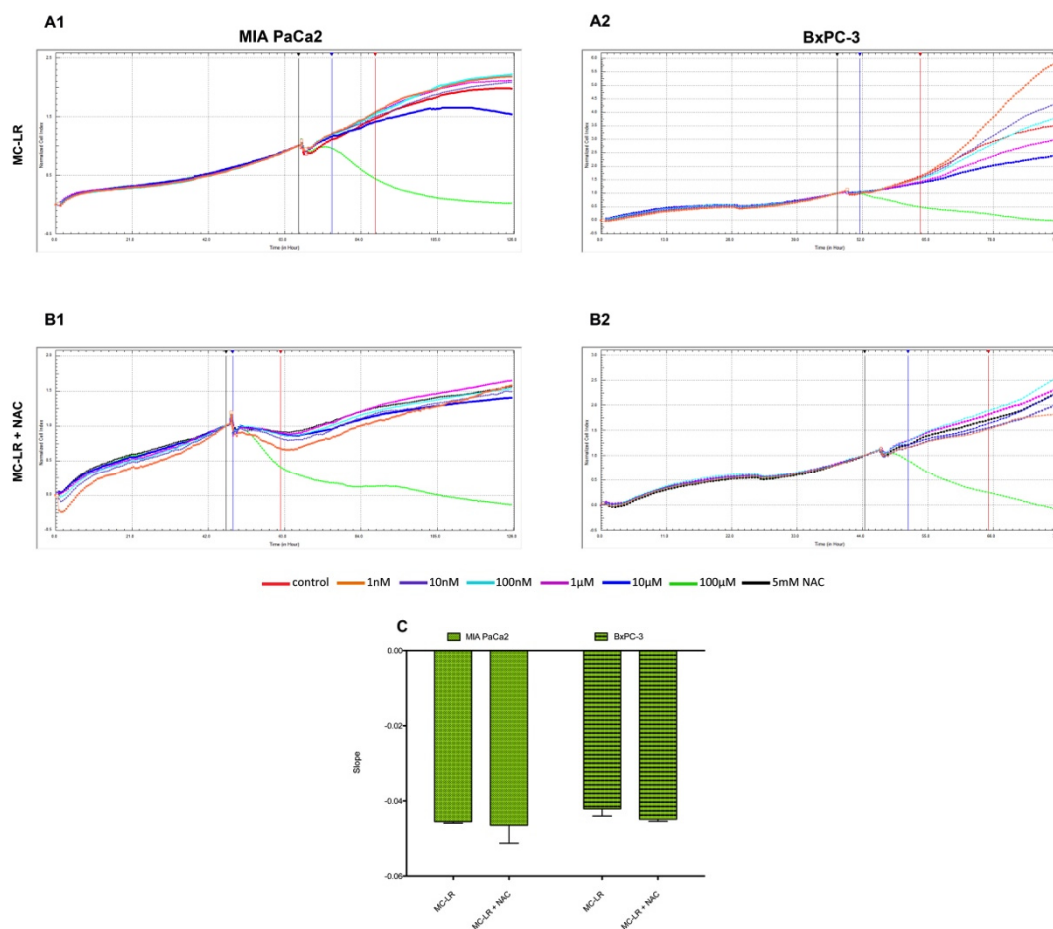


Σχήμα 27 Μελέτη με το σύστημα xCELLigence της μεταβολής στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό, βιωσιμότητα και υπολογισμός των αντίστοιχων IC_{50} συγκεντρώσεων για τις κυτταρικές σειρές CHO-1B1 και CHO-1B3 όταν αντίστοιχα

εκτέθηκαν σε (A1), (A2) 100nM – 10μM μικροκυστίνη-LR. (B1), (B2) 30' μετά την αρχική έκθεση σε μικροκυστίνη, ακολούθησε έκθεση σε 5mM N-acetylcysteine. (C1), (C2) Η έκθεση σε N-acetylcysteine προηγήθηκε χρονικά της έκθεσης σε μικροκυστίνη κατά 30'. Στα γραφήματα του συστήματος xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης. Οι κόκκινες γραμμές ορίζουν τη χρονική στιγμή όπου υπολογίστηκε η τιμή IC50 σε κάθε περίπτωση (24h μετά την έκθεση).

(D) Απεικονίζεται μέση κλίση για κάθε καμπύλη ανάπτυξης (DRC) που προέκυψε από την έκθεση των κυτταρικών σειρών σε 10μM MC-LR. Η μέση κλίση, υπολογίστηκε για διάστημα 12 ωρών από έκθεσως.

Η χρήση 5mM N-acetylcysteine στις παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές MIA PaCa2 και BxPC-3 κατά 30 λεπτά μετά την έκθεση των σειρών σε συγκεντρώσεις μικροκυστίνης (100μM – 1nM) έδειξε να περιορίζει το τοξικό αποτέλεσμα της MC-LR για τις συγκεντρώσεις 10μM – 1nM σε αμφότερα τα κυτταρικά μοντέλα (σχήμα 28 A1, A2, B1 και B2). Η ανάλυση της κλίσης των αντίστοιχων καμπύλων DRCs για τη μέγιστη συγκέντρωση 100μM μικροκυστίνης, έδειξε ότι η προσθήκη NAC δεν προκάλεσε οποιαδήποτε μεταβολή του ρυθμού τοξικότητας σε καμία από τις μελετούμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές (σχήμα 28 D).



Σχήμα 28 Μελέτη με το σύστημα xCELLigence της μεταβολής στη μορφολογία, πολλαπλασιασμό, βιωσιμότητα των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών MIA PaCa2 και BxPC-3 όταν αντίστοιχα εκτέθηκαν σε (A1), (A2) 1nM – 100μM

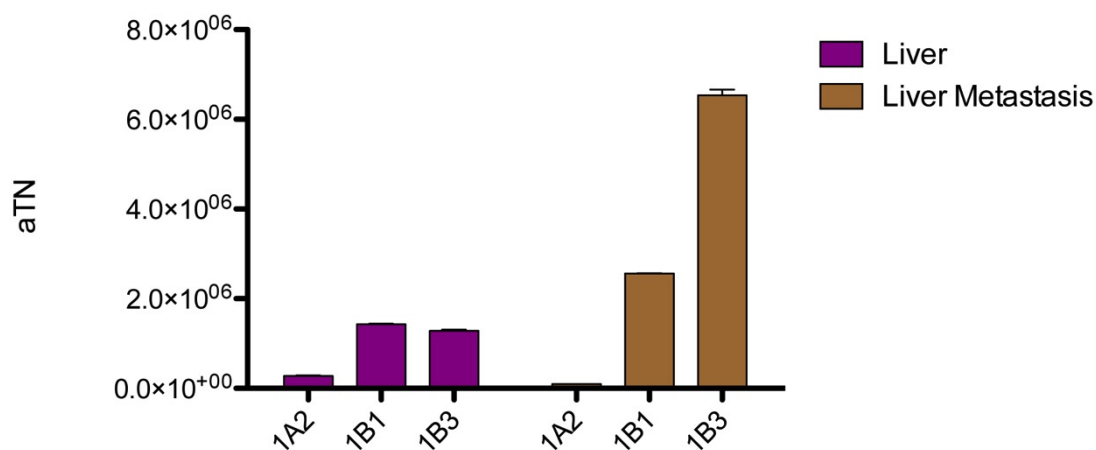
μικροκυστίνη-LR. (B1), (B2) 30' μετά την αρχική έκθεση σε μικροκυστίνη, ακολούθησε έκθεση σε 5mM N-acetylcysteine. Στα γραφήματα του συστήματος xCELLigence, οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κανονικοποίησης.

(D) Απεικονίζεται η μέση κλίση για κάθε καμπύλη ανάπτυξης (DRC) που προέκυψε από την έκθεση των κυτταρικών σειρών σε 100μM MC-LR. Οι μπλέ και κόκκινες γραμμές στα διαγράμματα xCELLigence ορίζουν τη χρονική περίοδο (12h) για την οποία υπολογίστηκε η μέση κλίση.

12. Προφίλ έκφρασης των OATPs σε ασθενή με πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα του εντέρου και συνοδό ηπατική νόσο.

12.1 Προσδιορισμός της mRNA έκφρασης των OATP- 1A2, 1B1 και 1B3.

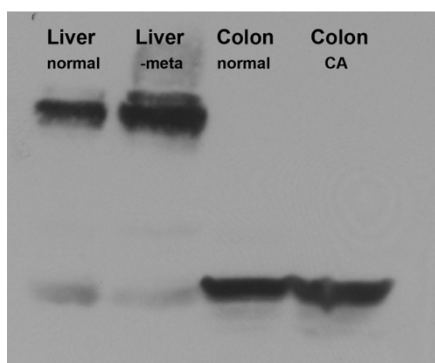
Ο προσδιορισμός της απόλυτης έκφρασης σε επίπεδο μεταγράφων των διακομιστών οργανικών ανιόντων 1A2, 1B1 και 1B3 με τη μέθοδο της rt-PCR σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό και σε παρακείμενη εστία ηπατικής μετάστασης για ασθενή με διεγνωσμένο πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Η πλήρης ανάλυση της έκφρασης στο φυσιολογικό ήπαρ παρατίθεται αναλυτικά στο πεδίο 8 του παρόντος κεφαλαίου. Επιπλέον, η έκφραση των OATP1B1 και 1B3 διακομιστών στην μεταστατική εστία μετρήθηκε στα 2.6×10^6 (SEM 5×10^3) και 6.5×10^6 (1.3×10^5) αντίγραφα αντίστοιχα. Συγκρινόμενη με το φυσιολογικό ήπαρ, η έκφραση των εν λόγω διακομιστών στον μεταστατικό ιστό παρουσίασε έντονη αύξηση κατά 1.8- και 5.1- φορές αντίστοιχα σχήμα 29.



Σχήμα 29 Απεικόνιση της απόλυτης έκφρασης σε επίπεδο mRNA των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε ανθρώπινο ιστό από φυσιολογικό ήπαρ και παρακείμενη ηπατική μεταστατική εστία από πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Η έκφραση μετράται σε απόλυτο αριθμό αντιγράφων.

12.2 Πρωτεϊνική έκφραση OATP1B3

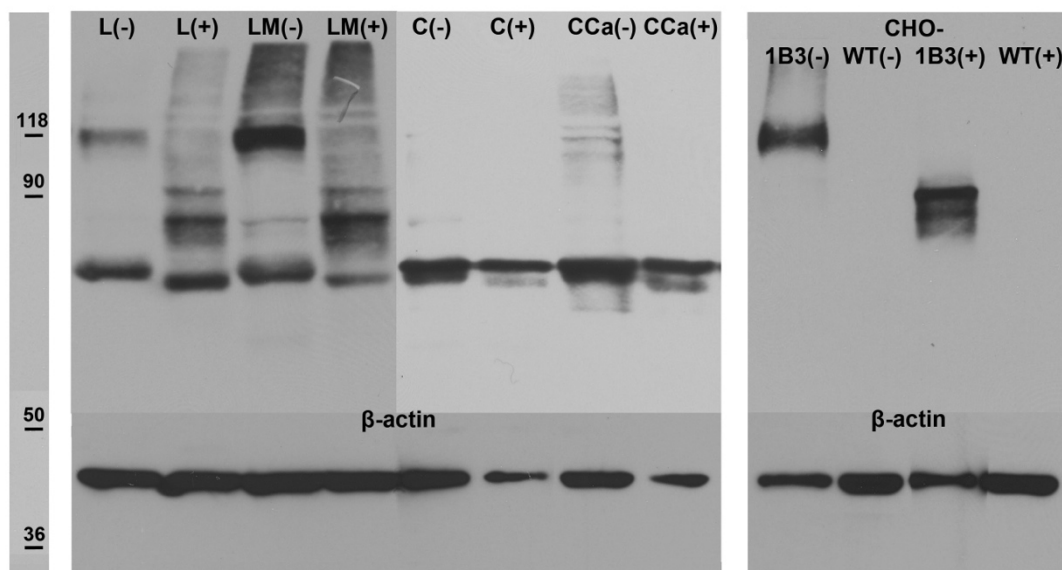
Η ανοσοαποτύπωση με το πολυκλωνικό αντίσωμα p1B3 για την εντοπισμό του OATP1B3 με τη μέθοδο Western Blot, επιβεβαίωσε την αναμενόμενη έκφραση του OATP1B3 στο φυσιολογικό ήπαρ ανιχνεύοντας προϊόν με μοριακό βάρος περίπου 120kDa του οποίου η αύξηση της έντασης που παρατηρείται στη δείγμα απο μεταστατική εστία έρχεται σε συμφωνία με την αύξηση που παρατηρήθηκε σε επίπεδο mRNA όπως περιγράφηκε πιο πάνω. Επιπλέον παρατηρήθηκε σαφώς διαφορετικό προφίλ έκφρασης του διακομιστή με διακριτή ανά ιστό έκφραση. Συγκεκριμένα στο φυσιολογικό ιστό εντέρου και στην πρωτοπαθή εστία της νόσου, απουσιάζει πλήρως η μπάντα που αντιστοιχεί στο προϊόν των 120kDa που ανευρίσκεται στο ήπαρ, ενώ αναδεικνύεται σαφής πρωτεϊνική οντότητα με μοριακό βάρος περίπου 78kDa, το οποίο εκφράζεται ασθενώς τόσο στο φυσιολογικό ήπαρ όσο και στη μεταστατική εστία σχήμα 30. Επιπλέον στο δείγμα ηπατικής μετάστασης, παρατηρείται μια αχνή μπάντα με ενδιάμεσο μέγεθος που το μοριακό της βάρος αντιστοιχεί περίπου στα 90kDa.



Σχήμα 30 Πρωτεϊνική έκφραση OATP1B1/1B3 όπως μελετήθηκε με το αντίσωμα mMDQ με τη μέθοδο Western Blot, για δείγμα απο (Liver normal) φυσιολογικό ήπαρ, (Liver -meta) ηπατική μεταστατική εστία, (Colon normal) φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου και (Colon CA) πρωτοπαθούς αδενοκαρκινώματος εντέρου, του ασθενούς που αναφέρεται στο σχήμα 29

12.3 Status γλυκοζυλίωσης OATP1B3)

Η διαδικασία απογλυκοζυλίωσης όπως φαίνεται στο σχήμα 31 προκάλεσε την μετατόπιση της 78kDa μπάντας προς τα κάτω επιβεβαιώνοντας την πλήρη απογλυκοζυλίωση της στο ήπαρ (L και LM) και μερική απογλυκοζυλίωση στο έντερο. Η μπάντα που εντοπίζεται στα 120kDa στο ήπαρ (φυσιολογικός ιστός και μεταστατική εστία) αλλά και στο κυτταρικό μοντέλο ελέγχου CHO-1B3, υποβαλλόμενη στη διαδικασία απογλυκοζυλίωσης αποκαλύπτει εκτός από το αναμενόμενο 90kDa μέγεθος του μη-γλυκοζυλιωμένου 1B3 και μια δεύτερη μορφή με μέγεθος περίπου 80kDa(?)

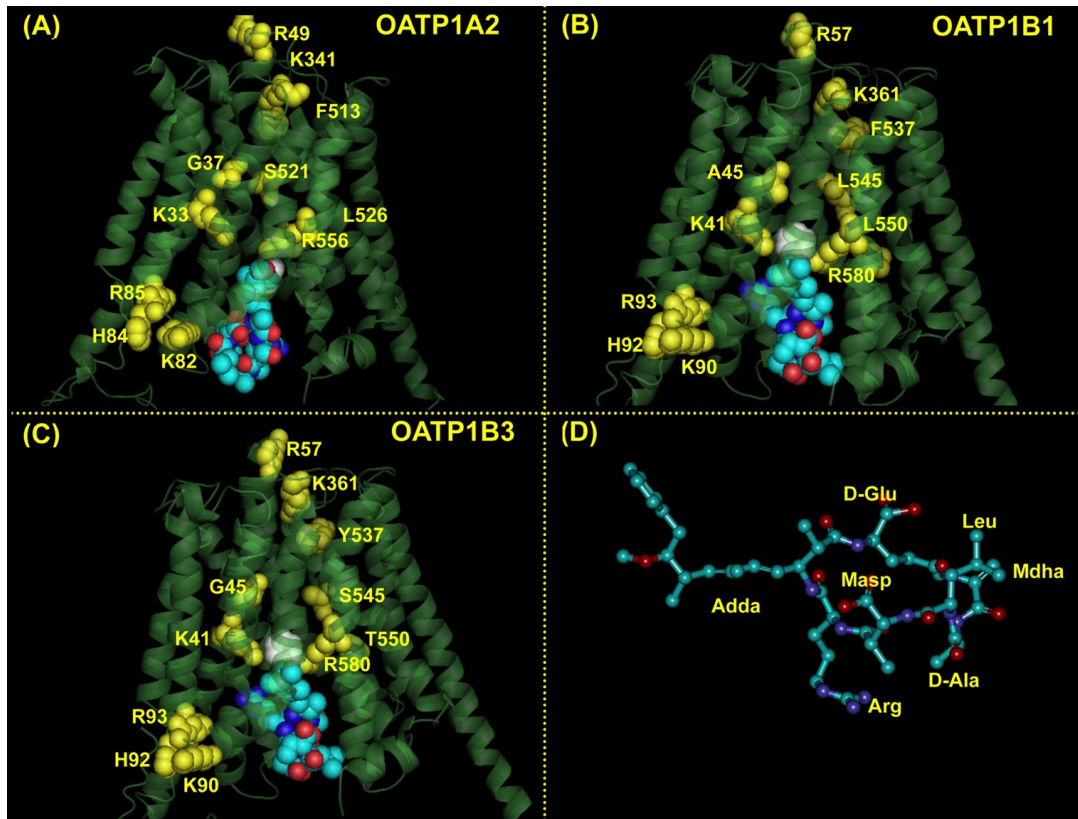


Σχήμα 31 Απεικόνιση πρωτεϊνικής έκφρασης του OATP1B3 με τη μέθοδο Western Blot και τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος p1B3 πριν και μετά την απογλυκοζυλίωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με το ένζυμο N-glycosidase. Τα πρόσημο (-) υποδεικνύει την αρχική μορφή της πρωτεΐνης χωρίς έκθεση στο ένζυμο απογλυκοζυλίωσης, ενώ το πρόσημο (+) καταδεικνύει χρήση της N-glycosidase. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με την έκφραση του OATP1B3 στα διαμολυσμένα κύτταρα CHO-1B3. Ως αρνητικό μοντέλο ελέγχου (-ve control), χρησιμοποιήθηκε η CHO-WT κυτταρική σειρά.

13. Μοντέλα Δομής και Πρόσδεσης

Τα 3D μοντέλα των OATP- 1A2, -1B1 και -1B3 παρουσιάζονται στο σχήμα 32. Η παράλληλη προβολή της πεπτιδικής αλληλουχίας των τριών OATP παρουσιάζεται στο σχήμα 33, επισημαίνει τα αμινοξέα που έχουν προσδιοριστεί ως σημαντικά στο μηχανισμό πρόσδεσης διακομιστή/υποστρώματος.

Με βάση την ακολουθία διατήρησης των αμινοξέων όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ένα πιθανό κοινό σημείο πρόσδεσης των υποστρωμάτων με τους μελετούμενους OATPs απεικονίζεται στα τρισδιάστατα (3D) μοντέλα των 3 διακομιστών στο σχήμα 32. Τα κατάλοιπα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη χαρτογράφηση της περιοχής πρόσδεσης της MC-LR με τους OATP- 1A2, 1B1 και 1B3. Από τους *in silico* υπολογισμούς έγινε εμφανές ότι το κατάλοιπο Adda μαζί με την Arg στο μόριο της microcystin-LR παρουσιάζονται αμφότερα να είναι προσανατολισμένα στην διαμεμβρανικές περιοχή των διακομιστών ευνοώντας έτσι τη λιπόφιλη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ υποστρώματος και διακομιστή.



Σχήμα 32 Τρισδιάστατα (3D) μοντέλα πρόσδεσης των (Α) OATP1A2-MC-LR, (Β) OATP1B1-MC-LR και (Γ) OATP1B3-MC-LR. Η δομή των διακομιστών εμφανίζονται σε μορφή ribbons (κορδέλας). Τα κατάλοιπα που έχουν επισημανθεί από βιβλιογραφικές αναφορές ως σημαντικά για την πρόσδεση υποστρώματος-διακομιστή (βλ. κείμενο) επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα. (D) τρισδιάστατη δομή της MC-LR, όπως ανακτήθηκε από μελέτες με ακτίνες-X (204). Με ραβδία εμφανίζονται οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων άνθρακα (κυανό χρώμα), τα άτομα οξυγόνου με κόκκινο και αζώτου με μπλε.

```

OATP1A2 -----MGETEKRIETHRIRCLSKLKMFLLAITCAFVSKTILSGSYMNSMLTQIERQFN
OATP1B1 MDQNQHNLNKTAEAQPSSENKKTRYCNGLKMFALAALSLSFIAKTLGAIIMKSSIIHIERRFE
OATP1B3 MDQHQLNKTAESASSEKKTRRCNGFKMFLAALSFSYIAKALGGIIMKISITQIERFD
      *.:. * . :***** *.: :.:*:*.. * : :*****:*

OATP1A2 IPTSLVGFINGSFEIGNLLLIIFVSYFGTKLHRPIMIGIGCVVMGLGCFKLKSLPHFLMNQ
OATP1B1 ISSSLVGFIDGSFEIGNLLVIVFVSYFGSKLHRPKLIGIGCFIMGIGVLTALPHFFMGY
OATP1B3 ISSSLAGLIDGSFEIGNLLVIVFVSYFGSKLHRPKLIGIGCCLMGTGSILTSLPHFFMGY
      *.:**.*:*:*****:*:*****:***** :*****:* * .*:*****:*.

OATP1A2 YEY--ESTVSVSGNLSSNSFLCMENGTQILR---PTQDPSECTKEVKSLMWVYVLVGNIV
OATP1B1 YRSKETNINSSSENSTSLTSTCLINQILSLNRASPEIVGKGCCLKESGSYMWIYVFMGNML
OATP1B3 YRSKETHINPSENSTSSLSLSTCLINQTLFNGTSP EIVEKDCVKESGSHMWIYVFMGNML
      *.* * : . * * :*. * : * :. * . * ** * **:*:*****:*.

OATP1A2 RGMGETPILPLGISYIEDFAKFENSPLYIGLVETGAIIGPLIGLLASFCANVYVDTGFV
OATP1B1 RGIGETPIVPLGLSYIDDFAKEGHSSLYLGILNAIAMIGPIIGFTLGSLSFKMYVDIGYV
OATP1B3 RGIGETPIVPLGISYIDDFAKEGHSSLYLGSLSNAIGMIGPVI GFALGSLFAKMYVDIGYV
      **:*:*****:*:***:***:*** *.*:** * :. :*****:** *.* : :***** *:*

OATP1A2 NTDDLIIPTDTRVWGAWWFGFLICAGVNVLTAIPFFFLPNTLPKE---GLETNADI IK
OATP1B1 DLSTIRITPTDSRWVGAWWLNFLVSGLFSIISSIPFFFLPQTPNKPQKERRKASLSLHVLE
OATP1B3 DLSTIRITPKDSRWVGAWWLGFLVSGLFSIISSIPFFFLPKNPNKPQKERRKISLSLHVLE
      : . : ***.*:*****:*:***.. .:*****:.. * . . .:

OATP1A2 NENEDKQKEEVKKEKYGITKDFLPMKSL---CNPIYMLFILVSVIQFNAFVNMISSFMP
OATP1B1 TNDEKDQANLTNQGKNTKNTVGFQSFKSILTNPYVMFVLLTLLQVSSYIGAFYTF
OATP1B3 TNDDRNTANLTNQGKNTKNTVGFQSLKSILTNPYVIFLLLTLLQVSSFIGSFTYVF
      .: . * . : : . : * :. * : * :. * : * : * : * : * : * : * : * : . : . :

OATP1A2 KYLEQQYGISSDAIFLMGIYNLPPICIGYIIGGLIMKKFKITVKQAAHIGCWLSSLLEYL
OATP1B1 KYVEQQYGOQSSKANILLGVITIPIFASGMFLGGYI IKKFKLNTVGIKAFSCFTAVMSLS
OATP1B3 KYMEQQYGOQSSASHANFLGIIITIPVATGMFLGGFI IKKFKLSLVGIKAFSFLTSMISFL
      **:*:***** .:*.* *:*: .:* .. * :** *:*****:.. * :. . :.

OATP1A2 LYFLSFLMTCENSSVVGINTSYEGIPQDLYVENDIFADCNVDCNCPSKIWDPVCGNGLS
OATP1B1 FYLLYFFILCENKSVAGLTMTYDGNNPVTSHRDVPLSYCNSDCNDESQWEPVCGNNGIT
OATP1B3 FQLLYFPPLICESKSVAGLTMTYDGNNVSHVDVPLSYCNSECNDESQWEPVCGNNGIT
      : * * : * . * . * . : * * : * : * : * * * * * * : * : * : * : * : * :

OATP1A2 YLSACLAGCETSIGTGINMVFNQNCSCIQTSGNS---SAVLGLCDKGPDCSMLQYLIL
OATP1B1 YISPLAGCKSSSGNKPIVFNCSLEVTGLQNRNYS AHLGECPRDDACTRKFFYFVAI
OATP1B3 YLSPCLAGCKSSSGIKKHTVFYNCSCVEVTGLQNRNYS AHLGECPRDNTCTRKFFIYVAI
      *:*.*:*****:* * ** *:*****:.* * ** * * . * : : :.

OATP1A2 SAMSSFIYSAAIPGYMVLLRCMKSEKSLGVGLHTFCTRVFAGIPAPIYFGALMDSTCL
OATP1B1 QVLNFFSALGGTSHVMLIVKIVQPELKSALGFHSMVIRALGGILAPIYFGALIDTTCI
OATP1B3 QVINSLFSALGGTTFILLTVKIVQPELKALAMGFQSMVIRTLGGILAPIYFGALIDKTCM
      .. . : : . . : : : * *:*:*: * :. * * * * * : * : * : * : * : * :

OATP1A2 HWGTLKCGESGACRIYDSTTFRYIYLGPAALRGSSFPALIIILLRKCHLPGENASSG
OATP1B1 KWSTNCGTRGSCRTYNSTSFSRVYLGSSMLRVSSLVLYIILIYAMKKKYQEKDINASE
OATP1B3 KWSTNSCGAQGACRIYNSVFFGRVYLGSLIALRFPALVLYIVFIFAMKKKFGKDTKASD
      :.*.* ** *:* *:* * * :*****. ** :.* * : : * : * : * : * :

OATP1A2 TELIETKVKGKENECKDIYQKSTVLEKDELKTKL-----
OATP1B1 NG-SVMDEANLES LNKNKHVPSAGADSETHC-----
OATP1B3 NERKVMDEANLEFLNNGEHFVPSAGTDSKTCNLDMDNAAAAN
      . . . * :. : . . * :.

```

Σχήμα 33 Παράλληλη στοίχιση ακολουθιών των OATP1A2, OATP1B1 και OATP1B3. Επισημαίνονται τα κατάλοιπα που χαρακτηρίζονται ως σημαντικά στη βιβλιογραφία (βλ. κείμενο) στον τομείς δομής, δέσμευσης και λειτουργικότητας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έλλειψη αποτελεσματικών θεραπειών κατά των περισσότερων τύπων μεταστατικού καρκίνου και του καρκίνου του παγκρέατος ειδικότερα καταδεικνύουν την επείγουσα ανάγκη για αναγνώριση νέων μοριακών στόχων και ανακάλυψη αλλά και ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών.

Για την μελέτη της αντικαρκινικής δραστηριότητας των μικροκυστινών επιλέχθηκε το μοντέλο του παγκρεατικού καρκίνου λόγω της ουσιαστικά παντελούς έλλειψης διαθέσιμων θεραπευτικών μορίων για αυτό το είδος καρκίνου. Η ανάγκη αυτή φαίνεται ξεκάθαρα και απο το γεγονός ότι απο σύνολο 36 υποψηφίων ενώσεων για ανάπτυξη νέων φαρμάκων γι' αυτή την πάθηση, κανένα δεν έλαβε τη σχετική άδεια απο το FDA (Food and Drug Administration) των ΗΠΑ, για εμπορική χρήση τα τελευταία 25 χρόνια. (280)

Η έκφραση των πολυπεπτιδικών διακομιστών οργανικών ανιόντων σε διάφορους τύπους καρκίνου αλλά και ειδικότερα στον καρκίνο του παγκρέατος, και η μοναδική ικανότητα που τα διακρίνει να διαμεσολαβούν τη πρόσληψη ξενοβιοτικών ουσιών, ορίζει αυτά τα μόρια ως πιθανούς υποψήφιους στόχους για την ανάπτυξη καινοτόμων αντικαρκινικών θεραπευτικών σχημάτων για ανθεκτικούς και επιθετικούς τύπους καρκίνου. (281-284)

Η παρούσα ερευνητική εργασία, εστίασε αφενός στη ανάλυση της έκφρασης των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε διάφορους τύπους καρκίνου σε ανθρώπινο ιστό, και αφετέρου στη μελέτη της προκαλούμενης τοξικότητας απο τη χρήση της MC-LR σε παγκρεατικές καρκινικές σειρές.

Η επιλογή της μελέτης της μικροκυστίνης σε συνάρτηση με την κυτταρική παρουσία διακομιστών οργανικών ανιόντων οφείλεται κυρίως στην κοινή και διακριτή ικανότητα των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 να επιτρέπουν την κυτταρική πρόσληψη της φυσικής αυτής τοξίνης και του δυναμικού που διατηρεί για πρόκληση κυτταροτοξικότητας (285). Θεωρήσαμε επιπλέον ότι η μικροκυστίνη έχει ιδιαίτερο φαρμακολογικό ενδιαφέρον κυρίως λόγω των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, αλλά και των δυνατοτήτων που προσφέρει η δομή της για σχεδιασμό και σύνθεση αναλόγων μορίων με βελτιστοποιημένες ικανότητες για επιπλέον επιλεκτική στόχευση καρκίνων που εκφράζουν τους ειδικούς διακομιστές OATPs (286).

Η μικροκυστίνη-LR προκαλεί εξεσημασμένη κυτταρική βλάβη μέσω ισχυρής αναστολής της πρωτεϊνικών φωσφατασών PP1 και PP2A, αλλά και σοβαρή γονιδιωματοτοξικότητα (genotoxicity) μέσω εξάντλησης των επιπέδων GSH (γλουταθειόνης) και υπερπαραγωγής ROS (ενεργών ριζών οξυγόνου) που τελικά οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση (97). Οι Eriksson και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι που είχαν προτείνει ότι για την πρόσληψη της microcystin-LR απαιτείται ένα ειδικό σύστημα διαμεμβρανικής μεταφοράς (287). Περαιτέρω έρευνα από τους Craig και συνεργάτες, έδειξε ότι οι OATP- 1B1 και 1B3 ευθύνονται για την ηπατική πρόσληψη της MC-LR (205). Πρόσφατα βρέθηκε και ταυτοποιήθηκε, ότι η MC-LR αποτελεί επίσης υπόστρωμα μεταφοράς και για τον OATP1A2 εκτός από τους OATP- 1B1 και 1B3 (58).

Απο τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διδακτορικής έρευνας και άλλες μελέτες, προκύπτουν σαφείς ενδείξεις για ισχυρή έκφραση του OATP1B3 σε καρκινικούς ιστούς. Τα άλλοτε άλλης έντασης επίπεδα έκφρασης του OATP1B1 που παρατηρούνται θα μπορούσαν ενδεχομένως να σχετίζονται με δευτερογενείς κυτταρικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (96).

Έκφραση σε ανθρώπινο ήπαρ

Η επιβεβαίωση της έντονης έκφρασης και κυτταρομεμβρανικής εντόπισης των "liver-specific" OATPs 1B1 και 1B3, σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό και σε συνάρτηση με την αυξημένη ένταση που παρατηρήθηκε στις περι-πυλαίες περιοχές (peri-portal area) του ηπατικού παρεγχύματος, αντικατοπτρίζει τη σημαντικότητα της παρουσίας και τον κεντρικό ρόλο των μορίων αυτών στην απορρόφηση των διάφορων ορμονών, πεπτιδίων και φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα των εν λόγω διακομιστών, συμβάλλοντας στο μεταβολισμό των ουσιών αυτών (97, 129).

Έκφραση σε αδenoκαρκίνωμα του παγκρέατος και παχέος εντέρου

Τα πολυπεπίδια μεταφοράς οργανικών ανιόντων που μελετήθηκαν για τους σκοπούς αυτής της εργασίας, OATP1A2, 1B1 και 1B3, βρέθηκαν να εκφράζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε ιστικά δείγματα παγκρεατικού καρκίνου.

Η ποσοτική ανάλυση με αυτοματοποιημένες μεθόδους, έδειξε ενισχυμένη παρουσία του 1B1/1B3 σε σύγκριση με τους 1A2 και 1B1, γεγονός που καταδεικνύει υπερ-έκφραση του 1B3 σε αυτούς τους όγκους.

Αντίθετα, ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός των διακομιστών σε σειρά δειγμάτων αδenoκαρκινώματος του παχέος εντέρου, αποκάλυψε διαφορετικό προφίλ έκφρασης, με τον 1A2 να παρουσιάζει την ισχυρότερη ένταση απο τους τρεις, (288) γεγονός που είναι ενδεικτικό της διαφορετικότητας που εμφανίζει κάθε τύπος καρκίνου ως προς την έκφραση των διακομιστών οργανικών ανιόντων.

Αδυναμία εντόπισης καρβοξυτελικού άκρου

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, έχει η παρατήρηση της αδυναμίας ανίχνευσης του καρβόξυτελικού (C-terminal) άκρου με τοπολυκλωνικό p1B3 αντίσωμα σε αντίθεση με το έντονο σήμα που δίνει η χρήση του mMDQ αντίσωματος, το οποίο ανιχνεύει το αμινοτελικό (N-terminal) άκρο του OATP1B3 σε όλες τις περιπτώσεις αδenoκαρκινώματος του παγκρέατος που μελετήθηκαν.

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών έχουμε και στη σειρά ανοσοϊστοχημικής μελέτης του OATP1B3 σε δείγματα καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, όπου παρατηρήθηκε έντονη και σαφής ανίχνευση του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης με το mMDQ αντίσωμα και η αδυναμία εντόπισης του C-τελικού άκρου με το p1B3 (288). Υποθέτουμε ότι η μη-ανίχνευση του επιτόπου, οφείλεται πιθανά σε κάποια μετάλλαξη στη δομή του OATP1B3 η οποία πιθανώς εμποδίζει την πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος.

Επιλεκτικό screening έκφρασης των OATP1B1 και OATP1B3

Η περαιτέρω ενδεικτική μελέτη ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των διακομιστών οργανικών ανιόντων OATPs σε μια σειρά διαφόρων τύπων καρκίνου επιθηλιακής

προέλευσης, όπως ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, το πορογενές αδενοκαρκίνωμα του μαστού, το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου και το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, ανέδειξε και επιβεβαίωσε την καθολική και ισχυρή σε ένταση έκφραση του OATP1B3 σε αντίθεση με τον OATP1B1, γεγονός που πιθανά αντικατοπτρίζει τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει ο συγκεκριμένος διακομιστής στη φυσιολογία και ανάπτυξη των νεόπλαστων καρκινικών κυττάρων (289).

Χρονοεξαρτώμενη έκφραση του OATP1B3 σε κυτταρικές καλλιέργειες

Την υπόθεση αυτή ενισχύει η παρατήρηση που προκύπτει από τη μελέτη της μεταβολής της έκφρασης του OATP1B3 σε επίπεδο mRNA, σε εξάρτηση με το χρόνο της *in vitro* καλλιέργειας καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η ημιτονοειδής αυξομείωση της έκφρασης του OATP1B3 με τα μέγιστα επίπεδα να καταγράφονται χρονικά μέσα στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης για την κάθε κυτταρική σειρά, εισηγείται τον κεντρικό ρόλο που πιθανά διαδραματίζει η παρουσία αυτής της αντλίας πρόσληψης στις μεταβολικές διαδικασίες αλλά και στη συνολική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η χαρακτηριστική μείωση της ικανότητας μεταφοράς και πρόσληψης των διακομιστών οργανικών ανιόντων 1B1 και 1B3 που έχει παρατηρηθεί και αποτυπωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων, συσχετίστηκε με τη δυναμική μείωση των επιπέδων έκφρασης που φάνηκε να επισυμβαίνει κατά τις πρώτες 24 ώρες από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας (290).

Απόλυτη ενδογενής έκφραση (mRNA) των OATPs σε κυτταρικές σειρές

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, και μετά από μελέτη του προφίλ φυσιολογικής ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών, γνωστής αρχικής πυκνότητας κυττάρων, καθορίστηκε το χρονικό σημείο των 48 ωρών ως το καταλληλότερο για την έκθεση και μελέτη της επίδρασης της μικροκυστίνης στις κυτταρικές σειρές. Η επιβεβαιωμένη ενδογενής έκφραση σε επίπεδο mRNA των 1B1 και 1B3 διακομιστών οργανικών ανιόντων στις κυτταρικές σειρές MIA PaCa2 και BxPC-3, τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή κατέστησε αυτά τα κυτταρικά μοντέλα ως κατάλληλα για *in vitro* μελέτη της σημασίας των OATPs σε σχέση με την δράση μικροκυστινών.

Επιγενετικοί χειρισμοί και έλεγχος της σχέσης έκφρασης των OATPs με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA

Η προσπάθεια επιπλέον ανάλυσης και προσπέλασης της παρατήρησης περί μεταβολής της έκφρασης του OATP1B3 στο χρόνο, ερευνήθηκε η υπόθεση συσχέτισης της σταδιακής μείωσης των επιπέδων έκφρασης, να οφείλονται δευτερογενώς (εν μέρη τουλάχιστον) σε επιγενετικές μεταβολές και συγκεκριμένα σε μεθυλίωση του DNA-εκκινήτη (DNA promoter) του γονιδίου *SLCO1B3*. Η επιλεκτική αποσιώπηση της έκφρασης του 1B3 σε ορισμένες κυτταρικές σειρές (συμπεριλαμβανομένης και της HepG2) λόγω υπερ-μεθυλίωσης του εκκινήτη του DNA έχει καταγραφεί και δημοσιευθεί από διάφορους ερευνητές (96, 291).

Στα πλαίσια της διερεύνησης της δράσης του υπομεθυλιωτικού παράγοντα 5-azacytidine, η πειραματική προσέγγιση χωρίστηκε σε δύο σκέλη, α) στη διερεύνηση της επίδρασης της 5-azacytidine στην έκφραση του OATP1B3, 72 ώρες μετά από

μονήρη έκθεση και β) τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μετά απο καθημερινή ανανέωση της ουσίας για 72 ώρες. Ο σχεδιασμός έγινε λαμβάνοντας υπ' όψιν τον χρόνο ημίσειας ζωής της AZA σε περιβάλλον καλλιέργειας και εξομοιώνοντας κατα το δυνατόν τις *in vivo* συνθήκες (292) με απώτερο στόχο να επιτραπεί στα κύτταρα να εισέλθουν σε διαδικασία μίτωσης για όσο το δυνατόν περισσότερο χρόνο παρουσία της ενεργού μορφής της 5-AZA, ώστε να αυξηθεί τελικά η συγκέντρωση νεοσυντιθέμενου DNA ελεύθερου μεθυλίωσης (293). Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια καινοτόμο βελτιωμένη προσέγγιση *in vitro* απομεθυλίωσης.

Παρατηρήθηκε ότι έκθεση των παγκρεατικών σειρών στον παράγοντα 5-azacytidine (μονήρης έκθεση ή καθημερινή ανανέωση της ουσίας) δεν ήταν αρκετή για να δώσει αξιοσημείωτες μεταβολές (αύξηση) στην έκφραση του OATP1B3. Αντίθετα η καθημερινή εφαρμογή της υψηλότερης συγκέντρωσης 5-azacytidine (10μM), στην κυτταρική σειρά του καλά διαφοροποιημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ανθρώπου, HepG2, κατέστησε δυνατή την ενίσχυση της έκφρασης του 1B3 σε επίπεδο mRNA κατά περίπου 11- φορές. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν αφενός την μεθυλίωση του εκκινήτη του DNA στα HepG2 κύτταρα και απουσία ρύθμισης της έκφρασης του 1B3 μέσω μεθυλίωσης στις καρκινικές παγκρεατικές σειρές και αφετέρου την ύπαρξη διαφορετικών επιγενετικών μηχανισμών μεθυλίωσης ανάμεσα στα τρία κυτταρικά μοντέλα.

Μελετούμενη με τη μέθοδο xCELLigence η δράση του παράγοντα 5-azacytidine, και δη η συγκέντρωση 10μM για την οποία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του 1B3 για τα HepG2 κύτταρα, έδειξε σημαντική κυτταροστατική επίδραση, γεγονός που την καθιστά ακατάλληλη για συνδυασμένη χρήση με τη μικροκυστίνη και τη μελέτη της επίδρασης της τελευταίας στην αναπτυξιακή συμπεριφορά και βιωσιμότητα των κυττάρων.

Μελέτη της τοξικής επίδρασης της MC-LR

Συνολικά τα πειραματικά δεδομένα μελέτης της τοξικότητας της MC-LR επι κυτταρικών μοντέλων σε καλλιέργεια *in vitro*, με τις μεθόδους xCELLigence και με κυτταρομετρία ροής (Annexin-V/PI), όπως περιγράφηκαν στην αντίστοιχη ενότητα των αποτελεσμάτων, δείχνουν έναν ουσιαστικό ρόλο της έκφρασης των διακομιστών OATP1B3 στη τελική διαδικασία πρόκλησης κυτταροτοξικότητας απο την μικροκυστίνη-LR, κατά τρόπο α) δόσοεξαρτώμενο και β) ανάλογο της έκφρασης των OATP1B1 και OATP1B3 στον καρκίνο του παγκρέατος αλλά και στις CHO-διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές ελέγχου.

Το ασθενέστερο συγκριτικά αποτέλεσμα της δράσης της τοξίνης στα MIA PaCa2 κύτταρα, τα οποία παρουσίασαν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης 1B3, ενισχύουν την υπόθεση για συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση έκφρασης του διακομιστή και της ευαισθησίας των κυτταρικών μοντέλων στην μικροκυστίνη.

Η άμεση σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης (IC50) της μικροκυστίνης-LR σε σχέση με αυτή της gemcitabine η οποία αποτελεί την εγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή πρώτης γραμμής για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος, ανέδειξε αξιοπρόσεχτο πλεονέκτημα της πρώτης για την καρκινική κυτταρική σειρά BxPC-3.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα συνδυαστικά πειράματα τοξικότητας με τους δύο παράγοντες (ονομαστικά: μικροκυστίνη-LR και gemcitabine) αποδείχθηκαν να υπερισχύουν εκείνων όπου οι μικροκυστίνη και gemcitabine χρησιμοποιήθηκαν ως μοναδικοί παράγοντες έκθεσης.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η gemcitabine, λειτουργεί κυρίως αναστέλλοντας και προκαλώντας στασιμότητα στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, σε αντίθεση με την κυτταροτοξική και μη-αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη που όπως φάνηκε προκαλεί η μικροκυστίνη-LR.

Κυτταροπροστατευτική δράση της N-acetylcystein

Τον τρίτο άξονα, μετά την επιβεβαίωση της έκφρασης των διακομιστών οργανικών ανιόντων σε ανθρώπινους καρκίνους και της σαφούς τοξικής δράσης της μικροκυστίνης σε κύτταρα που εκφράζουν τους OATP1A2, OATP1B1 και OATP1B3, αποτέλεσε η προσπάθεια μεταβολής και ρύθμισης της τοξικής επίδρασης της MC-LR κατά τρόπο με τον οποίο να διαφάλλιζεται η βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζεται η τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αντιοξειδωτικός παράγοντας N-acetylcysteine, ο οποίος διατηρεί τη ξεχωριστή ιδιότητα για *de novo* σύνθεση, γλουταθειόνης (GSH) στα φυσιολογικά κύτταρα, χωρίς όμως να συμβαίνει το ίδιο και για τα καρκινικά κύτταρα (240-242). Τα μόρια της ενδοκυττάριας GSH έχουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (294) και ειδικότερα μέσω της απομάκρυνση των παραγομένων από μικροκυστίνη ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (243, 244), τα οποία ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την εξεσημασμένη γονιδιωματοξικότητα (genotoxicity) που παρατηρείται (295, 296).

Η δράση της N-acetylcystein εκτιμήθηκε με βάση τις μεταβολές των συγκεντρώσεων IC50 αλλά και της συνολικής κλίσης των καμπυλών ανάπτυξης, που παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν μετά από την έκθεση σε μικροκυστίνη-LR ± NAC των CHO-1B1 και CHO-1B3 διαμολυσμένων κυττάρων.

Η μελέτη και σύγκριση της μορφολογίας αλλά και της κλίσης των καμπυλών ανάπτυξης για τις δύο διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές εκτεθειμένες σε 10μM μικροκυστίνης, δείχνουν αφενώς διαφορά στην κινητική εισόδου της τοξίνης με τον OATP1B3 να υπερέχει του OATP1B1 και αφετέρου μειωμένο ρυθμό πρόκλησης κυτταροτοξικότητας στα CHO-1B1 σε σχέση με τα CHO-1B3 κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση του ρυθμού πρόκλησης τοξικότητας από τη χρήση της μικροκυστίνης-LR και της ικανότητας πρόσληψης και μεταφοράς του υποστρώματος από τον κάθε διακομιστή.

Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε μείωση του ρυθμού πρόκλησης τοξικότητας με την προσθήκη της NAC στο σχήμα έκθεσης. Η κυτταροπροστατευτική ικανότητα που παρατηρήθηκε, ήταν σαφώς μεγαλύτερη όταν η εφαρμογή της, προηγείτο χρονικά εκείνη της μικροκυστίνης στα καλλιεργούμενα κύτταρα. Σημειώνεται δε ότι οι αντίστοιχες IC50 συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν στις 24 ώρες από την έκθεση των κυτταροκαλλιεργειών, λαμβάνοντας υπ' όψιν το χρόνο ημίσειας ζωής του μορίου της NAC (297).

Εξαιρετικής σημασίας αποτελεί η παρατήρηση ότι η επίδραση της NAC σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα που εκτέθηκαν αρχικά σε μικροκυστίνη-LR δεν υπήρξε η ίδια με αυτή στα διαμολυσμένα CHO- κύτταρα. Συγκεκριμένα η N-acetylcysteine δεν προκάλεσε οποιαδήποτε μεταβολή στο ρυθμό πρόκλησης τοξικότητας από την MC-LR.

Συνολικά τα δεδομένα ενισχύουν και επιβεβαιώνουν εν μέρει την υπόθεση που θέλει τη NAC να διατηρεί τον κυτταροπροστατευτικό της ρόλο μέσω παραγωγής GSH στα CHO- διαμολυσμένα κύτταρα που εκπροσωπούν το «φυσιολογικό» κυτταρικό μοντέλο αυτής της μελέτης, έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Προφίλ έκφρασης OATPs ασθενούς με διεγνωσμένο πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα του εντέρου – Μελέτη απογλυκοζυλίωσης

Η απόλυτη έκφραση σε επίπεδο mRNA των διακομιστών OATP1A2, 1B1 και 1B3 σε φυσιολογικό ηπατικό ιστό ασθενούς με διεγνωσμένο πρωτοπαθές αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου επιβεβαίωσε τα αναμενόμενα υψηλά επίπεδα για τους 1B1 και 1B3. Εξαιρετικού ενδιαφέροντος, αποτελεί όμως η σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης τους και ιδιαίτερα αυτή του OATP1B3 στην εστία ηπατικής μετάστασης.

Η επιπλέον ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης του OATP1B3 σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα ιστού του ίδιου ασθενούς (ονομαστικά: φυσιολογικό ήπαρ, μεταστατική ηπατική εστία, φυσιολογικό έντερο και εστία πρωτοπαθούς αδενοκαρκινώματος του εντέρου), επιβεβαιώνει την ενισχυμένη έκφραση που παρατηρήθηκε σε επίπεδο mRNA στην μεταστατική εστία έναντι αυτής στο φυσιολογικό ήπαρ και αποκαλύπτει την παρουσία πρωτεϊνικής δομής διαφορετικού μοριακού μεγέθους η οποία εκφράζεται κυρίως στο έντερο και λιγότερο στο ήπαρ.

Οι ενδείξεις για υπερέκφραση του OATP1B3 στη μεταστατική εστία συνυπολογιζόμενες με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπως παρουσιάστηκαν ανωτέρω, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην υπόθεση ότι η αυξημένη έκφραση που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι διακομιστές στη μεταστατική εστία θα μπορούσαν να αποτελέσουν την αιτία μιας θεωρητικά ενισχυμένης ευαισθησίας των μεταστατικών κυττάρων σε έκθεση σε μικροκυστίνη.

Περαιτέρω προσπάθεια για ανάλυση της μορφής του ανιχνευόμενου OATP1B3 μορίου, έγινε με τη μελέτη του επιπέδου γλυκοζυλίωσης για κάθε περίπτωση ιστού. Τα αποτελέσματα, επιβεβαιώνουν την παρουσία της αναμενόμενης γλυκοζυλιωμένης μορφής του 1B3 (120kDa) στο ήπαρ (298) και την πλήρη απουσία της στο έντερο. Το δεύτερο προϊόν μοριακού βάρους περίπου 78kDa που εντοπίζεται και φαίνεται να εκφράζεται τόσο στο ήπαρ όσο και στο έντερο, αλλά όχι στα CHO-1B3 κύτταρα ελέγχου (+ve control group) αποτελεί πιθανά είτε κάποια φαινοτυπική ισομορφή του 1B3 είτε κάποια μετα-μεταφραστική (post-translational modification) παραλλαγή της αρχικής μορφής άμεσα σχετιζόμενη και χαρακτηριστική της πρωτοπαθούς νόσου. Η διαφορετική μορφή και επίπεδο γλυκοζυλίωσης του διακομιστή OATP1B3 είναι πιθανόν να επηρεάζει τελικώς την λειτουργικότητα και την ικανότητα πρόσληψης των διαφόρων υποστρωμάτων (299) με αποτέλεσμα τη διαταραχή της αναμενόμενης δράσης τους στη βιολογία του κυττάρου.

Θεωρούμε ότι το επίπεδο γλυκοζυλίωσης των διακομιστών θα πρέπει να αποτελεί πεδίο ιδιαίτερης μελέτης στα πλαίσια της ευρύτερης θεώρησης των διακομιστών ως βιοδεικτών είτε στο πλαίσιο της πρόγνωσης, της απάντησης στα διάφορα εξαρτώμενα από τους διακομιστές σχήματα θεραπείας, είτε για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών.

In silico σχεδιασμός μοντέλων δομής και πρόσδεσης

Με δεδομένη την απουσία επί του παρόντος διαθέσιμου μοντέλου δομής ακτίνων-Χ για οποιοδήποτε από τα τρία μελετούμενα μόρια OATPs, προχωρήσαμε σε *in silico* μοντελοποίηση των εν λόγω διακομιστών αξιοποιώντας κατάλληλα δομικά πρότυπα (βλ. υλικά και μεθοδολογία). Βάσει μελετών μεταλλαξιογένεσης (mutagenesis) και συναφών αναλύσεων έχουν ληφθεί υπόψη κατάλοιπα που θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικά στοιχεία στα σημεία πρόσδεσης και συσχετισμών των διακομιστών με τα διάφορα υποστρώματα. Για παράδειγμα για τα αμινοξέα, Y537, S545 και T550 που βρίσκονται στη διαμεμβρανική περιοχή TM10 του OATP1B3 έχει βρεθεί ότι η παρουσία τους είναι σημαντική για την πρόσληψη του μορίου cholecystokinin octapeptide (οκταπεπτίδιο της χολοκυστοκινίνης) (300). Επιπλέον, είχε αποδειχθεί ότι τα καλά συντηρημένα (highly preserved) θετικά φορτισμένα αμινοξέα Lys41 και Arg580 είναι εξέχουσας σημασίας για τη δομή και τη λειτουργικότητα του διακομιστή OATP1B3 (301). Για τον OATP1B1 είχε αναφερθεί ότι η L545, A45 και T615 είναι δυνατόν να εμπλέκονται στο μηχανισμό αλληλεπίδρασης υποστρώματος-διακομιστή (302, 303). Σε μια άλλη μελέτη τα συντηρημένα (preserved) αμινοξέα R57 και K361 στον εξωκυττάριο χώρο, τα R181 (TM4) και R580 (TM11) των αντίστοιχων διαμεμβρανικών περιοχών, και τα ενδοκυττάρια K90, H92 και R93 αποτελούν σημαντικές δομικές μονάδες για την OATP1B1-διαμεσολαβούμενη μεταφορά πρότυπων υποστρωμάτων (304). Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι το γεγονός ότι παρά την μεγάλη ομολογία που παρουσιάζει ο OATP1B1 με τον OATP1B3, ο πρώτος δείχνει μεγαλύτερα ποσοστά διατηρημένων περιοχών για ορισμένα από τα προαναφερθέντα αμινοξέα, σημαντικά στο μηχανισμό πρόσδεσης και πρόσληψης υποστρωμάτων, κοινά με τον διακομιστή OATP1A2. Για παράδειγμα, η Y537 του OATP1B3 φαίνεται να αλλάζει σε F537 στον OATP1B1 και F513 στον OATP1A2 ενώ η S545 του OATP1B3 αλλάζει σε L545 στον OATP1B1 και σε L526 στον OATP1A2.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι κυανοτοξίνες, όντας μια πλούσια πηγή φυσικών βιοδραστικών παραγόντων με ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, παρουσιάζονται ως ιδανικοί υποψήφιοι για φαρμακολογική ανάπτυξη καινοτόμων αντικαρκινικών φαρμάκων. Επιπλέον, η στερεοχημική τους δομή, προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για συνδυαστική ανασύνθεση με στόχο την διεύρυνση του θεραπευτικού δείκτη και την επίλυση ζητημάτων τοξικότητας σε φυσιολογικά όργανα-ιστούς. Θεωρώντας τις κυανοτοξίνες ως πιθανά μόρια για ανάπτυξη καινοτόμων αντικαρκινικών θεραπευτικών ενώσεων, εστίασαμε στην μελέτη της τοξικής επίδρασης της μικροκυστίνης σε κυτταρικά μοντέλα *in vitro*.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιβεβαίωσαμε την έκφραση των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε ανθρώπινο ιστό φυσιολογικού ήπατος και την έντονη έκφραση του OATP1B3 σε σειρά από διαφορετικού τύπου καρκίνους σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Στη συνέχεια, εστίασαμε κυρίως στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, όπου δείξαμε για πρώτη φορά την υπερέκφραση του OATP1B3 σε επίπεδο πρωτεΐνης (129) και την απουσία – με βάση τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα – του καρβοξυτελικού άκρου του OATP1B3 στα υπο μελέτην δείγματα αδενοκαρκινώματος του εντέρου (n=30) και παγκρέατος (n=12).

Επιπλέον, ο OATP1B3 φάνηκε να παρουσιάζει μια σαφή χρονοεξαρτώμενη έκφραση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές σε επίπεδο γονιδίου κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας, γεγονός που αποτελεί επίσης μοναδική παρατήρηση στο είδος της.

Επιβεβαίωσαμε την έκφραση του OATP1B3 στις παγκρεατικές καρκινικές σειρές MIA-PaCa2 και Bx-PC3 με τη δεύτερη να υπερέχει σαφώς της πρώτης ως προς την έκφραση, όπως επίσης και τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην κυτταρική σειρά Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2.

Χειρισμοί με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα 5-Azacytidine, έδειξε έμμεσα, ότι το επίπεδο έκφρασης του OATP1B3, ρυθμίζεται πιθανά μέσω μεθυλίωσης του DNA στο μοντέλο του ανθρώπινου ήπατος (HepG2) αλλά όχι στις παγκρεατικές κυτταρικές σειρές.

Το δυναμικό πρόκλησης κυτταρικής τοξικότητας της μικροκυστίνης-LR φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα έκφρασης του OATP1B3 και επιπλέον δείξαμε για πρώτη φορά την τοξικότητα της μικροκυστίνης σε κυτταρικό μοντέλο παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Bx-PC3). Στο συγκεκριμένο μάλιστα κυτταρικό μοντέλο η μικροκυστίνη αποδείχθηκε πιο δραστική από την gemcitabine που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παγκρέατος.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της N-acetylcysteine (NAC) ως κυτταροπροστατευτικό μόριο, επιβεβαίωσαν τις αρχικές μας υποθέσεις ελαττώνοντας σημαντικά το κυτταροτοξικό δυναμικό της μικροκυστίνης σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές εν αντιθέση με τα καρκινικά κυτταρικά μοντέλα *in vitro*.

Παρά τις πολλαπλές προσπάθειες μας για σύζευξη της μικροκυστίνης-LR (MC-LR) με τη NAC, δεν κατέστη δυνατόν να σχηματισθεί σταθερό MC-LR/NAC μόριο.

Τα αποτελέσματα μας συνοπτικά καταδεικνύουν ότι η μικροκυστίνη-LR μπορεί να θεωρηθεί ως ένα κατάλληλο μόριο, στη βάση του οποίου μπορούν να αναπτυχθούν επιτυχώς νέες αντικαρκινικές θεραπείες για κακοήθεις νεοπλασίες που συγκεκριμένα εκφράζουν τους διακομιστές οργανικών ανιόντων και οι οποίες ανθίστανται στα συμβατικά χημειοθεραπευτικά σχήματα. Η απουσία αποτελεσματικής θεραπείας για τον παγκρεατικό καρκίνο, καθιστά την προσπάθεια για ανακάλυψη καινοτόμων στοχευμένων θεραπειών σε αυτό τον τύπο καρκίνου ως πρωτεύουσας σημασίας στο πεδίο της έρευνας καινοτόμων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Σημαντική για την πορεία ανάπτυξης νέων υποψηφίων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, είναι η συνέχιση της προσπάθειας για σύζευξη του κυτταροπροστατευτικού μορίου NAC με τη μικροκυστίνη LR με σκοπό την προστασία των φυσιολογικών έναντι των καρκινικών κυττάρων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο:

Τα κυκλοπεπτιδικά μόρια που συντίθενται από τα κυανοβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των μικροκυστών και των νοντουλαρινών, θεωρούνται επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία λόγω των πιθανών τοξικών επιδράσεων μετά από μεγάλη κατανάλωση ή μακροχρόνια έκθεση. Ωστόσο, οι μικροκυστίνες λόγω φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της δυνατότητας να προκαλούν κυτταρική βλάβη μετά από πρόσληψη μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών διακομιστών των Πολυπεπτιδίων Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων (OATPs), παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από φαρμακολογικής πλευράς. Κυριότερες ενδοκυττάρειες δράσεις τους είναι η αναστολή των καταλυτικών υπομονάδων των Πρωτεϊνικών Φωσφατασών 1 (PP1) και 2A (PP2A), η μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) και η αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Στην βάση αυτή μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή ως δυνητικά νέα αντικαρκινικά μόρια με στόχευση καρκίνους που εκφράζουν OATPs

Μέθοδοι:

Για τη μελέτη έκφρασης των Πολυπεπτιδίων Μεταφοράς Οργανικών Ανιόντων χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα p1A2 και p1B3 καθώς και τα μονοκλωνικά mESL και mMDQ με τις μεθόδους (α) της ανοσοϊστοχημείας για ανθρώπινο ιστό εγκλείσμένο σε παραφίνη και (β) Western Blot αποτύπωσης για ανθρώπινο φρέσκο κατεψυγμένο ιστό και κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν οι χαρακτηρισμένες καρκινικές και φυσιολογικές σειρές: MIA PaCa-2, Bx-PC3, MRC-5, HepG2, CaCo-2, CHO (1B1, 1B3 επιμολυσμένα) καθώς και πρωτογενείς ανθρώπινες κυτταρικές καλλιέργειες από περιφερικά μονοκύτταρα αίματος. Η μελέτη έκφρασης των διακομιστών σε επίπεδο mRNA έγινε με real time PCR. Ο έλεγχος της τοξικότητας της μικροκυστίνης σε κυτταρικά μοντέλα *in vitro* έγινε με το σύστημα xCELLigence (σε πραγματικό χρόνο) και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Annexin/PI). Ο *in silico* λογικός σχεδιασμός της δομής των διακομιστών, της μικροκυστίνης και του MC-LR/NAC μορίου και οι ανάλογες αλληλεπιδράσεις έγιναν με το λογισμικό Modeller 9.11. Τα γραφήματα, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων και ο υπολογισμός των τιμών IC50 έγινε με τα λογισμικά GraphPad και xCELLigence αντίστοιχα.

Αποτελέσματα:

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα ερευνητική εργασία, αρχικά επιβεβαιώνουν την έκφραση των διακομιστών OATP σε ανθρώπινο φυσιολογικό ηπατικό ιστό και επιπλέον αποδεικνύουν την έντονη έκφραση του OATP1B3 σε καρκινικούς ιστούς μαστού, πνεύμονα, παγκρέατος, εντέρου και στομάχου αλλά και στις κυτταρικές σειρές BxPC-3 και MIA PaCa-2. Στα εν λόγω κυτταρικά μοντέλα ο OATP1B3 ακολουθεί χρονοεξαρτώμενη έκφραση με το μέγιστο της να εντοπίζεται στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας. Απουσιάζει επιγενετικός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης του 1B3 στις κυτταρικές σειρές BxPC-3 και MIA PaCa-2 αλλά φαίνεται ότι υπάρχει στη κυτταρική σειρά HepG2. Οι κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τον OATP1B3, εμφανίζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στη μικροκυστίνη-LR αναλογική με τα επίπεδα έκφρασης του διακομιστή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι η σειρά Bx-PC3 παρουσιάζεται περισσότερο ευαίσθητη στη μικροκυστίνη παρά στη

gemcitabine που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μεταστατικού-προχωρημένου καρκίνου του παγκρέατος. Η αρχική υπόθεση περι της ικανότητας της ακετυλοκυστεΐνης να διαφυλάττει τη βιωσιμότητα των φυσιολογικών έναντι των καρκινικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε έμμεσα όταν η NAC χρησιμοποιηθείσα πριν την έκθεση σε MC-LR κατάφερε να ελαττώσει το ρυθμό μεταβολής της προκαλούμενης τοξικότητας απο την μικροκυστίνη στα κύτταρα ελέγχου CHO. Παρά τις αλληπάλληλες προσπάθειες για την *in vitro* σύζευξη την MC-LR με τη NAC, αυτό δεν κατέστη δυνατόν.

Συμπεράσματα:

Η επιβεβαιωμένη έκφραση των OATPs 1A2, 1B1 και 1B3 σε καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με φυσιολογικούς, τους καθιστά υποψήφιους στόχους για τη θεραπευτική εκμετάλλευση και αξιοποίηση τους. Στην εποχή της στοχευμένης θεραπείας του καρκίνου, οι κυανοτοξίνες αποτελούν μια πλούσια πηγή φυσικών κυτταροτοξικών ενώσεων με δυνατότητα στόχευσης καρκίνων που εκφράζουν συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς διακομιστές πρόσληψης. Επιπλέον προσπάθεια αξίζει να καταβληθεί για τη σύζευξη και σύνθεση σταθερού σύμπλοκου MC-LR/NAC ώστε να ενισχύσει το θεραπευτικό δείκτη και να ελαττώσει πιθανά προβλήματα τοξικότητας οργάνων στόχων.

ABSTRACT

Background:

Microcystins and Nodularins are natural cyclopeptides synthesized from cyanobacteria and are considered health hazardous due to their toxic effects after acute consumption or chronic exposure. From a pharmacologic point of view, microcystins are stable, hydrophilic cyclic heptapeptides with the ability to cause extensive cell damage uptaken intracellularly through Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP). Their main endocellular biological mechanisms of toxicity is the inhibition of the protein phosphatases PP 1 and 2A, the reduction of Glutathione levels and the increase of the Reactive Oxygen Species (ROS) concentration. This research focused on investigation of microcystins as potential anticancer compounds to target cancers that express OATPs.

Methods:

We used the polyclonic p1A2 and p1B3 as well as the monoclonic antibodies mESL and mMDQ for (a) immunohistochemistry on human paraffin embedded tissue samples and (b) Western blotting on fresh frozen tissue and cell lines. Furthermore we used the following characterized cancer and normal cell lines: MIA PaCa-2, Bx-PC3, MRC-5, HepG2, CaCo-2, CHO (1B1, 1B3 transfected) as well as human primary peripheral monocytes. The endogenous expression of OATPs was assessed by real time PCR. xCELLigence and flow cytometry (Annexin/PI) methods were used for the study of microcystin-LR cell toxicity. Modeller 9.11 software was used for the *in silico* design and calculation of the structure of OATPs, microcystin/NAC molecules as well as their probable interactions. Graphs, statistical analysis and IC50 calculations were assessed by GraphPad Prism and xCELLigence software respectively.

Results:

The data resulted from our experimental procedures confirm the expression of OATPs in human normal liver tissue and prove the intense and abundant expression of OATP1B3 in many cancers such as breast, lung, pancreas, colon, stomach as well as in the cancer cell lines Bx-PC3 and MIA PaCa-2. Moreover, OATP1B3 shows a time-dependent expression profile in these two cell lines. Of great interest, the epigenetic regulation of expression of OATP1B3 observed in the HepG2 cell line, appears to be absent in Bx-PC3 and MIA PaCa-2 lines. In addition the two pancreatic cancer cell lines showed a relative sensitivity to microcystin-LR, proportional to the OATP1B3 expression level. Of interest, microcystin LR surpassed the toxic effect of the chemotherapeutic agent gemcitabine in the Bx-PC3 cell line. The initial hypothesis of the cytoprotective ability of N-acetylcysteine was confirmed, as NAC managed to reduce the cytotoxic rate caused by microcystin-LR exposure in normal and not in cancer cell lines. Regardless the multiple attempts for the *in vitro* synthesis of a stable MC-LR/NAC complex molecule this was not made possible.

Conclusions:

The expression of OATPs 1A2, 1B1 and 1B3 in cancer tissues makes them candidate therapeutic targets. We propose that structural modification of the MC-LR molecule could result in the development of novel compounds with activity against pancreatic cancers that express OATP1B3.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Awramik SM. The oldest records of photosynthesis. *Photosynthesis research*. 1992;33:75-89. Epub 1992/01/01.
2. Blank CE, Sanchez-Baracaldo P. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria--a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology*. 2010;8(1):1-23. Epub 2009/10/30.
3. Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E, Steward GF, et al. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*. 2001;412(6847):635-8. Epub 2001/08/09.
4. Francis G. Poisonous Australian Lake. *Nature*. 1878;18:11-2.
5. Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, Rao PV. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*. 2003;188(2-3):285-96. Epub 2003/05/28.
6. Falconer IR, Humpage AR. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International journal of environmental research and public health*. 2005;2(1):43-50. Epub 2006/05/19.
7. Vareli K, Briasoulis E, Pilidis G, Sainis I. Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin—Synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece. *Harmful Algae*. 2009;8(3):447-53.
8. Vareli K, Pilidis G, Mavrogiorgou MC, Briasoulis E, Sainis I. Molecular characterization of cyanobacterial diversity and yearly fluctuations of Microcystin loads in a suburban Mediterranean Lake (Lake Pamvotis, Greece). *J Environ Monit*. 2009;11(8):1506-12. Epub 2009/08/07.
9. Sarnelle O, Morrison J, Kaul R, Horst G, Wandell H, Bednarz R. Citizen monitoring: Testing hypotheses about the interactive influences of eutrophication and mussel invasion on a cyanobacterial toxin in lakes. *Water research*. 2010;44(1):141-50. Epub 2009/09/29.
10. Gaudin J, Le Hegarat L, Nessler F, Marzin D, Fessard V. In vivo genotoxic potential of microcystin-LR: a cyanobacterial toxin, investigated both by the unscheduled DNA synthesis (UDS) and the comet assays after intravenous administration. *Environ Toxicol*. 2009;24(2):200-9. Epub 2008/06/19.
11. van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(1):7-60. Epub 2006/12/30.
12. Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(2):587-98.
13. Herfindal L, Kasprzykowski F, Schwede F, Lankiewicz L, Fladmark KE, Lukomska J, et al. Acyloxymethyl esterification of nodularin-R and microcystin-LA produces inactive protoxins that become reactivated and produce apoptosis inside intact cells. *J Med Chem*. 2009;52(18):5758-62. Epub 2009/08/27.
14. Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 1994;270(1):78-86. Epub 1994/01/01.
15. Gullegea BM, Aggena JB, Huangb HB, Nairnc AC, Chamberlin AR. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. *Curr Med Chem*. 2002;9(22):1991-2003. Epub 2002/10/09.
16. Bouaicha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in

primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 2004;148(1-2):53-63. Epub 2004/03/17.

17. Lanaras T, Cook CM, Eriksson JE, Meriluoto JA, Hotokka M. Computer modelling of the 3-dimensional structures of the cyanobacterial hepatotoxins microcystin-LR and nodularin. *Toxicon.* 1991;29(7):901-6. Epub 1991/01/01.

18. Sivonen K, Carmichael WW, Namikoshi M, Rinehart KL, Dahlem AM, Niemela SI. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(9):2650-7. Epub 1990/09/01.

19. Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, et al. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *The Journal of Organic Chemistry.* 1992;57(3):866-72.

20. de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJ, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms--a serious global public health issue. *Ecotoxicology and environmental safety.* 2004;59(2):151-63. Epub 2004/08/26.

21. Harada K, Imanishi S, Kato H, Mizuno M, Ito E, Tsuji K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon.* 2004;44(1):107-9. Epub 2004/07/01.

22. Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, et al. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japanese journal of cancer research : Gann.* 1991;82(9):993-6. Epub 1991/09/01.

23. Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(11):4086-94. Epub 1996/11/01.

24. Harada K, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe MF, et al. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical research in toxicology.* 1990;3(5):473-81. Epub 1990/09/01.

25. Tooming-Klunderud A, Rohrlack T, Shalchian-Tabrizi K, Kristensen T, Jakobsen KS. Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. *Microbiology.* 2007;153(5):1382-93.

26. Hyenstrand P, Rohrlack T, Beattie KA, Metcalf JS, Codd GA, Christoffersen K. Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-LR in lake water. *Water research.* 2003;37(14):3299-306. Epub 2003/07/02.

27. Oliveira AC, Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SM. Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved microcystin (cyanotoxin). *Environ Toxicol.* 2005;20(2):126-30. Epub 2005/03/29.

28. Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H, et al. Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon.* 1995;33(12):1619-31. Epub 1995/12/01.

29. Akcaalan R, Young FM, Metcalf JS, Morrison LF, Albay M, Codd GA. Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix* spp. in laboratory cultures and environmental blooms. *Water research.* 2006;40(8):1583-90. Epub 2006/04/07.

30. Zhang D, Xie P, Chen J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 2010;84(2):202-7. Epub 2009/11/26.

31. Noguchi T, Shinohara A, Nishizawa A, Asayama M, Nakano T, Hasegawa M, et al. Genetic analysis of the microcystin biosynthesis gene cluster in *Microcystis* strains from four bodies of eutrophic water in Japan. *The Journal of general and applied microbiology*. 2009;55(2):111-23. Epub 2009/05/14.
32. Sedmak B, Elerseck T. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microbial ecology*. 2006;51(4):508-15. Epub 2006/04/29.
33. Hu ZQ, Liu YD, Li DH. Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environ Toxicol*. 2004;19(6):571-7. Epub 2004/11/05.
34. DeMott WR, Moxter F. Foraging Cyanobacteria by Copepods: Responses to Chemical Defense and Resource Abundance. *Ecology*. 1991;72(5):1820-34.
35. Schatz D, Keren Y, Vardi A, Sukenik A, Carmeli S, Borner T, et al. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental microbiology*. 2007;9(4):965-70. Epub 2007/03/16.
36. Armitage AR, Fong P. Upward cascading effects of nutrients: shifts in a benthic microalgal community and a negative herbivore response. *Oecologia*. 2004;139(4):560-7. Epub 2004/03/12.
37. Jang MH, Ha K, Takamura N. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. *Toxicon*. 2008;51(5):882-9. Epub 2008/02/05.
38. Utkilen H, Gjolme N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(2):797-800. Epub 1995/02/01.
39. Hooser SB. Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following microcystin-LR administration to rats. *Toxicologic pathology*. 2000;28(5):726-33. Epub 2000/10/12.
40. Weng D, Lu Y, Wei Y, Liu Y, Shen P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*. 2007;232(1-2):15-23. Epub 2007/01/16.
41. Oberholster PJ, Myburgh JG, Govender D, Bengis R, Botha AM. Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2009;72(4):1177-82. Epub 2009/02/24.
42. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Human & experimental toxicology*. 1999;18(3):162-7. Epub 1999/04/24.
43. Miura GA, Robinson NA, Lawrence WB, Pace JG. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicon*. 1991;29(3):337-46. Epub 1991/01/01.
44. Runnegar M, Berndt N, Kaplowitz N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;134(2):264-72. Epub 1995/10/01.
45. Clark SP, Ryan TP, Searfoss GH, Davis MA, Hooser SB. Chronic microcystin exposure induces hepatocyte proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in P53-deficient mice. *Toxicologic pathology*. 2008;36(2):190-203. Epub 2008/03/20.
46. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, et al. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992;118(6):420-4. Epub 1992/01/01.

47. Humpage AR, Hardy SJ, Moore EJ, Frosco SM, Falconer IR. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2000;61(3):155-65. Epub 2000/10/19.
48. Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, et al. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis*. 1999;20(1):161-5. Epub 1999/02/06.
49. Lian M, Liu Y, Yu SZ, Qian GS, Wan SG, Dixon KR. Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promote aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice. *World J Gastroenterol*. 2006;12(19):3065-72. Epub 2006/05/24.
50. Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives*. 2001;109(7):663-8. Epub 2001/08/04.
51. Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*. 1998;338(13):873-8. Epub 1998/03/27.
52. Yuan M, Carmichael WW, Hilborn ED. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon*. 2006;48(6):627-40. Epub 2006/09/06.
53. Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhaes VF, Hilborn ED, et al. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Toxicol*. 2006;21(2):95-103. Epub 2006/03/11.
54. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*. 1996;17(6):1317-21. Epub 1996/06/01.
55. Svircev Z, Krstic S, Miladinov-Mikov M, Baltic V, Vidovic M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2009;27(1):36-55. Epub 2009/02/11.
56. Coglianò VJ, Baan RA, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Use of mechanistic data in IARC evaluations. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2008;49(2):100-9. Epub 2008/02/02.
57. Hagenbuch B, Meier P. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2004;447(5):653-65.
58. Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203(3):257-63. Epub 2005/03/02.
59. Yoshida T, Makita Y, Tsutsumi T, Nagata S, Tashiro F, Yoshida F, et al. Immunohistochemical localization of microcystin-LR in the liver of mice: a study on the pathogenesis of microcystin-LR-induced hepatotoxicity. *Toxicologic pathology*. 1998;26(3):411-8. Epub 1998/06/03.
60. Runnegar MT, Kong S, Berndt N. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *The American journal of physiology*. 1993;265(2 Pt 1):G224-30. Epub 1993/08/01.

61. Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K, Ichihara A, Carmichael WW, et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1990;116(6):609-14. Epub 1990/01/01.
62. Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, Aoyama K, et al. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free radical research*. 2007;41(12):1326-37. Epub 2007/10/27.
63. MacKintosh RW, Dalby KN, Campbell DG, Cohen PT, Cohen P, MacKintosh C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett*. 1995;371(3):236-40. Epub 1995/09/11.
64. Fischer WJ, Hitzfeld BC, Tencalla F, Eriksson JE, Mikhailov A, Dietrich DR. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;54(2):365-73. Epub 2000/04/25.
65. Lovell RA, Schaeffer DJ, Hooser SB, Haschek WM, Dahlem AM, Carmichael WW, et al. Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 1989;9(3):221-37. Epub 1989/05/01.
66. Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, et al. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural toxins*. 1997;5(3):91-5. Epub 1997/01/01.
67. Billam M, Mukhi S, Tang L, Gao W, Wang JS. Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single-dose treatment. *Toxicol*. 2008;51(6):1068-80. Epub 2008/03/15.
68. Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, Harada K. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicol*. 2002;40(7):1017-25. Epub 2002/06/22.
69. Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, et al. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*. 2006;127(2):341-53. Epub 2006/10/24.
70. Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett*. 2004;557(1-3):1-8. Epub 2004/01/27.
71. Yamamoto H, Hinoi T, Michiue T, Fukui A, Usui H, Janssens V, et al. Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 2001;276(29):26875-82. Epub 2001/04/12.
72. Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15(1):34-41. Epub 2005/01/22.
73. Zegura B, Zajc I, Lah TT, Filipic M. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicol*. 2008;51(4):615-23. Epub 2008/01/15.
74. Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu DS, Zhang LS, Suzuki T, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res*. 2004;557(1):1-6. Epub 2004/01/07.
75. Rao PV, Bhattacharya R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*. 1996;114(1):29-36. Epub 1996/11/15.

76. Runnegar MT, Andrews J, Gerdes RG, Falconer IR. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicol.* 1987;25(11):1235-9. Epub 1987/01/01.
77. Zegura B, Lah TT, Filipic M. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat Res.* 2006;611(1-2):25-33. Epub 2006/09/26.
78. Lankoff A, Banasik A, Nowak M. Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress. *Archives of toxicology.* 2002;76(3):158-65. Epub 2002/04/23.
79. Mikhailov A, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Meriluoto J, Eriksson JE. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chem Biol Interact.* 2003;142(3):223-37. Epub 2002/11/28.
80. Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Owen Young D, Chen C, et al. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology.* 2006;220(1):71-80. Epub 2006/01/18.
81. Mankiewicz J, Tarczynska M, Fladmark KE, Doskeland SO, Walter Z, Zalewski M. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environ Toxicol.* 2001;16(3):225-33. Epub 2001/06/21.
82. Ding WX, Shen HM, Ong CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2000;32(3):547-55. Epub 2000/08/29.
83. Fladmark KE, Brustugun OT, Hovland R, Boe R, Gjertsen BT, Zhivotovsky B, et al. Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1099-108. Epub 1999/12/01.
84. Lin SS, Bassik MC, Suh H, Nishino M, Arroyo JD, Hahn WC, et al. PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2006;281(32):23003-12. Epub 2006/05/24.
85. Tilli MT, Hudgins SL, Frech MS, Halama ED, Renou JP, Furth PA. Loss of protein phosphatase 2A expression correlates with phosphorylation of DP-1 and reversal of dysplasia through differentiation in a conditional mouse model of cancer progression. *Cancer Res.* 2003;63(22):7668-73. Epub 2003/11/25.
86. Ding WX, Nam Ong C. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS microbiology letters.* 2003;220(1):1-7. Epub 2003/03/20.
87. Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res.* 1999;442(2):69-77. Epub 1999/07/07.
88. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(8):1333-40. Epub 2007/05/15.
89. Ahlin G, Hilgendorf C, Karlsson J, Szogyarto CA, Uhlen M, Artursson P. Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(12):2275-83. Epub 2009/09/11.
90. Boaru DA, Dragos N, Schirmer K. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. *Toxicology.* 2006;218(2-3):134-48. Epub 2005/11/30.

91. Lee W, Belkhir A, Lockhart AC, Merchant N, Glaeser H, Harris EI, et al. Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer. *Cancer Res.* 2008;68(24):10315-23. Epub 2008/12/17.
92. Cui Y, Konig J, Nies AT, Pfannschmidt M, Hergt M, Franke WW, et al. Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2003;83(4):527-38. Epub 2003/04/16.
93. Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, et al. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2001;120(7):1689-99. Epub 2001/05/29.
94. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2004;447(5):465-8. Epub 2003/11/19.
95. Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):778-801. Epub 2008/08/01.
96. Svoboda M, Riha J, Wlcek K, Jaeger W, Thalhammer T. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Current drug metabolism.* 2011;12(2):139-53. Epub 2011/03/15.
97. Sainis I, Fokas D, Vareli K, Tzakos AG, Kounnis V, Briasoulis E. Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. *Marine drugs.* 2010;8(3):629-57. Epub 2010/04/23.
98. Pressler H, Sissung TM, Venzon D, Price DK, Figg WD. Expression of OATP family members in hormone-related cancers: potential markers of progression. *PLoS One.* 2011;6(5):e20372. Epub 2011/06/01.
99. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2012;52:135-51. Epub 2011/08/23.
100. Sissung TM, Pressler H, Price DK, Figg WD. SLCO transport genes in prostate cancer--letter. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(10):2325; author reply 6-7. Epub 2011/09/08.
101. Wright JL, Kwon EM, Ostrander EA, Montgomery RB, Lin DW, Vessella R, et al. Expression of SLCO transport genes in castration-resistant prostate cancer and impact of genetic variation in SLC01B3 and SLC02B1 on prostate cancer outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(4):619-27. Epub 2011/01/27.
102. Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011;26(3):220-7. Epub 2011/02/08.
103. van der Deure WM, Hansen PS, Peeters RP, Kyvik KO, Friesema EC, Hegedus L, et al. Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology.* 2008;149(10):5307-14. Epub 2008/06/21.
104. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol.* 2002;16(10):2283-96. Epub 2002/09/28.
105. Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol.* 2004;65(4):973-8. Epub 2004/03/27.

106. Adachi H, Suzuki T, Abe M, Asano N, Mizutamari H, Tanemoto M, et al. Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):F1188-97. Epub 2003/11/25.
107. Olszewski-Hamilton U, Svoboda M, Thalhammer T, Buxhofer-Ausch V, Geissler K, Hamilton G. Organic Anion Transporting Polypeptide 5A1 (OATP5A1) in Small Cell Lung Cancer (SCLC) Cells: Possible Involvement in Chemoresistance to Satraplatin. *Biomarkers in Cancer*. 2011;3(2703-BIC-Organic-Anion-Transporting-Polypeptide-5A1-(OATP5A1)-in-Small-Cell-Lun.pdf):31-40.
108. Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, et al. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(1):251-60. Epub 2000/06/30.
109. Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica*. 2006;36(10-11):963-88. Epub 2006/11/23.
110. Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, et al. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol*. 2003;17(7):1203-15. Epub 2003/04/05.
111. Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, et al. Identification of the gonad-specific anion transporter SLC06A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun*. 2004;4:13. Epub 2004/11/18.
112. Schiffer R, Neis M, Holler D, Rodriguez F, Geier A, Gartung C, et al. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(2):285-91. Epub 2003/01/25.
113. Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Reme C, et al. Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Exp Eye Res*. 2005;80(1):61-72. Epub 2005/01/18.
114. Libra A, Ferneti C, Lorusso V, Visigalli M, Anelli PL, Staud F, et al. Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(2):809-17. Epub 2006/08/10.
115. Bronger H, Konig J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, et al. ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res*. 2005;65(24):11419-28. Epub 2005/12/17.
116. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):693-705. Epub 2009/09/30.
117. Franke RM, Scherckenbach LA, Sparreboom A. Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2. *Pharmacogenomics*. 2009;10(3):339-44. Epub 2009/03/18.
118. Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV. Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3902-12. Epub 2003/08/14.
119. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3569-74. Epub 2004/03/03.

120. Wlcek K, Svoboda M, Thalhammer T, Sellner F, Krupitza G, Jaeger W. Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(9):1450-5. Epub 2008/10/25.
121. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-11. Epub 2006/11/04.
122. Umehara K, Iwai M, Adachi Y, Iwatsubo T, Usui T, Kamimura H. Hepatic uptake and excretion of (-)-N-{2-[(R)-3-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-2-carbonyl)piperidin-1-yl]ethyl}-4-fluorobenzamide (YM758), a novel if channel inhibitor, in rats and humans. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(6):1030-8. Epub 2008/03/12.
123. Huber RD, Gao B, Sidler P, Fandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, et al. Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(2):C795-806. Epub 2006/09/15.
124. Janneh O, Hartkoorn RC, Jones E, Owen A, Ward SA, Davey R, et al. Cultured CD4T cells and primary human lymphocytes express hOATPs: intracellular accumulation of saquinavir and lopinavir. *Br J Pharmacol.* 2008;155(6):875-83. Epub 2008/11/13.
125. Seki S, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Contribution of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 to amiodarone accumulation in lung epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(5):911-7. Epub 2009/03/17.
126. Kraft ME, Glaeser H, Mandery K, Konig J, Auge D, Fromm MF, et al. The prostaglandin transporter OATP2A1 is expressed in human ocular tissues and transports the antiglaucoma prostanoid latanoprost. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010;51(5):2504-11. Epub 2009/12/19.
127. Niessen J, Jedlitschky G, Grube M, Bien S, Schwertz H, Ohtsuki S, et al. Human platelets express organic anion-transporting peptide 2B1, an uptake transporter for atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(5):1129-37. Epub 2009/02/25.
128. Lockhart AC, Harris E, Lafleur BJ, Merchant NB, Washington MK, Resnick MB, et al. Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome. *Clinical and experimental gastroenterology.* 2008;1:1-7. Epub 2008/01/01.
129. Kounnis V, Ioachim E, Svoboda M, Tzakos A, Sainis I, Thalhammer T, et al. Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets. *Onco Targets Ther.* 2011;4:27-32.
130. Maeda T, Irokawa M, Arakawa H, Kuraoka E, Nozawa T, Tateoka R, et al. Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;122(4):180-5. Epub 2010/07/10.
131. Hamada A, Sissung T, Price DK, Danesi R, Chau CH, Sharifi N, et al. Effect of SLC01B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3312-8. Epub 2008/06/04.
132. Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(2):587-98. Epub 2007/02/20.

133. Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, et al. Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 2008;8:7. Epub 2008/04/23.
134. Cutler MJ, Choo EF. Overview of SLC22A and SLCO families of drug uptake transporters in the context of cancer treatments. *Current drug metabolism.* 2011;12(8):793-807. Epub 2011/07/27.
135. Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, et al. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(4):1460-4. Epub 1996/04/01.
136. Banerjee N, Allen C, Bendayan R. Differential role of organic anion-transporting polypeptides in estrone-3-sulphate uptake by breast epithelial cells and breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(2):510-9. Epub 2012/05/17.
137. Arakawa H, Nakanishi T, Yanagihara C, Nishimoto T, Wakayama T, Mizokami A, et al. Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(8):1070-7. Epub 2012/08/07.
138. Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, et al. Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Sci.* 2007;98(10):1570-6. Epub 2007/09/01.
139. Al Sarakbi W, Mokbel R, Salhab M, Jiang WG, Reed MJ, Mokbel K. The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(6C):4985-90. Epub 2007/01/12.
140. Svoboda M, Wlcek K, Taferner B, Hering S, Stieger B, Tong D, et al. Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport. *Biomed Pharmacother.* 2011;65(6):417-26. Epub 2011/07/02.
141. Yang M, Xie W, Mostaghel E, Nakabayashi M, Werner L, Sun T, et al. SLCO2B1 and SLCO1B3 may determine time to progression for patients receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(18):2565-73. Epub 2011/05/25.
142. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB, 3rd. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol.* 2002;20(15):3270-5. Epub 2002/08/01.
143. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15(6):2403-13. Epub 1997/06/01.
144. Briasoulis E, Pavlidis N, Terret C, Bauer J, Fiedler W, Schoffski P, et al. Glufosfamide administered using a 1-hour infusion given as first-line treatment for advanced pancreatic cancer. A phase II trial of the EORTC-new drug development group. *Eur J Cancer.* 2003;39(16):2334-40. Epub 2003/10/15.
145. Vasuri F, Golfieri R, Fiorentino M, Capizzi E, Renzulli M, Pinna AD, et al. OATP 1B1/1B3 expression in hepatocellular carcinomas treated with orthotopic liver transplantation. *Virchows Arch.* 2011;459(2):141-6. Epub 2011/06/22.
146. Wlcek K, Svoboda M, Riha J, Zakaria S, Olszewski U, Dvorak Z, et al. The analysis of organic anion transporting polypeptide (OATP) mRNA and protein patterns in

primary and metastatic liver cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(9):801-11. Epub 2011/03/09.

147. Wojtal KA, Eloranta JJ, Hruz P, Gutmann H, Drewe J, Staumann A, et al. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(9):1871-7. Epub 2009/06/03.

148. Tamai I. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(6):508-14. Epub 2011/08/10.

149. Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(3):362-70. Epub 2007/01/12.

150. Eloranta JJ, Hiller C, Juttner M, Kullak-Ublick GA. The SLC01A2 gene, encoding human organic anion-transporting polypeptide 1A2, is transactivated by the vitamin D receptor. *Mol Pharmacol.* 2012;82(1):37-46. Epub 2012/04/05.

151. Yamakawa Y, Hamada A, Shuto T, Yuki M, Uchida T, Kai H, et al. Pharmacokinetic impact of SLC01A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(1):157-63. Epub 2011/06/03.

152. Eechoute K, Franke RM, Loos WJ, Scherkenbach LA, Boere I, Verweij J, et al. Environmental and genetic factors affecting transport of imatinib by OATP1A2. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(6):816-20. Epub 2011/04/22.

153. Badagnani I, Castro RA, Taylor TR, Brett CM, Huang CC, Stryke D, et al. Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(2):521-9. Epub 2006/05/17.

154. Justenhoven C, Schaeffeler E, Winter S, Baisch C, Hamann U, Harth V, et al. Polymorphisms of the nuclear receptor pregnane X receptor and organic anion transporter polypeptides 1A2, 1B1, 1B3, and 2B1 are not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(2):563-9. Epub 2010/07/17.

155. Kock K, Koenen A, Giese B, Fraunholz M, May K, Siegmund W, et al. Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLC02B1) function by protein kinase C-mediated internalization. *J Biol Chem.* 2010;285(15):11336-47. Epub 2010/02/18.

156. Zhou F, Lee AC, Krafczyk K, Zhu L, Murray M. Protein kinase C regulates the internalization and function of the human organic anion transporting polypeptide 1A2. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1380-8. Epub 2010/12/08.

157. Sharifi N, Hamada A, Sissung T, Danesi R, Venzon D, Baum C, et al. A polymorphism in a transporter of testosterone is a determinant of androgen independence in prostate cancer. *BJU Int.* 2008;102(5):617-21. Epub 2008/06/10.

158. Oostendorp RL, van de Steeg E, van der Kruijssen CM, Beijnen JH, Kenworthy KE, Schinkel AH, et al. Organic anion-transporting polypeptide 1B1 mediates transport of Gimatecan and BNP1350 and can be inhibited by several classic ATP-binding cassette (ABC) B1 and/or ABCG2 inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(4):917-23. Epub 2009/01/14.

159. Ni W, Ji J, Dai Z, Papp A, Johnson AJ, Ahn S, et al. Flavopiridol pharmacogenetics: clinical and functional evidence for the role of SLC01B1/OATP1B1 in flavopiridol disposition. *PLoS One.* 2010;5(11):e13792. Epub 2010/11/13.

160. Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, et al. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol.* 2002;61(4):853-60. Epub 2002/03/20.

161. Feng B, Xu JJ, Bi YA, Mireles R, Davidson R, Duignan DB, et al. Role of hepatic transporters in the disposition and hepatotoxicity of a HER2 tyrosine kinase inhibitor CP-724,714. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;108(2):492-500. Epub 2009/02/19.
162. Hu S, Franke RM, Filipinski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn EA, et al. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):3141-8. Epub 2008/05/17.
163. Takada T, Weiss HM, Kretz O, Gross G, Sugiyama Y. Hepatic transport of PKI166, an epidermal growth factor receptor kinase inhibitor of the pyrrolo-pyrimidine class, and its main metabolite, ACU154. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(11):1272-8. Epub 2004/07/29.
164. Clarke JD, Cherrington NJ. Genetics or environment in drug transport: the case of organic anion transporting polypeptides and adverse drug reactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(3):349-60. Epub 2012/01/28.
165. Nakanishi T, Tamai I. Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;27(1):106-21. Epub 2011/12/22.
166. de Graan AJ, Lancaster CS, Obaidat A, Hagenbuch B, Elens L, Friberg LE, et al. Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4433-40. Epub 2012/06/20.
167. Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(3):434-9. Epub 2004/12/21.
168. Sai K, Saito Y, Maekawa K, Kim SR, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, et al. Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(1):95-105. Epub 2009/09/23.
169. Nassif A, Jia J, Keiser M, Oswald S, Modess C, Nagel S, et al. Visualization of hepatic uptake transporter function in healthy subjects by using gadoxetic acid-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2012;264(3):741-50. Epub 2012/07/10.
170. Nagai M, Furihata T, Matsumoto S, Ishii S, Motohashi S, Yoshino I, et al. Identification of a new organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA isoform primarily expressed in human cancerous tissues and cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):818-23. Epub 2012/02/14.
171. Ohtsuka H, Abe T, Onogawa T, Kondo N, Sato T, Oshio H, et al. Farnesoid X receptor, hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta are essential for transcriptional activation of the liver-specific organic anion transporter-2 gene. *J Gastroenterol*. 2006;41(4):369-77. Epub 2006/06/03.
172. Liedauer R, Svoboda M, Wlcek K, Arrich F, Ja W, Toma C, et al. Different expression patterns of organic anion transporting polypeptides in osteosarcomas, bone metastases and aneurysmal bone cysts. *Oncol Rep*. 2009;22(6):1485-92. Epub 2009/11/04.
173. Kleberg K, Jensen GM, Christensen DP, Lundh M, Grunnet LG, Knuhtsen S, et al. Transporter function and cyclic AMP turnover in normal colonic mucosa from patients with and without colorectal neoplasia. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:78. Epub 2012/06/28.
174. Schuster VL. Prostaglandin transport. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2002;68-69(0):633-47.

175. Choi K, Zhuang H, Crain B, Dore S. Expression and localization of prostaglandin transporter in Alzheimer disease brains and age-matched controls. *J Neuroimmunol.* 2008;195(1-2):81-7. Epub 2008/03/21.
176. Mandery K, Bujok K, Schmidt I, Wex T, Treiber G, Malfertheiner P, et al. Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter organic anion-transporting polypeptide 2A1 expressed in human gastroduodenal mucosa. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(2):345-51. Epub 2009/10/22.
177. Kang J, Chapdelaine P, Laberge PY, Fortier MA. Functional characterization of prostaglandin transporter and terminal prostaglandin synthases during decidualization of human endometrial stromal cells. *Hum Reprod.* 2006;21(3):592-9. Epub 2005/12/13.
178. Holla VR, Backlund MG, Yang P, Newman RA, DuBois RN. Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008;1(2):93-9. Epub 2009/01/14.
179. Koenen A, Kock K, Keiser M, Siegmund W, Kroemer HK, Grube M. Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(4):774-80. Epub 2012/09/18.
180. Kindla J, Rau TT, Jung R, Fasching PA, Strick R, Stoehr R, et al. Expression and localization of the uptake transporters OATP2B1, OATP3A1 and OATP5A1 in non-malignant and malignant breast tissue. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(6):584-91. Epub 2011/02/01.
181. Toyohara T, Suzuki T, Morimoto R, Akiyama Y, Souma T, Shiwaku HO, et al. SLC04C1 transporter eliminates uremic toxins and attenuates hypertension and renal inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2009;20(12):2546-55. Epub 2009/10/31.
182. Suzuki T, Toyohara T, Akiyama Y, Takeuchi Y, Mishima E, Suzuki C, et al. Transcriptional regulation of organic anion transporting polypeptide SLC04C1 as a new therapeutic modality to prevent chronic kidney disease. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3696-707. Epub 2011/06/10.
183. Isidor B, Pichon O, Redon R, Day-Salvatore D, Hamel A, Siwicka KA, et al. Mesomelia-synostoses syndrome results from deletion of SULF1 and SLC05A1 genes at 8q13. *American journal of human genetics.* 2010;87(1):95-100. Epub 2010/07/07.
184. Atanackovic D, Blum I, Cao Y, Wenzel S, Bartels K, Faltz C, et al. Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(9):1218-25. Epub 2006/08/25.
185. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Molecular and cellular endocrinology.* 2005;231(1-2):75-85. Epub 2005/02/17.
186. Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Yip CS, Ho RH, Kim RB. Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(22):9338-47. Epub 2008/11/18.
187. Ogasawara K, Terada T, Katsura T, Hatano E, Ikai I, Yamaoka Y, et al. Hepatitis C virus-related cirrhosis is a major determinant of the expression levels of hepatic drug transporters. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(2):190-9. Epub 2010/05/13.

188. Le Vee M, Jouan E, Moreau A, Fardel O. Regulation of drug transporter mRNA expression by interferon-gamma in primary human hepatocytes. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2011;25(1):99-103. Epub 2010/03/05.
189. Imai S, Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama Y. DNA methylation and histone modification profiles of mouse organic anion transporting polypeptides. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(1):72-8. Epub 2012/10/04.
190. Burris HA, 3rd. Shortcomings of current therapies for non-small-cell lung cancer: unmet medical needs. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S4-13. Epub 2009/08/15.
191. Saltz LB. Progress in cancer care: the hope, the hype, and the gap between reality and perception. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5020-1. Epub 2008/09/17.
192. Philip PA, Mooney M, Jaffe D, Eckhardt G, Moore M, Meropol N, et al. Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):5660-9. Epub 2009/10/28.
193. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570-83. Epub 2009/10/16.
194. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009;324(5935):1670-3. Epub 2009/06/27.
195. Roukos DH, Murray S, Briasoulis E. Molecular genetic tools shape a roadmap towards a more accurate prognostic prediction and personalized management of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(3):308-12. Epub 2007/03/28.
196. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645-59. Epub 2009/08/18.
197. Gatenby RA. A change of strategy in the war on cancer. *Nature*. 2009;459(7246):508-9. Epub 2009/05/30.
198. Briasoulis E, Judson I, Pavlidis N, Beale P, Wanders J, Groot Y, et al. Phase I trial of 6-hour infusion of glufosfamide, a new alkylating agent with potentially enhanced selectivity for tumors that overexpress transmembrane glucose transporters: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group. *J Clin Oncol*. 2000;18(20):3535-44. Epub 2000/10/14.
199. Laidley CW, Cohen E, Casida JE. Protein phosphatase in neuroblastoma cells: [3H]cantharidin binding site in relation to cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280(3):1152-8. Epub 1997/03/01.
200. Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery--an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(7):608-24. Epub 2008/07/02.
201. Robinson NA, Pace JG, Matson CF, Miura GA, Lawrence WB. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;256(1):176-82. Epub 1991/01/01.
202. Daily A, Monks NR, Leggas M, Moscow JA. Abrogation of microcystin cytotoxicity by MAP kinase inhibitors and N-acetyl cysteine is confounded by OATPIB1 uptake activity inhibition. *Toxicon*. 2010;55(4):827-37. Epub 2009/12/01.
203. Stotts RR, Namikoshi M, Haschek WM, Rinehart KL, Carmichael WW, Dahlem AM, et al. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*. 1993;31(6):783-9. Epub 1993/06/01.
204. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*. 1995;376(6543):745-53. Epub 1995/08/31.

205. Craig M, Luu HA, McCready TL, Williams D, Andersen RJ, Holmes CF. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1996;74(4):569-78. Epub 1996/01/01.
206. Maynes JT, Luu HA, Cherney MM, Andersen RJ, Williams D, Holmes CF, et al. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. *J Mol Biol*. 2006;356(1):111-20. Epub 2005/12/14.
207. Chen P, Cheng PT, Alam M, Beyer BD, Bisacchi GS, Dejneka T, et al. Aminodiol HIV protease inhibitors. Synthesis and structure-activity relationships of P1/P1' compounds: correlation between lipophilicity and cytotoxicity. *J Med Chem*. 1996;39(10):1991-2007. Epub 1996/05/10.
208. Aggen JB, Humphrey JM, Gauss CM, Huang HB, Nairn AC, Chamberlin AR. The design, synthesis, and biological evaluation of analogues of the serine-threonine protein phosphatase 1 and 2A selective inhibitor microcystin LA: rational modifications imparting PP1 selectivity. *Bioorg Med Chem*. 1999;7(3):543-64. Epub 1999/04/29.
209. Gullledge BM, Aggen JB, Chamberlin AR. Linearized and truncated microcystin analogues as inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(17):2903-6. Epub 2003/11/13.
210. Abdel-Rahman S, el-Ayouty YM, Kamael HA. Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian isolate). Comparison with some synthesized analogs. *International journal of peptide and protein research*. 1993;41(1):1-7. Epub 1993/01/01.
211. Taylor C, Quinn RJ, Suganuma M, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatase 2A by cyclic peptides modelled on the microcystin ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1996;6(17):2113-6.
212. Tappan E, Chamberlin AR. Activation of protein phosphatase 1 by a small molecule designed to bind to the enzyme's regulatory site. *Chemistry & biology*. 2008;15(2):167-74. Epub 2008/02/23.
213. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, et al. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical research in toxicology*. 1996;9(8):1355-9. Epub 1996/12/01.
214. Trogen GB, Edlund U, Larsson G, Sethson I. The solution NMR structure of a blue-green algae hepatotoxin, microcystin-RR--a comparison with the structure of microcystin-LR. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1998;258(2):301-12. Epub 1999/01/05.
215. Bagu JR, Sykes BD, Craig MM, Holmes CF. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *J Biol Chem*. 1997;272(8):5087-97. Epub 1997/02/21.
216. Bagu JR, Sonnichsen FD, Williams D, Andersen RJ, Sykes BD, Holmes CF. Comparison of the solution structures of microcystin-LR and motuporin. *Nature structural biology*. 1995;2(2):114-6. Epub 1995/02/01.
217. Lavigne P, Bagu JR, Boyko R, Willard L, Holmes CF, Sykes BD. Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2000;9(2):252-64. Epub 2000/03/15.

218. Nishizawa T, Asayama M, Fujii K, Harada K, Shirai M. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem.* 1999;126(3):520-9. Epub 1999/09/01.
219. Nishizawa T, Ueda A, Asayama M, Fujii K, Harada K, Ochi K, et al. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem.* 2000;127(5):779-89. Epub 2000/05/02.
220. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & biology.* 2000;7(10):753-64. Epub 2000/10/18.
221. Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(2):787-95. Epub 2003/02/07.
222. Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):686-92. Epub 2004/02/10.
223. Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical reviews.* 1997;97(7):2651-74. Epub 2002/02/20.
224. Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical reviews.* 2005;105(2):715-38. Epub 2005/02/11.
225. Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, et al. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of bacteriology.* 2003;185(9):2774-85. Epub 2003/04/18.
226. Tanabe Y, Sano T, Kasai F, Watanabe MM. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcv*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC evolutionary biology.* 2009;9:115. Epub 2009/05/26.
227. Lautru S, Challis GL. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology.* 2004;150(Pt 6):1629-36. Epub 2004/06/09.
228. Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, Wahlsten M, Laakso K, Wang H, et al. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC evolutionary biology.* 2007;7:183. Epub 2007/10/03.
229. Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology.* 1999;6(8):493-505. Epub 1999/07/28.
230. Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM, Challis GL. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature chemical biology.* 2005;1(5):265-9. Epub 2006/01/13.
231. Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5848-53. Epub 2000/05/17.
232. Tanovic A, Samel SA, Essen LO, Marahiel MA. Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science.* 2008;321(5889):659-63. Epub 2008/06/28.

233. Yonus H, Neumann P, Zimmermann S, May JJ, Marahiel MA, Stubbs MT. Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32484-91. Epub 2008/09/12.
234. Koglin A, Lohr F, Bernhard F, Rogov VV, Frueh DP, Strieter ER, et al. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature.* 2008;454(7206):907-11. Epub 2008/08/16.
235. Frueh DP, Arthanari H, Koglin A, Vosburg DA, Bennett AE, Walsh CT, et al. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature.* 2008;454(7206):903-6. Epub 2008/08/16.
236. Lai JR, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT. A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(14):5314-9. Epub 2006/03/29.
237. Watanabe K, Hotta K, Praseuth AP, Koketsu K, Migita A, Boddy CN, et al. Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Nature chemical biology.* 2006;2(8):423-8. Epub 2006/06/27.
238. Miyahisa I, Kaneko M, Funa N, Kawasaki H, Kojima H, Ohnishi Y, et al. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Applied microbiology and biotechnology.* 2005;68(4):498-504. Epub 2005/03/17.
239. Ma SM, Li JW, Choi JW, Zhou H, Lee KK, Moorthie VA, et al. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. *Science.* 2009;326(5952):589-92. Epub 2009/11/11.
240. Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK. Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;220(2):146-55. Epub 2007/02/17.
241. Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Moreno I, Jos A, Moyano R, et al. Effects of dietary N-acetylcysteine on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(8):1679-86. Epub 2009/03/18.
242. Kortsalioudaki C, Taylor RM, Cheeseman P, Bansal S, Mieli-Vergani G, Dhawan A. Safety and efficacy of N-acetylcysteine in children with non-acetaminophen-induced acute liver failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2008;14(1):25-30. Epub 2007/12/29.
243. Terneus MV, Brown JM, Carpenter AB, Valentovic MA. Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAME) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology.* 2008;244(1):25-34. Epub 2007/12/11.
244. Manov I, Hirsh M, Iancu TC. N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2004;94(5):213-25. Epub 2004/05/06.
245. Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International journal of molecular sciences.* 2010;11(1):268-87. Epub 2010/02/18.
246. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-91. Epub 2009/05/30.

247. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2004;7(2):97-110. Epub 2004/05/26.
248. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 2006;10(3):175-6. Epub 2006/09/09.
249. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*. 2006;10(3):241-52. Epub 2006/09/09.
250. Treiber A, Schneiter R, Hausler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(8):1400-7. Epub 2007/05/15.
251. He YJ, Zhang W, Chen Y, Guo D, Tu JH, Xu LY, et al. Rifampicin alters atorvastatin plasma concentration on the basis of SLCO1B1 521T>C polymorphism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;405(1-2):49-52. Epub 2009/04/21.
252. Ogasawara MA, Zhang H. Redox regulation and its emerging roles in stem cells and stem-like cancer cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(5):1107-22. Epub 2008/11/13.
253. Konig J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006;372(6):432-43. Epub 2006/03/10.
254. Ito K, Oleschuk CJ, Westlake C, Vasa MZ, Deeley RG, Cole SP. Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol Chem*. 2001;276(41):38108-14. Epub 2001/08/14.
255. Klaassen CD, Lu H. Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;101(2):186-96. Epub 2007/08/19.
256. Janga SC, Tzakos A. Structure and organization of drug-target networks: insights from genomic approaches for drug discovery. *Molecular bioSystems*. 2009;5(12):1536-48. Epub 2009/09/19.
257. Barglow KT, Cravatt BF. Activity-based protein profiling for the functional annotation of enzymes. *Nature methods*. 2007;4(10):822-7. Epub 2007/09/29.
258. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer Statistics, 2010*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2010;60(5):277-300.
259. Shaib Y, Davila J, Naumann C, El-Serag H. The Impact of Curative Intent Surgery on the Survival of Pancreatic Cancer Patients: A U.S. Population-Based Study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(7):1377-82.
260. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4):765-81. Epub 2010/02/02.
261. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS medicine*. 2010;7(4):e1000267. Epub 2010/04/28.
262. Tamburrino A, Piro G, Carbone C, Tortora G, Melisi D. Mechanisms of resistance to chemotherapeutic and anti-angiogenic drugs as novel targets for pancreatic cancer therapy. *Frontiers in pharmacology*. 2013;4:56. Epub 2013/05/04.

263. Orfanos CE, Hertel H. [Disorder of hair growth in hyperprolactinemia]. *Zeitschrift für Hautkrankheiten*. 1988;63(1):23-6. Epub 1988/01/18. Haarwachstumsstörung bei Hyperprolaktinämie.
264. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer research*. 1991;51(22):6110-7. Epub 1991/11/15.
265. Spigel DR, Hainsworth JD, Shipley DL, Ervin TJ, Kohler PC, Lubiner ET, et al. A randomized phase II trial of pemetrexed/gemcitabine/bevacizumab or pemetrexed/carboplatin/bevacizumab in the first-line treatment of elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2012;7(1):196-202. Epub 2011/09/09.
266. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-25. Epub 2011/05/13.
267. Utsugi T, Brown D, Nii A, Fidler I. Frozen-thawed human blood monocytes respond reproducibly to activation stimuli: Implications for screening of BRMs. *Biotherapy*. 1992;5(4):301-8.
268. Healthcare G. Isolation of mononuclear cells. *Methodology and applications*. 2010.
269. Steiner GE, Ecker RC, Kramer G, Stockenhuber F, Marberger MJ. Automated data acquisition by confocal laser scanning microscopy and image analysis of triple stained immunofluorescent leukocytes in tissue. *Journal of immunological methods*. 2000;237(1-2):39-50. Epub 2000/03/22.
270. Kramer G, Steiner GE, Neumayer C, Prinz-Kashani M, Hohenfellner M, Gomha M, et al. Over-expression of anti-CD75 reactive proteins on distal and collecting renal tubular epithelial cells in calcium-oxalate stone-forming kidneys in Egypt. *BJU international*. 2004;93(6):822-6. Epub 2004/03/31.
271. Science RA. RealTime ready Cell Lysis Kit. 2010.
272. Macherey-Nagel. Total RNA isolation - User manual. 2011.
273. Jonge HJMd. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes.
274. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. Epub 2012/06/20.
275. Schildkraut C. Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers*. 1965;3(2):195-208. Epub 1965/01/01.
276. Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(11):3746-50. Epub 1986/06/01.
277. Biochemicals RM. Technical Note No. LC 12/2000. 2000.
278. Biochemicals RM. LightCycler Software ® Version 3.5. 2001.
279. Kubbies M. Flow cytometric recognition of clastogen induced chromatin damage in G0/G1 lymphocytes by non-stoichiometric Hoechst fluorochrome binding. *Cytometry*. 1990;11(3):386-94. Epub 1990/01/01.
280. Braun MM, Farag-El-Massah S, Xu K, Coté TR. Emergence of orphan drugs in the United States: a quantitative assessment of the first 25 years. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(7):519-22.

281. Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner H-H, Ahmadi R, Herold-Mende C, et al. ABC Drug Efflux Pumps and Organic Anion Uptake Transporters in Human Gliomas and the Blood-Tumor Barrier. *Cancer Res.* 2005;65(24):11419-28.
282. Liedauer RS, M.; Wlcek, K.; Arrich, F.; Jä, W.; Toma, C.; Thalhammer, T. Different expression patterns of organic anion transporting polypeptides in osteosarcomas, bone metastases and aneurysmal bone cysts. *Oncology Reports.* 2009;22(6):1485-92.
283. Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, et al. Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Science.* 2007;98(10):1570-6.
284. Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic Uptake of Bilirubin and Its Conjugates by the Human Organic Anion Transporter SLC21A6. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(13):9626-30.
285. Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005;203(3):257-63.
286. Sainis I, Fokas D, Vareli K, Tzakos A, Kounnis V, Briasoulis E. Cyanobacterial Cyclopeptides as Lead Compounds to Novel Targeted Cancer Drugs. *Marine Drugs.* 2010;8(3):629-57.
287. Eriksson JE, Grönberg L, Nygård S, Slotte JP, Meriluoto JAO. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1990;1025(1):60-6.
288. Kounnis V, Ioachim E, Svoboda M, Sainis I, Ausch C, Kallay E, et al. Investigations on Organic Anion-Transporting Polypeptides 1A2, 1B1 and 1B3 in Colon Cancer as Potential Targets for Cancer Therapy. *EJC.* 2010;S8(7):112.
289. Buxhofer-Ausch V, Secky L, Wlcek K, Svoboda M, Kounnis V, Briasoulis E, et al. Tumor-Specific Expression of Organic Anion-Transporting Polypeptides: Transporters as Novel Targets for Cancer Therapy. *Journal of Drug Delivery.* 2013;2013:12.
290. Ulvestad M, Bjorquist P, Molden E, Asberg A, Andersson TB. OATP1B1/1B3 activity in plated primary human hepatocytes over time in culture. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(9):1219-26. Epub 2011/07/27.
291. Ichihara S, Kikuchi R, Kusuhara H, Imai S, Maeda K, Sugiyama Y. DNA methylation profiles of organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer cell lines. *Pharm Res.* 2010;27(3):510-6. Epub 2010/02/05.
292. Israili ZH, Vogler WR, Mingioli ES, Pirkle JL, Smithwick RW, Goldstein JH. The Disposition and Pharmacokinetics in Humans of 5-Azacytidine Administered Intravenously as a Bolus or by Continuous Infusion. *Cancer Research.* 1976;36(4):1453-61.
293. Tsai H-C, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool Feyruz V, et al. Transient Low Doses of DNA-Demethylating Agents Exert Durable Antitumor Effects on Hematological and Epithelial Tumor Cells. *Cancer Cell.* 2012;21(3):430-46.
294. Tedeschi M, Bohm S, Di Re F, Oriana S, Spatti GB, Tognella S, et al. Glutathione and detoxification. *Cancer Treatment Reviews.* 1990;17(2-3):203-8.
295. Zegura B, Lah TT, Filipic M. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2006;611(1-2):25-33.
296. Zegura B, Gajski G, Straser A, Garaj-Vrhovac V, Filipic M. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res.* 2011;726(2):116-22. Epub 2011/10/18.

297. Sansone RA, Sansone LA. Getting a Knack for NAC: N-Acetyl-Cysteine. *Innovations in clinical neuroscience*. 2011;8(1):10-4. Epub 2011/02/12.
298. Cui Y, Konig J, Nies AT, Pfannschmidt M, Hergt M, Franke WW, et al. Detection of the Human Organic Anion Transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Lab Invest*. 2003;83(4):527-38.
299. Tanaka K, Xu W, Zhou F, You G. Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14961-6. Epub 2004/01/30.
300. Gui C, Hagenbuch B. Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport. *Biochemistry*. 2008;47(35):9090-7. Epub 2008/08/12.
301. Glaeser H, Mandery K, Sticht H, Fromm MF, Konig J. Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. *British journal of pharmacology*. 2010;159(3):698-708. Epub 2010/01/27.
302. Gui C, Hagenbuch B. Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2009;18(11):2298-306. Epub 2009/09/18.
303. DeGorter MK, Ho RH, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. Interaction of three regiospecific amino acid residues is required for OATP1B1 gain of OATP1B3 substrate specificity. *Molecular pharmaceutics*. 2012;9(4):986-95. Epub 2012/02/23.
304. Weaver YM, Hagenbuch B. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *The Journal of membrane biology*. 2010;236(3):279-90. Epub 2010/09/08.

