

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

&

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ- ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ



ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:
*«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΝΕΩΝ ΣΤΟΧΩΝ»*

ΖΗΚΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2023

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαγκλάρα Αγγελική , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων & ΙΒΕ-ΙΤΕ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών-Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας στα Ιωάννινα, υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και συνεργαζόμενο μέλος με το ΙΒΕ-ΙΤΕ, κα. Μαγκλάρα Αγγελική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αγγελική Μαγκλάρα για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο της, για την βοήθεια και στήριξή της σε όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας, αλλά και για την γενικότερη συνεργασία μας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παλιά και νέα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και τη βοήθεια, όπου ήταν απαραίτητη, τον υπ. Διδάκτορα Δημήτρη Κορδιά για την δημιουργία της υπό μελέτη ανθεκτικής σειράς, αλλά και όλα τα μέλη του ΙΒΕ-ΙΤΕ για την ομαλή συνεργασία μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπαϊρακτάρη για την καθοδήγηση της σχετικά με τη μεθοδολογία NMR και την πρόσβαση που μας έδωσε στο εργαστήριο της, όπως και την Χριστίνα Κωσταρά και το Κέντρο NMR του ΠΙ για τη λήψη των φασμάτων και την Στυλιανή Παπαδάκη για την πολύτιμη βοήθεια της στην ποσοτικοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου κλινικής χημείας για την άψογη συνεργασία και συνεννόηση, όσο βρισκόμασταν στο εργαστήριο, αλλά και την όλη βοήθεια σχετικά με την ποσοτικοποίηση και ό,τι άλλο χρειαζόμασταν.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Καρκίνος του Μαστού	6
1.2 Υπότυποι καρκίνου του μαστού και ετερογένεια	6
1.3 Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού.....	8
1.4 Θεραπεία και προκλήσεις στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού	9
1.5 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων (Hallmarks of Cancer)	9
1.6 Μηχανισμοί χημειοανθεκτικότητας καρκινικών κυττάρων	11
1.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο-στόχευση των μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας.....	23
1.8 Σκοπός εργασίας	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1 Κυτταροκαλλιέργεια κυτταρικής σειράς MDA-MB-468	26
2.2 Φάρμακα	26
2.3 Δοκιμασία σχηματισμού μαμμόσφαιρων (Mammospheres formation assay) .	28
2.4 Δοκιμασία αύξησης κυτταρικού πληθυσμού (cell population growth assays)	29
2.5 Προσδιορισμός χημειοανθεκτικότητας των κυττάρων	30
2.6 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry).....	30
2.7 Ανοσοφθορισμός	33
2.8 Απομόνωση RNA.....	33
2.9 Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA synthesis)	34
2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	34
2.11 Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing) και βιοπληροφορική ανάλυση	35
2.12 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός μίας νέας κυτταρικής σειράς TAKM MDA-MB- 468 ανθεκτικής σε πακλιταξέλη (PTX res. MDA-MB-468)	38
3.2 Διερεύνηση του ρυθμού κυτταρικής αύξησης του πληθυσμού της πατρικής (parental) και της ανθεκτικής (PTX res.) σειράς MDA-MB-468.....	41
3.3 Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε χημειοφάρμακα.....	46

3.4 Μελέτη του πληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην πατρική (parental) και ανθεκτική (PTX res.) σειρά MDA-MB-468	49
3.5 Μελέτη του μεταγραφικού προφίλ της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς MDA-MB-468 μέσω αλληλούχισης RNA (RNA-sequencing)	53
3.6 Ανάλυση του μεταβολικού προφίλ της πατρικής (parental) και της ανθεκτικής (PTX res.) σειράς MDA-MB-468	64
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού, λόγω της μεγάλης ετερογένειας που τον χαρακτηρίζει, θεωρείται περισσότερο ένα σύνολο διαφορετικών τύπων καρκίνου, παρά μια αυστηρά καθορισμένη νόσος. Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TAKM) χαρακτηρίζεται από την απουσία των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα κι αποτελεί τον πιο επιθετικό υπότυπο, καθώς η απουσία των δεικτών αυτών, αποκλείει την χρήση στοχευτικών θεραπειών. Βασικό πρόβλημα ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού είναι η σταδιακή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη συστηματική χημειοθεραπεία με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων και τελικά την υποτροπή των ασθενών. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την εμφάνιση χημειοανθεκτικότητας είναι ποικίλοι και αφορούν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, που απορρυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην επιβίωσή τους υπό την πίεση των φαρμάκων. Η ρύθμιση έκφρασης επιφανειακών μορίων των κυττάρων, η επιδιόρθωση του DNA, ο μεταβολισμός και η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον αποτελούν κάποιους από τους μηχανισμούς αυτούς και η απορρύθμισή τους ελέγχεται κυρίως από αλλαγές σε γενετικό και επιγενετικό επίπεδο. Η μελέτη και βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ανάδειξη νέων φαρμακευτικών στόχων στον TAKM και στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπειών.

Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκε μία νέα κυτταρική σειρά MDA-MB-468 ανθεκτική στην πακλιταξέλη, σαν ένα έγκυρο *in vitro* σύστημα για την μελέτη μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας του TAKM στο φάρμακο αυτό. Η σειρά αυτή μελετήθηκε σε σύγκριση με την πατρική για να επικυρωθούν οι ιδιότητες που διέπουν τον χημειοανθεκτικό της χαρακτήρα. Ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ μέσω RNA-sequencing αποκάλυψε διαφορές σε βιολογικές διαδικασίες, μονοπάτια και γονίδια αυτών, κομβικής σημασίας για τον χημειοανθεκτικό φαινότυπο. Επιπλέον, μεταβολομική ανάλυση των 2 σειρών, έδειξε σημαντικές διαφορές στα μεταβολικά τους προφίλ. Μέσω αυτών των προσεγγίσεων αναδεικνύονται σημαντικοί παράγοντες, που θα μπορούσαν να εξεταστούν σαν θεραπευτικοί στόχοι για την καταπολέμηση του TAKM.

ABSTRACT

Breast cancer, due to the great heterogeneity that characterizes it, is considered more of a set of different types of cancer than a strictly defined disease. Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptors and is the most aggressive subtype, as the absence of these markers precludes the use of targeted therapies. The main problem for patients with triple-negative breast cancer is the gradual development of resistance to systemic chemotherapy, resulting in the creation of metastases and finally the relapse of the patients. The mechanisms responsible for the appearance of chemoresistance are diverse and involve different cellular functions, which are dysregulated in cancer cells, contributing to their survival under the pressure of drugs. Regulation of the expression of cell surface molecules, DNA repair, metabolism and interaction with the microenvironment are some of these mechanisms and their deregulation is mainly controlled by changes at the genetic and epigenetic level. The study and deeper understanding of these mechanisms could contribute to the emergence of new pharmaceutical targets in TACM and the development of more effective treatments.

In the present thesis, a new cell line MDA-MB-468 resistant to paclitaxel was characterized as a valid *in vitro* system for the study of chemoresistance mechanisms of TNBC to this drug. This line was studied in comparison with the parental line to validate the properties underlying its chemoresistant character. Analysis of the transcriptional profile through RNA-sequencing revealed differences in biological processes, pathways and genes thereof, pivotal for the chemoresistant phenotype. Furthermore, metabolomic analysis of the 2 series showed significant differences in their metabolic profiles. Through these approaches, important factors emerge that could be considered as therapeutic targets to combat TNBC.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

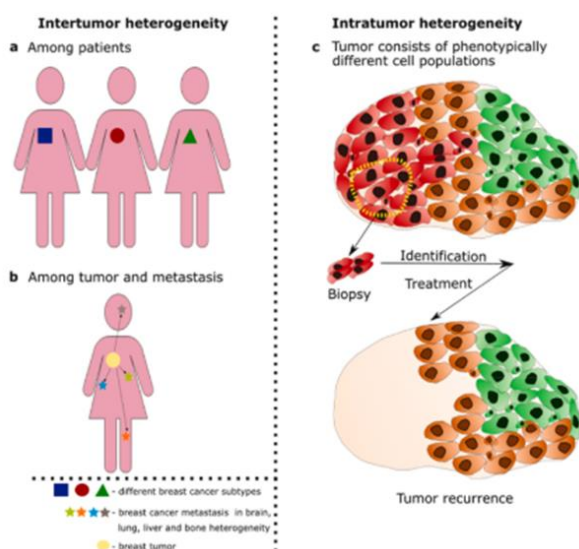
1.1 Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες και ιδιαίτερα θανατηφόρες νόσους παγκοσμίως (Global Cancer Observatory, International Agency for Research in Cancer, WHO). Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περίπου 20 εκατομμύρια άνθρωποι με κάποια μορφή καρκίνου, ενώ 10 εκατομμύρια πεθαίνουν (Chhikara and Parang 2023). Ο καρκίνος του μαστού κατέχει την πρώτη θέση στο γυναικείο φύλο, με 2.261.419 νέα περιστατικά μέσα στο 2020, ενώ σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας υπάρχει αυξητική τάση και προβλέπεται αύξηση έως 33,8% το 2040 (Global Cancer Observatory, International Agency for Research in Cancer, WHO). Ποικίλοι παράγοντες ευθύνονται για την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου αυτής. Είναι γνωστό ότι αρκετές μορφές καρκίνου συνδέονται άμεσα με κληρονομήσιμους γενετικούς παράγοντες. Παραδείγματος χάριν, τα γονίδια BRCA1/2, εμφανίζουν πολύ συχνά μεταλλάξεις σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό κυρίως σε γυναικολογικούς καρκίνους και καρκίνο μαστού. Το φύλο παίζει επίσης σημαντικό ρόλο, καθώς ο καρκίνος του μαστού αφορά σε μεγαλύτερο ποσοστό τις γυναίκες, όπως επίσης η ηλικία, η φυσική και σωματική κατάσταση, η λήψη ορισμένων φαρμάκων αλλά και το περιβάλλον (American Cancer Society 2022). Τέλος, τα ποσοστά επιτυχούς αντιμετώπισης της νόσου εξαρτώνται άμεσα από τον υπότυπο και την επιθετικότητά της, ενώ η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση και η σωστή θεραπευτική προσέγγιση μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερη πρόγνωση και έκβαση του ασθενούς.

1.2 Υπότυποι καρκίνου του μαστού και ετερογένεια

Ο καρκίνος στο σύνολό του χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Η ετερογένεια αυτή εμφανίζεται σε πολλά επίπεδα και μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ξεκινώντας από την πιο γενική έκφραση του όρου, η ετερογένεια αφορά τις διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των διαφορετικών ασθενών με τον ίδιο τύπο καρκίνου (Intertumoral heterogeneity) (Εικόνα 1.1A). Η ετερογένεια, όμως, αφορά και τον ίδιο τον όγκο και εκφράζει την ύπαρξη διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών εντός του ίδιου όγκου (Intratatumoral heterogeneity) (Εικόνα 1.1C). (Gerdes et al. 2014). Η ετερογένεια εντός του όγκου αποτελεί κρίσιμο στοιχείο και ιδιαίτερη πρόκληση στην μελέτη και αντιμετώπιση της νόσου. Τα κύτταρα, που απαρτίζουν έναν όγκο, εμφανίζονται ως διαφορετικοί υποπληθυσμοί με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και πολλές διαφορές σε γενετικό και επιγενετικό επίπεδο, με αποτέλεσμα τη διαφορική έκφραση δεικτών επιφανείας, ρυθμού ανάπτυξης, αλλά και απόκρισης σε θεραπευτικά μέσα (F. Michor and K. Polyak 2010). Σε αρκετούς τύπους καρκίνου η αυξημένη ετερογένεια δημιουργεί την ανάγκη για περαιτέρω ταξινόμηση σε υποτύπους, περιλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού (Perou et al. 2000).

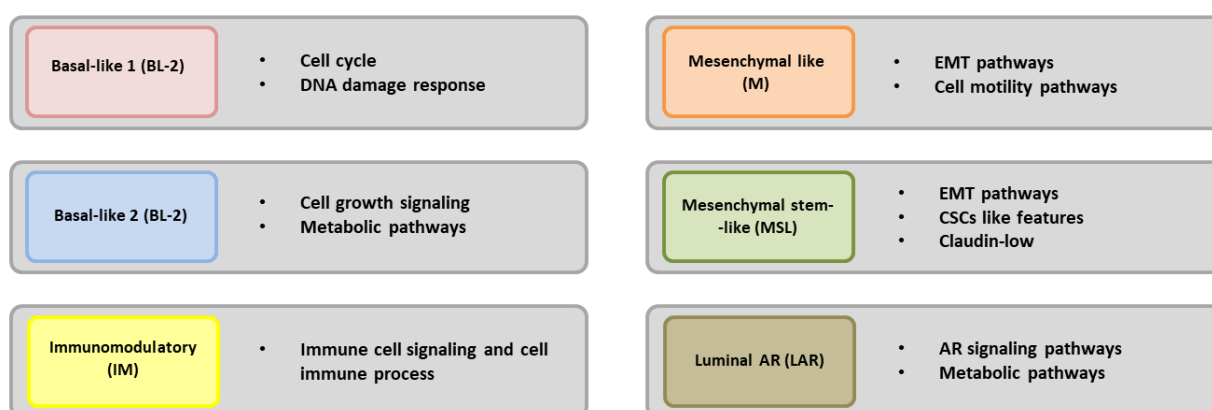
Ο καρκίνος του μαστού θεωρείται συχνά ένα σύνολο διαφορετικών τύπων καρκίνου, παρά μια αυστηρά καθορισμένη νόσος (Waks and Winer 2019). Για τον λόγο αυτό, η ορθή κατηγοριοποίηση των όγκων μαστού βάσει κοινών χαρακτηριστικών, είτε μορφολογικών είτε σε μοριακό επίπεδο, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη και αντιμετώπισή της νόσου. Με την πάροδο του χρόνου έχουν προταθεί πολλοί διαφορετικοί τρόποι κατηγοριοποίησης του καρκίνου του μαστού και η συνεχής εξέλιξη των διαθέσιμων ερευνητικών μεθόδων προσθέτει συνεχώς ακριβέστερα και πιο λεπτομερή δεδομένα στην διαδικασία αυτή (Bianchini et al. 2016)(Dent et al. 2007)(Lehmann et al. 2011). Η κατηγοριοποίηση, με βάση ιστολογικά κριτήρια, αποτελεί ένα βασικό τρόπο διαχωρισμού και βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και την αρχιτεκτονική δομή του όγκου (Dieci et al. 2014). Η πιο διαδεδομένη κατηγοριοποίηση όγκων μαστού είναι μέσω ανοσοϊστοχημείας για την έκφραση τριών επιφανειακών κυτταρικών δεικτών, του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), του υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) (Sims et al. 2007). Βάσει αυτών προκύπτουν τρεις υπότυποι, οι θετικοί για τους ορμονικούς υποδοχείς (HR-positive), οι θετικοί για τον υποδοχέα HER2 (HER2-positive) και οι τριπλά αρνητικοί καρκίνοι (HR-/HER2-negative)(Dieci et al. 2014). Όσον αφορά την πρώτη ομάδα (HR-positive), διαχωρίζεται σε δύο υποομάδες, τους Luminal A και Luminal B, οι οποίοι χαρακτηρίζονται και οι δυο από την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER+), με ή χωρίς την παρουσία του υποδοχέα προγεστερόνης (PR+), ενώ στην περίπτωση των Luminal B ένα ποσοστό εκφράζει τον υποδοχέα HER2 (Prat and Pegou 2011). Μελέτη του μεταγραφώματος των καρκινικών κυττάρων έχει αναδείξει επιπλέον γονίδια, χαρακτηριστικά του κάθε υπότυπου, όπως για παράδειγμα το γονίδιο *ki67*, δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ή γονίδια της οικογένειας των κυτοκερατινών (CKs) (Sims et al. 2007).



Εικόνα 1.1 Μοντέλα ετερογένειας στον καρκίνο. (Α) Ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών ασθενών με τον ίδιο τύπο καρκίνου ή (Β) Ετερογένεια στον ίδιο ασθενή μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και μετάστασης (intertumoral heterogeneity). (C) Ετερογένεια εντός του όγκου (intratumoral heterogeneity) (Januškevičienė and Petrikaitė 2019).

1.3 Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού

Ο τριπλά αρνητικός υπότυπος (Triple negative Breast Cancer, TNBC), όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από την απουσία τόσο των ορμονικών υποδοχέων (ER, PR), όσο και του υποδοχέα HER2 και αποτελεί και ο ίδιος μια ετερογενή ομάδα όγκων μαστού. Ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ από τους Lehmann et al. έδωσε έξι διακριτούς υπότυπους του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Lehmann et al. 2011). Ο διαχωρισμός αυτός περιλαμβάνει τον Basal-like 1, BL1, τον Basal-like 2, BL2, immunomodulatory, (IM), τον Mesenchymal (M), τον Mesenchymal stem-like, (MSL) και τον Luminal AR, (LAR) (Lehmann et al. 2011). Ο κάθε υπότυπος χαρακτηρίζεται από την έκφραση συνόλων γονιδίων με κοινή βιολογική λειτουργία και δράση, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.2, Παραδείγματος χάριν, οι υπότυποι BL1 και BL2, χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (cell proliferation), την απόκριση σε βλάβες του DNA (DNA damage response), ή την κυτταρική ανάπτυξη (cell growth), ενώ στην περίπτωση του immunomodulatory υπότυπου, υπάρχει ιδιαίτερα αυξημένη ανοσοποιητικού τύπου κυτταρική σηματοδότηση (immune cell signaling). Ο Luminal AR υπότυπος, όπως υποδεικνύει και το όνομα του, χαρακτηρίζεται από έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) και μονοπατιών που ελέγχονται από αυτόν, ενώ τέλος οι υπότυποι mesenchymal και mesenchymal stem-like ακολουθούν παρόμοια μοτίβα, εκφράζοντας σε υψηλά επίπεδα γονίδια που συμμετέχουν σε μονοπάτια επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (epithelial-mesenchymal transition, EMT) και μονοπάτια βλαστικού χαρακτήρα, κυρίως στην περίπτωση του MSL (Lehmann et al. 2011) (Εικόνα 1.2). Η μελέτη του μεταγραφώματος και η λεπτομερής κατηγοριοποίηση των διαφόρων υποτύπων του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού παρέχει και χρήσιμες πληροφορίες για τη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου.



Εικόνα 1.2 Οι έξι υπότυποι του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. (Lehmann et al). Κάθε υπότυπος χαρακτηρίζεται από την έκφραση ορισμένων ομάδων γονιδίων που ευθύνονται για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, όπως φαίνονται στην εικόνα.

1.4 Θεραπεία και προκλήσεις στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού

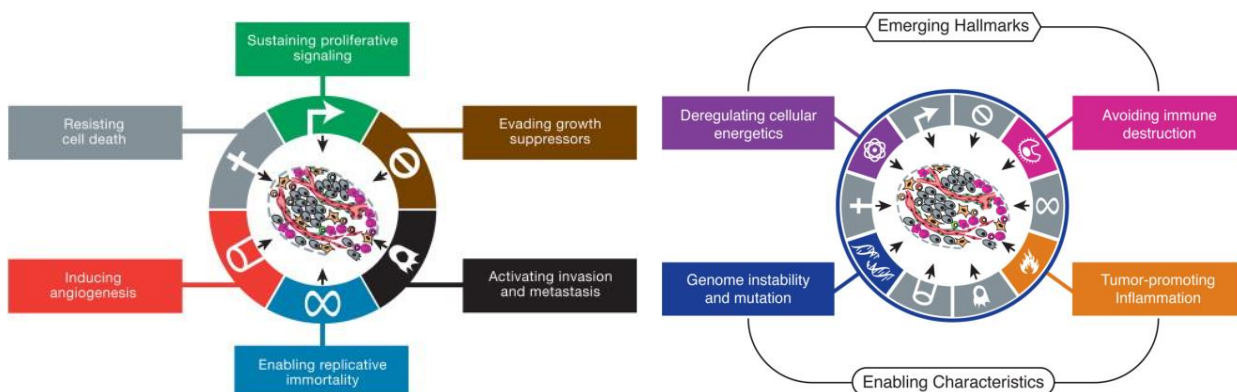
Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού θεωρείται ο πιο επιθετικός υπότυπος τόσο λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του, όσο και των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών και αποτελεί το 15% των συνολικών καρκίνων μαστού (Waks and Winer 2019). Η στοχευμένη θεραπεία αποτελεί μια πολύ συχνή προσέγγιση στον καρκίνο του μαστού και ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των HR+ καρκίνων, όπου η χορήγηση φαρμάκων, όπως η ταμοξιφαίνη (Tamoxifen), ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά επιτυχίας (Lumachi et al. 2011). Αλλά και στην περίπτωση των θετικών για το HER2 καρκίνων χρησιμοποιείται στοχευμένη θεραπεία με φάρμακα που στοχεύουν τον υποδοχέα HER2, όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab (Waks and Winer 2019). Φάρμακα αυτής της κατηγορίας σε συνδυασμό με ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά, φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε περιπτώσεις καρκίνων που επιδέχονται στοχευμένης θεραπείας (Waks and Winer 2019). Επιπλέον, η χρήση ειδικών φαρμάκων αυξάνει την εκλεκτικότητα του θεραπευτικού μέσου, ελαττώνοντας τις βλαβερές επιπτώσεις στα υγιή κύτταρα του ασθενή (Wang et al. 2019). Στην περίπτωση, όμως, του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, τέτοιου τύπου θεραπείες δεν βρίσκουν εφαρμογή. Η απουσία έκφρασης χαρακτηριστικών επιφανειακών δεικτών, σε αντίθεση με την περίπτωση των HR+ και HER2+ καρκίνων, κάνουν την χορήγηση αυτών των φαρμάκων μη αποτελεσματική στον υπότυπο αυτό, ενώ το πολύπλοκο και ιδιαίτερα ετερογενές μοριακό προφίλ του καθιστά πρόκληση την εύρεση φαρμακευτικών στόχων και θεραπευτικών μεθόδων. Συνεπώς, ευρείας χρήσεως χημειοθεραπευτικά, όπως η πακλιταξέλη, η σισπλατίνη και η δοξορουβικίνη, αποτελούν μονόδρομο στην αντιμετώπιση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Οι ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, με μεγάλο ποσοστό αυτών να εμφανίζει μεταστάσεις (Yin et al. 2020). Επιπλέον, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι, ενώ η αρχική απόκριση των ασθενών αυτών στην χημειοθεραπεία είναι θετική, στην πορεία ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών αναπτύσσει ανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταστάσεων, που οδηγούν στο θάνατο πολλούς από αυτούς (Echeverria et al. 2019).

Επομένως, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για βαθύτερη κατανόηση και μελέτη του υπότυπου αυτού και εύρεση νέων υποψήφιων φαρμακευτικών στόχων, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπειών.

1.5 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων (Hallmarks of Cancer)

Η συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα, η ανοχή σε μεγάλο βαθμό στις έως τώρα διαθέσιμες θεραπείες και η φύσει πολύπλοκη δομή του καρκίνου, δημιούργησαν τις τελευταίες δεκαετίες την ανάγκη για αδιάκοπη έρευνα και μελέτη της νόσου με σκοπό την όσο γίνεται βαθύτερη κατανόηση της. Κομβικό σημείο στην έρευνα αυτή αποτέλεσε η δημοσίευση ενός άρθρου επισκόπησης από τους Hanahan & Weinberg, στις αρχές του 21^{ου} αιώνα, όπου περιέγραψαν έξι βασικές ιδιότητες των καρκινικών

κυττάρων, οι οποίες αποκτώνται κατά την πορεία εξαλλαγής των φυσιολογικών κυττάρων και την ανάπτυξη ενός όγκου (Hanahan and Weinberg 2000). Οι ιδιότητες αυτές (Hallmarks of cancer) περιλάμβαναν την ικανότητα συνεχούς διατήρησης πολλαπλασιαστικών σημάτων, την αποφυγή της απόπτωσης, την ανοχή σε αντιαναπτυξιακά σήματα, τη διατήρηση της αγγειογένεσης, την ικανότητα εισβολής και μετάστασης και την διατήρηση συνεχούς αναπαραγωγικού δυναμικού (Hanahan and Weinberg 2000) (Εικόνα 1.3). Το 2011 προστέθηκαν στην λίστα αυτή δύο επιπλέον ιδιότητες (emerging hallmarks), η αποφυγή του ανοσοποιητικού και η τροποποιημένη μεταβολική λειτουργία, και δύο χαρακτηριστικά (enabling characteristics), η γενωμική αστάθεια και οι μεταλλάξεις και η ογκογόνος φλεγμονή, η ύπαρξη των οποίων προωθεί τη δημιουργία του όγκου και των προαναφερθέντων ιδιοτήτων του (Hanahan and Weinberg 2011) (Εικόνα 1.3). Τα στοιχεία αυτά αποτελούν ένα οργανωμένο σύνολο βιολογικών διαδικασιών που είναι πιθανό να εξαλλαγούν κατά την πορεία της καρκινογένεσης και να αποτελούν βάση για την περαιτέρω ανάπτυξη μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη και κατανόηση τους θα μπορούσαν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την διερεύνηση του ιδιαίτερου προφίλ των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπειών για την καταπολέμησή τους.



Εικόνα 1.3 Τα έξι κύρια χαρακτηριστικά (hallmarks) κατά την εξαλλαγή των κυττάρων σε καρκινικά (αριστερά), τα δύο επιπλέον στοιχεία (emerging hallmarks) και οι δύο ιδιότητες (enabling characteristics) που μεσολαβούν την καρκινογένεση. (Hanahan and Weinberg 2011).

1.6 Μηχανισμοί χημειοανθεκτικότητας καρκινικών κυττάρων

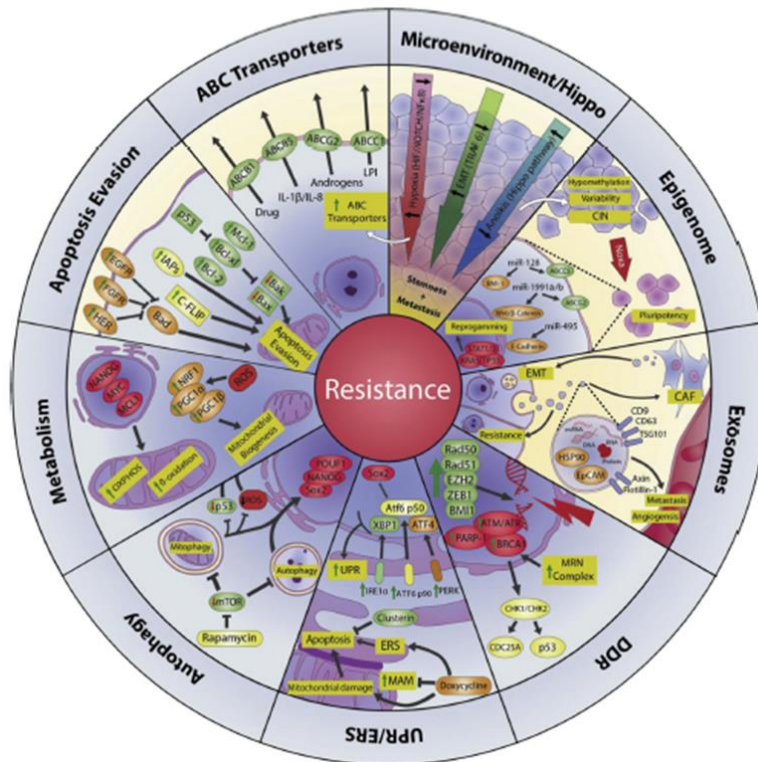
Η ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν τα καρκινικά κύτταρα έναντι των ευρέως χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών αλλά και της στοχευμένης θεραπείας αποτελεί το βασικό πρόβλημα για την αποτελεσματική καταπολέμηση της νόσου και εξαιτίας αυτού υπάρχει συνεχές ερευνητικό ενδιαφέρον εδώ και δεκαετίες. Η ανθεκτικότητα μπορεί να διαχωριστεί σε δύο τύπους, ανάλογα με το χρονικό διάστημα της εμφάνισής της. Η έμφυτη ή πρωτογενής ανθεκτικότητα (intrinsic resistance) αναφέρεται σε μία προϋπάρχουσα της θεραπείας κατάσταση, όπου τα καρκινικά κύτταρα είναι ήδη ανθεκτικά, προτού χορηγηθεί οποιοδήποτε θεραπευτικό μέσο, η οποία έχει ως συνέπεια την χαμηλή αποτελεσματικότητα του (Garcia-Mayea et al. 2020). Η δεύτερη περίπτωση, η επίκτητη ή δευτερογενής ανθεκτικότητα (acquired resistance), αναφέρεται στην ανθεκτικότητα που προκύπτει ως επακόλουθο της χορήγησης του χημειοθεραπευτικού μέσου και εκφράζεται ως σταδιακή μείωση της απόκρισης του ασθενούς στο φάρμακο.

Πέρα από τις κλινικές προεκτάσεις του φαινομένου, η επίκτητη ανθεκτικότητα έχει απασχολήσει και τους βασικούς ερευνητές, ως προς τον τρόπο και τους μηχανισμούς μέσω των οποίων εγκαθιδρύεται. Μελέτες υποστηρίζουν ότι, για την εμφάνιση χημειοανθεκτικότητας, ευθύνεται η παρουσία ενός προϋπάρχοντος υποπληθυσμού κυττάρων στον όγκο, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, που τους προσδίδουν πλεονέκτημα προσαρμογής και επιβίωσης υπό τις συνθήκες πίεσης που δημιουργεί η χορήγηση θεραπείας (Housman et al. 2014). Τα κύτταρα αυτά επιβιώνουν, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, αποκτούν στην πορεία επιπλέον χαρακτηριστικά, κυρίως μέσω γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, δημιουργώντας τελικά έναν χημειοανθεκτικό πληθυσμό (Bell and Gilan 2020). Για παράδειγμα μια μελέτη στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) ανέφερε την συνύπαρξη δύο υποπληθυσμών, ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στην θεραπεία και έδειξε πως, η επανεμφάνιση του όγκου μετά από την θεραπεία, είναι πιθανόν να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ύπαρξη του ανθεκτικού υποπληθυσμού (Parkin et al. 2013). Από την άλλη, αρκετές μελέτες προσεγγίζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας από άλλη σκοπιά. Σύμφωνα με αυτές, η πίεση που δέχονται τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του φαρμάκου, οδηγούν κάποια από αυτά στην προσαρμογή και την απόκτηση χαρακτηριστικών, που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν υπό τις υπάρχουσες συνθήκες (Bell and Gilan 2020). Τα κύτταρα αυτά, λόγω των χαρακτηριστικών τους, επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται προσδίδοντας στον όγκο χημειοανθεκτικότητα. Στο μελάνωμα, η χορήγηση αναστολέων για την μεταλλαγμένη μορφή του *BRAF*, φάνηκε να προκαλεί αλλαγές στα κύτταρα, οδηγώντας τα σε μία περισσότερο χημειοανθεκτική κατάσταση (Su et al. 2017).

Επιπλέον, οι δύο μορφές ανθεκτικότητας, πρωτογενής και επίκτητη, μπορούν να συνυπάρχουν, ενισχύοντας το χημειοανθεκτικό προφίλ του όγκου (Wang et al. 2019). Λόγω της ετερογένειας που υπάρχει μεταξύ των κυτταρικών υποπληθυσμών ενός όγκου, κάποιοι από αυτούς μπορεί να είναι ήδη ανθεκτικοί σε

θεραπείες, όπως στην περίπτωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, που περιγράφονται στη συνέχεια.

Ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών μηχανισμών, γενετικών και μη, φαίνεται να ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων (εικόνα 1.4) και θα περιγραφούν στην συνέχεια.



Εικόνα 1.4 Μηχανισμοί χημειοανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς με σκοπό να ανταπεξέλθουν στην χορηγούμενη θεραπεία. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν διάφορες βιολογικές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός, η επιδιόρθωση του DNA, η λειτουργία των επιφανειακών μορίων και η επικοινωνία με τον εξωκυττάριο χώρο (Y Garcia Mayea, 2019).

1.6.1 Γενετικές και επιγενετικές αλλαγές

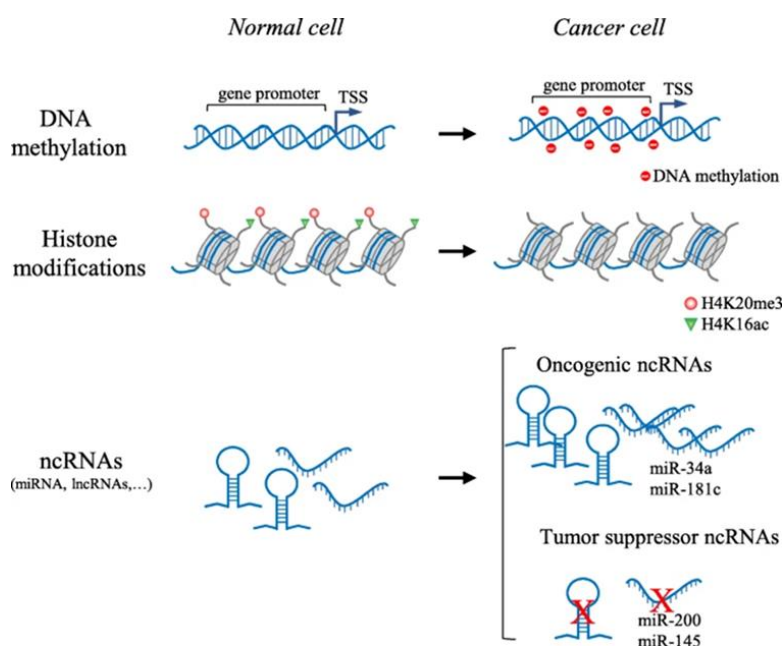
Η χρήση γνωστών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αποτελεί, όπως αναφέρθηκε, μια συχνά χρησιμοποιούμενη λύση σε διάφορους τύπους καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι, ενώ αρχικά η χορήγηση των φαρμάκων παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα για τον ασθενή, το αποτέλεσμα συχνά δεν είναι μακροχρόνιο με συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των χορηγούμενων φαρμάκων και την επανεμφάνιση της νόσου (Chun and Et.al. 2017). Η παρουσία επίκτητης ανθεκτικότητας στον καρκίνο, παρομοιάζεται συχνά με την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά και τους αντίστοιχους μηχανισμούς που την διέπουν (Housman et al. 2014). Στην περίπτωση του

καρκίνου, η παρουσία φαρμάκου αποτελεί την κινητήριου δύναμη για την ανάπτυξη μηχανισμών επιβίωσης έναντι αυτού από κάποια κύτταρα του όγκου. Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται κυρίως μέσω γενετικών και επιγενετικών μεταλλαγών. Αυτές οι αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση μιας πληθώρας παραγόντων και κυτταρικών μηχανισμών, με τέτοιο τρόπο, ώστε τα κύτταρα να είναι ικανά να διαφεύγουν της θεραπείας (Housman et al. 2014). Σε γενετικό επίπεδο, οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να εκδηλωθούν, είτε μέσω απώλειας έκφρασης, είτε ενίσχυσης, ή και τροποποίησης της αλληλουχίας κάποιου γονιδίου, προκαλώντας επακόλουθες αλλαγές σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως σηματοδοτικά μονοπάτια, βιοχημικές διαδικασίες και έκφραση μορίων επιφανείας (Bukowski et al. 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η μετάλλαξη του γονιδίου *Tp53*, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, προστάτη της γενωμικής σταθερότητας και ομοιόστασης του κυττάρου, η απώλεια της λειτουργίας του οποίου είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη του όγκου (Mantovani, Collavin, and Del Sal 2019).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αναφέρονται σε κληρονομήσιμες αλλαγές, που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, χωρίς όμως να παρεμβαίνουν στην αλληλουχία του DNA. Σε αυτές περιλαμβάνονται η μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, που προκαλούν αναδιοργάνωση της χρωματίνης (chromatin remodeling), καθώς και τα μη-κωδικά RNA (non-coding RNAs) (Weinhold 2006).

Η μεθυλίωση του DNA ήταν μία από τις πρώτες επιγενετικές τροποποιήσεις που ανακαλύφθηκαν και συνδέεται με την αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης (Feinberg and Vogelstein 1983). Όταν εντοπίζεται σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων πλούσιες στο δινουκλεοτίδιο γουανίνης-κυτοσίνης (CpG islands), παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τους (Virani et al. 2012). Σε γενικές γραμμές στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται μία συνολική τάση υπομεθυλίωσης του DNA, που οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και σε έκφραση ογκογονιδίων και αυξημένης μεθυλίωσης, κυρίως σε περιοχές υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση τους (Feinberg 2013). Ένα συχνά παρατηρούμενο φαινόμενο, είναι η απομεθυλίωση του γονιδίου της πρωτεΐνης MDR1, μίας αντλίας εκροής φαρμάκων, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφρασή της (Mansoori et al. 2017). Οι τροποποιήσεις των ιστονών περιλαμβάνουν πιο πολύπλοκες διαδικασίες και διαφέρουν ανάλογα με την χημική ομάδα που προστίθεται, την ιστόνη ή το κατάλοιπο στο οποίο πραγματοποιείται η τροποποίηση (Esteller 2008). Επιπλέον, το αποτέλεσμα της τροποποίησης των ιστονών δεν είναι πάντα το ίδιο, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από το είδος της τροποποίησης, την ιστόνη και τη θέση στην οποία γίνεται (Mack 2006). Τα ένζυμα τα οποία ευθύνονται για αυτές τις τροποποιήσεις εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στην έκφραση τους στα καρκινικά κύτταρα, συγκριτικά με τα φυσιολογικά αλλάζοντας και το επιγενετικό τοπίο των καρκινικών κυττάρων (Bennett and Licht 2018). Από τις καλύτερα μελετημένες τροποποιήσεις ιστονών είναι η μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4), η οποία συναντάται συχνά στους υποκινητές ενεργών γονιδίων (Zheng et al. 2019). Η απομεθυλίωση της πραγματοποιείται από την απομεθυλάση KDM5B, αυξημένη έκφραση της οποίας έχει συνδεθεί, μεταξύ άλλων, και με αυξημένη χημειοανθεκτικότητα (Plch, Hrabeta, and Eckschlager 2019). Πιο συγκεκριμένα,

μελέτη κυτταρικής σειράς καρκίνου στομάχου ανθεκτικής στη σισπλατίνη έδειξε αυξημένα επίπεδα του KDM5B, που οδήγησαν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου XRCC1, παράγοντα της επιδιόρθωσης του DNA, ενισχύοντας τη χημειοανθεκτικότητα της σειράς (Χυ et al. 2018). Σε μια άλλη μελέτη σε ανθεκτικές κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, έχουν συνδέσει την ανθεκτικότητα υποπληθυσμών στην καρβοπλατίνη (carboplatin) με την αυξημένη έκφραση της απομεθυλάση KDM5A (Sharma 2010).



Εικόνα 1.5 Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί. Οι διαφορές στα επίπεδα και στις θέσεις μεθυλίωσης του DNA, αλλαγές στις τροποποιήσεις των ιστονών και στα μη-κωδικά RNA σε σχέση με τα υγιή κύτταρα αποτελούν χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλουν και στην απόκτηση χημειοανθεκτικότητας. Roberti A., 2019.

Τόσο οι γενετικές όσο και οι επιγενετικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα επηρεάζουν κυτταρικούς μηχανισμούς, όπως η επιδιόρθωση του DNA και ο κυτταρικός κύκλος, ο κυτταρικός μεταβολισμός, η ενδοκυτταρική σηματοδότηση και η επικοινωνία κυττάρου-περιβάλλοντος, δρώντας καταλυτικά στην απόκτηση χημειοανθεκτικών χαρακτηριστικών από ένα υποσύνολο κυττάρων του όγκου και τελικά στην ανάπτυξη του ακόμα και παρουσία φαρμάκων (Housman et al. 2014).

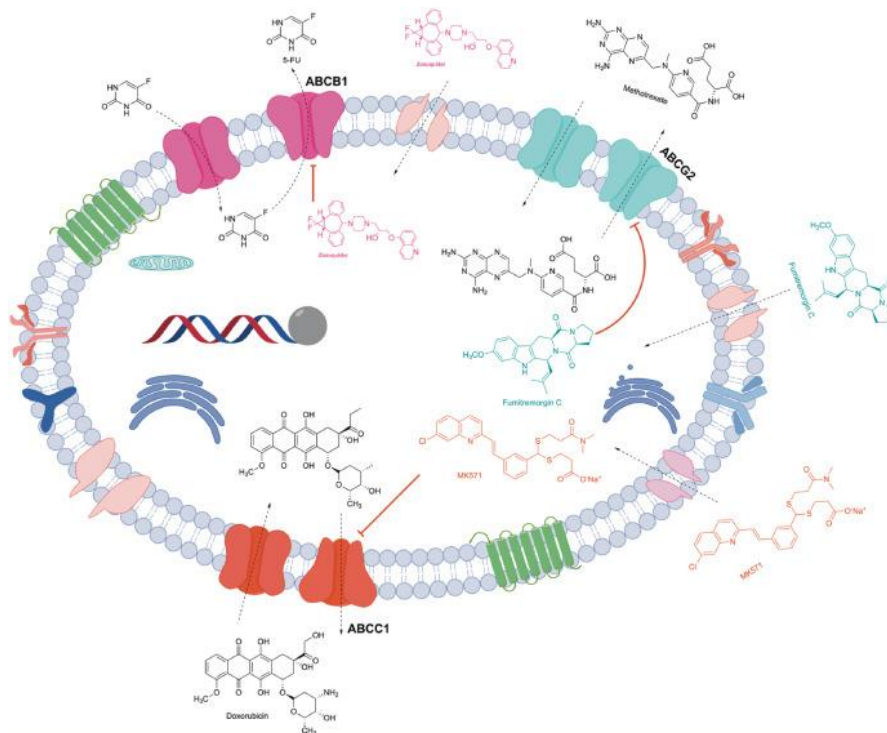
1.6.2 Αλλαγή φαρμακευτικού στόχου

Όπως έχει αναφερθεί ξανά, εκτός από τα γενικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, συνήθως είναι και η χρήση στοχευμένης θεραπείας στις περιπτώσεις που αυτό είναι εφικτό. Τα μόρια-στόχοι αυτών των φαρμάκων περιλαμβάνουν κυτταρικούς υποδοχείς, σηματοδοτικά μόρια, καθώς και ένζυμα του κυττάρου,

κάνοντας έτσι την θεραπεία πιο στοχευμένη και επιλεκτική. Στην περίπτωση αυτή, όμως, το πρόβλημα που προκύπτει είναι ότι τα κύτταρα καταφέρνουν να διαφεύγουν της θεραπείας, αλλάζοντας τον στόχο του φαρμάκου τόσο μέσω γενετικών όσο και επιγενετικών αλλαγών (Wang et al. 2019). Χαρακτηριστικό παράδειγμα το φάρμακο δοξορουβικίνη (Doxorubicin), που χρησιμοποιείται σε διάφορους συμπαγείς όγκους, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του μαστού. Η δοξορουβικίνη ανήκει στην οικογένεια των ανθρακυκλινών και δρα αναστέλλοντας την τοποϊσομεράση II. Σε αρκετές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της τοποϊσομεράσης II, που οδηγούν στην απόκτηση ανθεκτικότητας έναντι της δοξορουβικίνης (Mansoori et al. 2017).

1.6.3 Εκροή φαρμάκου

Η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου, ειδικότερα αυτών που στοχεύουν ενδοκυτταρικά μόρια, εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωσή του στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταφορά του φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους, παθητική διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση και ενεργητική μεταφορά, ανάλογα με το είδος του χημικού μορίου (Assaraf et al. 2019). Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μέσω των οποίων παρεμποδίζουν την είσοδο του φαρμάκου ή το απομακρύνουν από τον ενδοκυττάριο χώρο. Οι σχετικές υποθέσεις για τον μηχανισμό αυτό προτείνουν είτε ότι υπάρχει κάποιος φραγμός στην μεμβράνη, που δεν την κάνει διαπερατή στο φάρμακο, είτε κάποιος μεταφορέας, που μεσολαβεί την είσοδο του φαρμάκου, είναι μειο-ρυθμισμένος, ή το φάρμακο απομακρύνεται από το κύτταρο γρήγορα μέσω ενεργητικής μεταφοράς από τους μεταφορείς της οικογένειας ABC (ATP-binding cassette transporters) (Ramu et al. 1989) (Assaraf and Schimke 1987). Πραγματικά, μελέτη της μεμβράνης ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων έδειξε διαφορές στη σύσταση διαφόρων λιπιδίων (χοληστερόλη, λιπαρά οξέα, φωσfolιπίδια), γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάζει την διαπερατότητα, την ρευστότητα και την ευελιξία την μεμβράνης, ενισχύοντας την χημειοανθεκτικότητα των κυττάρων (Kordias et al. 2022). Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί και στην διαδικασία εκροής του φαρμάκου από το κύτταρο, με την οικογένεια των μεταφορέων ABC να κατέχει κεντρικό ρόλο στην διαδικασία αυτή. Βασικός τους ρόλος είναι η προστασία και αποτοξίνωση του κυττάρου και η μεταφορά του υποστρώματος μέσω της ενέργειας από την υδρόλυση του ATP (ενεργητική μεταφορά) (Ji et al 2019). Αρκετοί μεταφορείς της οικογένειας αυτής φαίνεται να υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και του μαστού, και να συμβάλλουν ενεργά στη χημειοανθεκτικότητά τους (Zahreddine and Borden 2013). Στον άνθρωπο υπάρχουν 48 μέλη, τα οποία χωρίζονται σε υποομάδες (ABCA-ABCG). Η ικανότητά τους να μεσολαβούν για τη μεταφορά μίας ποικιλίας υποστρωμάτων κάνει τους μεταφορείς αυτούς βασικούς παράγοντες της χημειοανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων σε πολλαπλά φάρμακα (Multidrug resistance, MDR) (Wang et al. 2019).

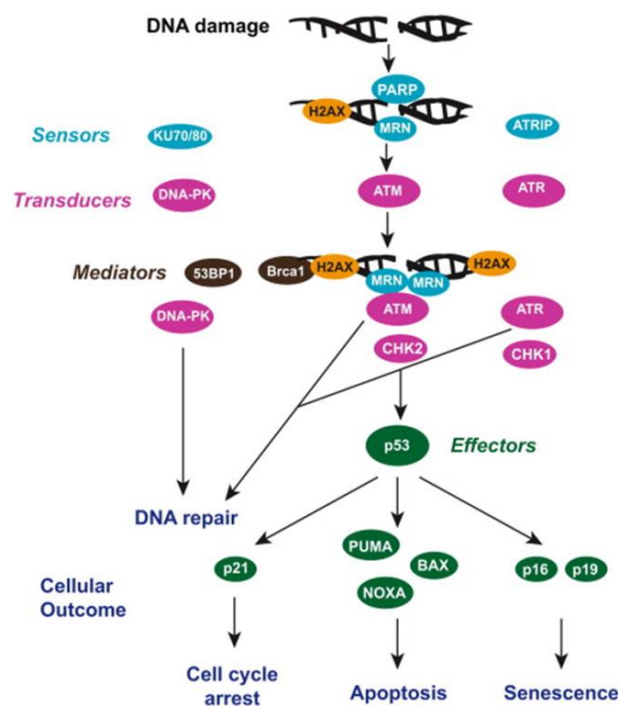


Εικόνα 1.6 Ο ρόλος των αντλιών στην χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων. Οι αντλίες ABCB1, ABCG2 ABCB1 της οικογένειας των ABC διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην χημειοανθεκτικότητα απομακρύνοντας μια πληθώρα διαφορετικών φαρμάκων από τα καρκινικά κύτταρα (E. Kritika et al., 2022).

1.6.4 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA (DNA Damage Repair, DDR)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένα κύτταρο, στο οποίο κατά την διαδικασία του πολλαπλασιασμού του DNA δημιουργείται κάποια βλάβη, όπως η τοποθέτηση ενός λάθος νουκλεοτιδίου, διαθέτει ειδικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, που ενεργοποιούνται ανάλογα με το είδος της βλάβης και διορθώνουν το πρόβλημα, ώστε να διατηρηθεί η γενωμική σταθερότητα και να συνεχιστεί η φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση που η βλάβη αυτή δεν είναι δυνατόν να διορθωθεί, το κύτταρο οδηγείται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Assaraf et al. 2019). Αρκετά αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η 5-φθοροουρακίλη (5-fluorouracil), εκμεταλλεύονται το μηχανισμό αυτό, προκαλώντας πολλαπλές βλάβες στο DNA των καρκινικών κυττάρων και οδηγώντας τα με τον τρόπο αυτό σε κυτταρικό θάνατο (Ji et al 2019). Όπως έχει αναφερθεί και από τους Hanahan & Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011), κάρδιο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητα τους να επιδιορθώνουν τις βλάβες στο DNA τους (DNA Damage Repair, DDR). Ιδιαίτερα στην περίπτωση των χημειοανθεκτικών κυττάρων, παρατηρείται αυξημένος ρυθμός επιδιόρθωσης του DNA και εντοπίζονται εξαιρετικά ενεργά τα μονοπάτια επιδιόρθωσης (Ji et al 2019). Παραδείγματος χάριν, η πρωτεΐνη ATM, μία κινάση, κατέχει βασικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA, κυρίως εντοπίζοντας και επιδιορθώνοντας θραύσεις δίκλωνου DNA (Garcia-Mayea et al. 2020). Η πρωτεΐνη

αυτή, όπως και άλλοι παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά κατά την διαδικασία της επιδιόρθωσης, εμφανίζεται συνεχώς ενεργή στα χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα (Min et al. 2013). Αντίστοιχα ενεργοί έχουν εντοπιστεί και άλλοι παράγοντες επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου, συνήθως εξαιτίας γονιδιακών μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα τα ανθεκτικά κύτταρα να είναι ικανά να επιδιορθώνουν τις βλάβες που δημιουργούνται από τα αντικαρκινικά φάρμακα και να διαφεύγουν της θεραπείας (De Angelis et al. 2006). Επιπρόσθετα, η αυξημένη λειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών μπορεί να αποτελέσει την βάση για την δημιουργία νέων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων, λόγω ύπαρξης γενωμικής αστάθειας, ενεργοποιώντας νέους μηχανισμούς καρκινογένεσης (Wang et al. 2019).

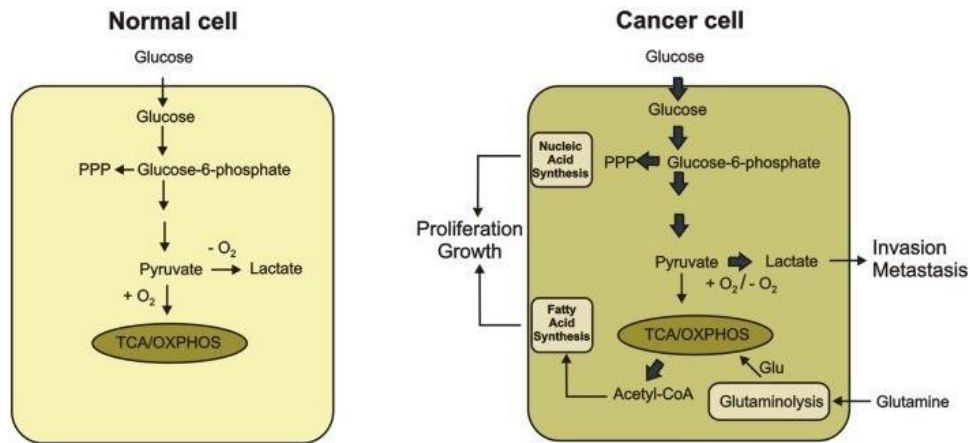


Εικόνα 1.7 Κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA. Ένα πολύπλοκο δίκτυο ανίχνευσης και επιδιόρθωσης λαθών στην αλληλουχία του DNA προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την δράση διαφόρων θεραπευτικών φαρμάκων (Blainpain et al. 2011).

1.6.5 Μεταβολικά μονοπάτια και μεταβολισμός Ξενοβιοτικών

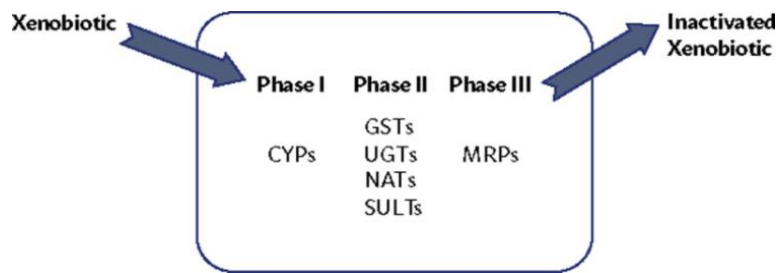
Όλες οι κυτταρικές διαδικασίες, μεταξύ αυτών και ο πολλαπλασιασμός και η κυτταρική διαίρεση, βασίζονται στην ενεργειακή τροφοδότηση του κυττάρου από το μεταβολικό του σύστημα (Pecqueur et al. 2013). Ο Otto Warburg, στα μέσα του προηγούμενου αιώνα, ήταν από τους πρώτους που μελέτησαν διεξοδικά το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Παρατήρησε, λοιπόν, ότι τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ιδιαίτερα μεταβολικά μονοπάτια, διαφορετικά από τα υγιή κύτταρα, με βασικό χαρακτηριστικό τους αυξημένους ρυθμούς αερόβιας

γλυκόλυσης (O. Warburg 1956). Για να γίνουν, όμως, κατανοητές οι αλλαγές που συμβαίνουν στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, πρέπει να γίνει μια συνοπτική περιγραφή των φυσιολογικών μεταβολικών μηχανισμών. Η γλυκόλυση, ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA) ή αλλιώς κύκλος του Krebs και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) αποτελούν τις κύριες μεταβολικές πορείες ενός φυσιολογικού κυττάρου, μέσω των οποίων παράγεται ενέργεια με την μορφή του χημικού μορίου ATP, αλλά και δομικά μόρια των κυττάρων όπως λιπίδια, νουκλεοτίδια και αμινοξέα (Pecqueur et al. 2013). Η γλυκόλυση είναι μία διαδικασία που πραγματοποιείται απουσία οξυγόνου, ενώ αντίθετα η οξειδωτική φωσφορυλίωση και ο κύκλος του κιτρικού οξέος απαιτούν την παρουσία οξυγόνου (Gatenby and Gillies 2004). Οι πορείες αυτές ρυθμίζονται αυστηρά και σε πολλά στάδια, ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις και την συγκέντρωση του οξυγόνου στο κύτταρο. Τα καρκινικά κύτταρα, λόγω του συνεχούς και ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους, έχουν πολύ μεγαλύτερες απαιτήσεις σε ενέργεια και δομικά συστατικά από ότι τα φυσιολογικά κύτταρα. Παρατηρείται, λοιπόν, στα κύτταρα αυτά μία ιδιαίτερη συνθήκη, οπου η μεγάλη πρόσληψη γλυκόζης ακολουθείται από την διάσπασή της στο κυτταρόπλασμα, και όχι στα μιτοχόνδρια, και την παραγωγή γαλακτικού οξέος και δομικών στοιχείων, πάρα την παρουσία οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό, που ονομάζεται αερόβια γλυκόλυση, περιγράφηκε από τον Otto Warburg και για τον λόγο αυτό είναι γνωστό ως το '*φαινόμενο Warburg*' (O. Warburg 1956). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι, ενώ η γλυκολυτική πορεία στο κυτταρόπλασμα παράγει πολύ λιγότερες μονάδες ενέργειας συγκριτικά με την αναερόβια γλυκόλυση των μιτοχονδρίων προτιμάται και αποτελεί την βασική επιλογή των καρκινικών κυττάρων λόγω της ταχύτητάς της. Παρά την ύπαρξη της αερόβιας γλυκόλυσης, τα καρκινικά κύτταρα, συνήθως, συνεχίζουν να διατηρούν και την αναερόβια διαδικασία παραγωγής ενέργειας σε φυσιολογικά επίπεδα (Cairns, Harris, and Mak 2011). Επιπλέον, γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν αυτές τις μεταβολικές πορείες, εντοπίζονται απορρυθμισμένα στα καρκινικά κύτταρα, κυρίως λόγω μεταλλάξεων, όπως για παράδειγμα το χαρακτηριστικό μονοπάτι PI3K (Wong, Engelman, and Cantley 2009). Επομένως, είναι εμφανές ότι τα καρκινικά κύτταρα διαμορφώνουν τις μεταβολικές πορείες τους με τέτοιο τρόπο, ώστε να καλύπτουν όσο το δυνατόν ταχύτερα και αποτελεσματικότερα τις ενεργειακές τους ανάγκες.



Εικόνα 1.8 Μεταβολισμός φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα (δεξιά) προτιμούν να καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης, γνωστό και ως φαινόμενο Warburg (Józwiak et al. 2014).

Μια ακόμα παράμετρος του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων είναι αυτή των μονοπατιών αποτοξίνωσής τους. Η επαφή του κυττάρου με μόρια, τα οποία είναι τοξικά για το ίδιο, ενεργοποιεί μεταβολικά μονοπάτια, που το προστατεύουν. Το ίδιο ισχύει και στη περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, όπου η χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ενεργοποιεί μηχανισμούς αποτοξίνωσης. Η οικογένεια των ενζύμων του κυτοχρώματος (CYP) αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα. Διάφορα μέλη της οικογένειας αυτής φαίνεται να υπερεκφράζονται σε πολλούς τύπους καρκίνου και δρουν μεταβολίζοντας μια ευρεία γκάμα φαρμάκων, μεταξύ αυτών και πολλά γνωστά αντικαρκινικά, σε μία ανενεργή μορφή κάνοντας τα έτσι μη αποτελεσματικά (Pathania et al. 2018). Παρόμοιο ρόλο φαίνεται να έχουν και τα ένζυμα της ομάδας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase, GSTs). Τα ένζυμα αυτά παρέχουν προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες και συνεισφέρουν στην χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων, είτε απενεργοποιώντας τα φαρμακευτικά μόρια είτε αναστέλλοντας το μονοπάτι των MAP κινασών (Townsend and Tew 2003). Το μονοπάτι των MAP κινασών, είναι μια σηματοδοτική πορεία ιδιαίτερης σημασίας για τα κύτταρα, διότι μεταφέρει πληροφορίες από επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς στον πυρήνα μεσολαβώντας διαδικασίες όπως η κυτταρική επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος (McCubrey et al. 2007). Τέλος, αρκετά φάρμακα εισέρχονται σε μία πρώιμη ανενεργή μορφή στο κύτταρο και στην συνέχεια αποκτούν την ενεργό τους μορφή, μετά από επεξεργασία από το μεταβολικό σύστημα του ίδιου του κυττάρου. Πολλές φορές τα καρκινικά κύτταρα παρεμβαίνουν στις διαδικασίες αυτές, μη επιτρέποντας στα φάρμακα να αποκτήσουν την ενεργό τους μορφή (Bardenheuer et al. 2005).

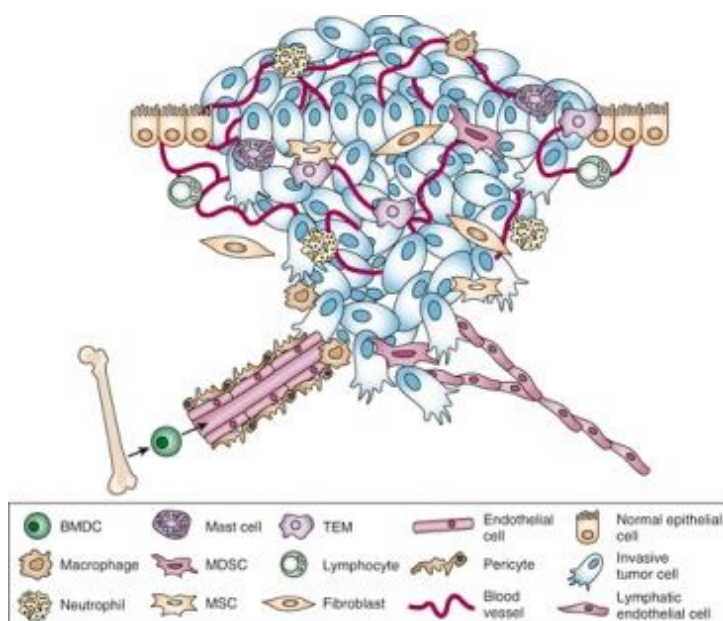


Εικόνα 1.9 Μεταβολικά ένζυμα και μεταβολισμός Ξενοβιοτικών. Διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία αποτοξίνωσης των κυττάρων, δρουν στα καρκινικά κύτταρα απενεργοποιώντας διαφόρων ειδών χημικοθεραπευτικές ουσίες (Silva M., 2017).

1.6.6 Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor microenvironment, TME)

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor microenvironment, TME) αποτελεί ένα πολύπλοκο και δυναμικό σύνολο κυτταρικών και μη στοιχείων, τα οποία αλληλεπιδρούν τόσο με τα κύτταρα του όγκου όσο και μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα πολυσύνθετο σύστημα το οποίο συμβάλλει στην ετερογένεια και στην χημειοανθεκτικότητα του όγκου. Ενδεικτικά, περιλαμβάνει κύτταρα όπως ενδοθηλιακά, ινοβλάστες (Cancer associated fibroblasts, CAFs) και κύτταρα του ανοσοποιητικού, αλλά και συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular matrix, ECM), όπως διαφόρων ειδών πρωτεΐνες και χημικά μόρια (Assaraf et al. 2019). Η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τους παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος είναι κομβικής σημασίας για την εξέλιξη και διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του όγκου. Έχει δειχθεί ότι μετά από χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων η σύσταση του μικροπεριβάλλοντος μεταβάλλεται κατά τέτοιο τρόπο που να διευκολύνει την προσαρμογή του όγκου και να ενεργοποιεί παράγοντες χημειοανθεκτικότητας (Bukowski et al. 2020). Παραδείγματος χάριν, μέσω αντλιών στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων δημιουργείται μια διαβάθμιση του pH μεταξύ του ενδοκυττάριου χώρου και του μικροπεριβάλλοντος, η οποία ενισχύει το χημειοανθεκτικό προφίλ του όγκου (Wang et al. 2019). Ιδιαίτερα σημαντικός στην επικοινωνία όγκου-μικροπεριβάλλοντος φαίνεται να είναι ο ρόλος των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα, κυστίδια προερχόμενα από τα κύτταρα, φέρουν διαφόρων ειδών παράγοντες, όπως μόρια DNA, RNA αλλά και πρωτεΐνες, από και προς τα κύτταρα του όγκου διευκολύνοντας την επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων με το περιβάλλον τους και ενισχύοντας την χημειοανθεκτικότητά τους (García-Mayea et al. 2020). Μετά από την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος φαίνεται να ενεργοποιούνται στα καρκινικά κύτταρα καθοδικά μονοπάτια, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT, ή μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι Twist και Snail, που ενεργοποιούν αντίστοιχους μηχανισμούς χημειοανθεκτικότητας (Batlle and Clevers 2017). Μία διαδικασία που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το μικροπεριβάλλον είναι η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial-Mesenchymal transition, EMT). Κατά την διαδικασία αυτή επιθηλιακά κύτταρα μετά από επίδραση του περιβάλλοντος μεταβάλλονται σε έναν πιο αδιαφοροποίητο μεσεγχυματικό τύπο και με τον τρόπο αυτό είναι ικανά να μεταναστεύσουν και να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς (Batlle and Clevers 2017). Φαίνεται, επομένως, ότι

ο όγκος δεν αποτελεί ένα σύνολο κυττάρων ανεξάρτητο και διαχωρισμένο από το περιβάλλον του, αλλά αντίθετα το περιβάλλον καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Λόγω της σημασίας που φαίνεται να έχει το μικροπεριβάλλον και του καθοριστικού ρόλου του στην ενίσχυση της χημειοανθεκτικότητας του όγκου, αρκετές μελέτες στρέφονται στην εύρεση χημειοθεραπευτικών στόχων σε παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στις θεραπείες (Wang et al. 2019).



Εικόνα 1.10 Το μικροπεριβάλλον του όγκου περιλαμβάνει κυτταρικά και μη συστατικά τα οποία αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του όγκου ενεργοποιώντας κομβικές βιολογικές διαδικασίες (oncohemakey.com).

1.6.7 Καρκινικά βλαστικά κύτταρα, KBK (Cancer Stem Cells, CSCs)

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (KBK) αποτελούν έναν υποπληθυσμό του όγκου με ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης προς τα υπόλοιπα κύτταρα του όγκου, αυξημένης ανθεκτικότητας σε συμβατικές θεραπείες, καθώς κι επαγωγής και προώθησης της καρκινογένεσης (Rich 2016). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν κι άλλα στοιχεία, όπως αυξημένη μεταστατική ικανότητα, αποφυγή της απόπτωσης και προαγωγής της αγγειογένεσης (Bao et al. 2013). Επιπλέον, αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, όπως τα Notch και Hedgehog, βρίσκονται ενεργοποιημένα και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Ji et al 2019). Στην περίπτωση, όμως, των καρκινικών βλαστικών κυττάρων τα μονοπάτια αυτά συχνά εμφανίζουν γενετικές ή/και επιγενετικές αλλαγές, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση και την ανεξέλεγκτη λειτουργία τους.

Η ύπαρξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων έχει περιγραφεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του προστάτη και του αίματος (Korkaya, Liu, and Wicha 2011). Η πρώτη αναφορά έγινε σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), το 1997, από τους Bonnet και Dick. Απομόνωσαν και περιέγραψαν έναν πληθυσμό κυττάρων ικανό να επάγει την νόσο μετά από έγχυση σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια και χαρακτήρισαν τον πληθυσμό αυτό από την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD34 και CD38 με φαινότυπο CD34⁺/CD38⁻ (Bonnet and Dick 1997). Η χρήση μορίων-δεικτών επιφανείας έκανε την διαδικασία της απομόνωσής και του χαρακτηρισμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνου εφικτή. Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες ESA, CD44, CD24, και ο φαινότυπος των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού χαρακτηρίστηκε από τον συνδυασμό ESA⁺CD44⁺/CD24^{-/low} (Al-Hajj et al. 2003). Ένας πιο πρόσφατα αναγνωρισμένος δείκτης είναι η αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH), ένα ένζυμο που συμμετέχει στην οξειδωση των ενδοκυττάρων αλδεϋδών, ενώ καταλύει και την οξειδωση της ρετινόλης σε ρετινοϊκό οξύ, κατά τα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων (ALDH1) (Balicki 2007). Επιπλέον, χάρη στην οξειδωτική του δραστηριότητα, ανήκει στην κατηγορία ενζύμων αποτοξίνωσης των κυττάρων, συμμετέχοντας στους μηχανισμούς χημειοανθεκτικότητας, ενώ η αυξημένη έκφρασή του στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με κακή πρόγνωση της νόσου (Chuthapisith et al. 2010).

Μελέτες έχουν δείξει εμπλουτισμό της υπολειπόμενης νόσου σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, μετά από την χορήγηση θεραπείας, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο υποπληθυσμός αυτός είναι ανθεκτικός σε θεραπείες και θα μπορούσε να ευθύνεται για την ικανότητα ανάκαμψης του όγκου (Saygin et al. 2019). Αρκετοί μηχανισμοί χημειοανθεκτικότητας που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως οι αντλίες εκροής φαρμάκου, ο μεταβολισμός, η επιδιόρθωση του DNA και η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του όγκου, εντοπίζονται ιδιαίτερα ενεργοί στον υποπληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Abdullah and Chow 2013). Παραδείγματος χάριν, μελέτες σε κλινικά δείγματα νευροβλαστώματος και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, έδειξαν υπερέκφραση των αντλιών ABCG2 και ABCA3, συνοδευόμενη από αυξημένη εκροή αντιμιτωτικών φαρμάκων στον υποπληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Hirschmann-Jax et al. 2004). Επιπλέον, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν αλλαγές στη ρύθμιση του κυτταρικού τους κύκλου, κυρίως, μέσω αλλαγών στην έκφραση κυκλινών και των αντίστοιχων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin depended kinases, CDKs) (Caglar and Biray Ancı 2020). Ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CD44⁺/CD24^{-/low}), που απομονώθηκαν από διαφορετικές σειρές καρκίνου του μαστού, έδειξε σημαντικά αυξημένη έκφραση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (RB1, CDKN1A), όπως και μειωμένη έκφραση αντι-αποπτωτικών παραγόντων (BCL2) (Dogan et al. 2015). Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε έναν πιο αργό κυτταρικό κύκλο στα βλαστικά κύτταρα και την υιοθέτηση μιας κατάστασης ηρεμίας (quiescence), αποφεύγοντας τη δράση γνωστών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Συνδυασμός των μηχανισμών αυτών με αυξημένη ενεργότητα βλαστικού τύπου μονοπατιών (Wnt, Notch και Hedgehog), στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα, συντελούν στην δημιουργία ενός ιδιαίτερα περίπλοκου και επιθετικού

φαινοτύπου, που καθοδηγεί την καρκινογένεση και προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των χορηγούμενων θεραπειών (Abdullah and Chow 2013). Για τους λόγους αυτούς, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολλά υποσχόμενους στόχους για την αποτελεσματική στόχευση και την εξάλειψη της νόσου.

1.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο-στόχευση των μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας

Είναι εμφανές ότι η χημειοανθεκτικότητα του καρκίνου είναι ένα πολύπλοκο ζήτημα, που εξαρτάται από διαφορετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι σε συνδυασμό, αλλά και μεμονωμένα, δημιουργούν ένα ιδιαίτερο προφίλ στα ανθεκτικά κύτταρα. Η συμβατική χημειοθεραπεία δρα κυτταροτοξικά, στοχεύοντας κυρίως τον πολλαπλασιασμό των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων (Ferraro et al. 2020). Όπως έχει αναφερθεί, όμως, η αποτελεσματικότητά της είναι μειωμένη, ιδιαίτερα σε υπότυπους όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και την επανεμφάνιση του όγκου (Dent et al. 2007). Υπάρχει, επομένως, επιτακτική ανάγκη για επαναπροσδιορισμό των θεραπευτικών μέσων και εύρεση νέων στόχων. Οι μηχανισμοί χημειοανθεκτικότητας που προαναφέρθηκαν και οι μοριακοί παράγοντες που τους απαρτίζουν, φαίνεται ότι αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους. Η εξάλειψη των ανθεκτικών κυττάρων του όγκου, μέσω της φαρμακευτικής στόχευσης αυτών των μηχανισμών, σε συνδυασμό με συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, θα μπορούσε να παρουσιάσει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της νόσου. Παραδείγματα φαρμάκων έναντι ορισμένων χημειοανθεκτικών μηχανισμών παρουσιάζονται στην συνέχεια.

Μία συχνά χρησιμοποιούμενη ομάδα φαρμάκων είναι οι αναστολείς PARP (Poly (ADP-ribose) polymerases) όπως το Olaparib. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και πολλαπλασιασμού των κυττάρων, επομένως, η αναστολή τους οδηγεί σε μειωμένη επιδιόρθωση και κυτταρικό θάνατο. Συνήθης είναι η χρήση του σε καρκίνο του μαστού με μεταλλάξεις του BRCA1 (Gonzalez-Angulo et al. 2008). Επιπλέον, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σημαντικός είναι και ο ρόλος των τοποϊσομερασών και συγκεκριμένα της τοποϊσομεράσης II (Topo-II), οι οποίες αποτελούν στόχους αρκετών αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως οι ανθρακυκλίνες, που σχηματίζοντας σύμπλοκο με την πρωτεΐνη, προωθούν την δημιουργία δίκλωνων θραύσεων στο DNA παρεμποδίζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Wang et al. 2017). Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια καθορίζουν την εξέλιξη της νόσου ελέγχοντας διάφορους μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων. Η κινάση MEK1/2 αποτελεί βασικό παράγοντα του μονοπατιού των MAP κινασών (MAPK) και η στόχευση της μέσω του αναστολέα selumetinib έχει δείξει αισιόδοξα αποτελέσματα και στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, ενώ ερευνάται και η συνδυαστική του δράση με γνωστά χημειοθεραπευτικά (Bianchini et al. 2022). Επίσης, η στόχευση παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος, όπως της πρωτεΐνης MCP-1, μιας χημειοκίνης που ελέγχει τις μεταστατικές και διηθητικές ικανότητες των μακροφάγων (Tumor associated

macrophage, TAMs), μέσω χορήγησης του Bindarit, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της μεταστατικής ικανότητας, του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων τόσο στον καρκίνο του μαστού, όσο και του προστάτη (Zollo et al. 2012). Αντίστοιχα και η στόχευση αντλιών στην κυτταρική μεμβράνη, όπως η αναστολή της λειτουργίας της αντλίας ABCB1 από τα φάρμακα Gefitinib και Vandetanib, παρεμποδίζει την ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας έναντι διαφόρων φαρμάκων και δείχνει θετικά αποτελέσματα με κλινικό ενδιαφέρον (Azzariti et al. 2010). Επίσης, τα επιγενετικά ένζυμα συμπεριλαμβάνονται στους φαρμακευτικούς στόχους ενδιαφέροντος. Η στόχευση επιγενετικών ενζύμων έχει βρει κυρίως εφαρμογή σε 2 μεγάλες οικογένειες ενζύμων, τους αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών (iDNMTs), και τους αναστολείς απακετυλασών των ιστονών (iHDACs). Η 5-αζακυτιδίνη (5-azacitidine), ο πιο γνωστός αναστολέας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (Kaminskas et al. 2005) και τα Vorinostat και Belinostat ως αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών (Goey et al. 2016), δείχνουν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα κυρίως σε αιματολογικούς καρκίνους. Τα επιγενετικά ένζυμα ελέγχουν την έκφραση παραγόντων που συμμετέχουν σε κομβικούς μηχανισμούς της χημειοανθεκτικότητας, συνεπώς ο συνδυασμός τυπικών χημειοθεραπευτικών με επιγενετικά φάρμακα βελτιστοποιεί τις συνθήκες και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Bukowski et al. 2020). Τέλος, η αναστολή ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό και την αδρανοποίηση των φαρμακευτικών ενώσεων, μπορεί να βελτιστοποιήσει την αποτελεσματικότητα ποικιλίας αντικαρκινικών φαρμάκων αυξάνοντας την ευαισθησία των κυττάρων του όγκου. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση εκλεκτικών αναστολέων για το μεταβολικό ένζυμο UGT1A με προοπτικές εφαρμογής στην κλινική πράξη (Osborne et al. 2019).

1.8 Σκοπός εργασίας

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (ΤΑΚΜ) αποτελεί μια από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού, με ιδιαίτερα επιθετικό προφίλ και υψηλά ποσοστά μεταστάσεων. Η απουσία χαρακτηριστικών επιφανειακών υποδοχέων και η υψηλή ετερογένεια του υπότυπου αυτού περιορίζουν τις θεραπευτικές επιλογές. Επιπλέον, η συμβατική χημειοθεραπεία αποδεικνύεται στις περισσότερες των περιπτώσεων μη αποτελεσματική με την πάροδο του χρόνου, με συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και τελικά την επανεμφάνιση της νόσου. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν και καθορίζουν την εμφάνιση χημειοανθεκτικότητας ποικίλουν και επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα στην ανάπτυξη ενός χημειοανθεκτικού φαινοτύπου. Η μελέτη και βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών αυτών και των αντίστοιχων παραγόντων που τους απαρτίζουν, αποτελούν κομβικής σημασίας στάδιο για την θεραπευτική προσέγγιση και αποτελεσματική αντιμετώπιση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού.

Κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός ενός *in vitro* μοντέλου μελέτης των μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας στην πακλιταξέλη, στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και η ταυτοποίηση πιθανών φαρμακευτικών στόχων με σημασία και στην κλινική πράξη.

Συνοπτικά οι επί μέρους στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- Ο χαρακτηρισμός της ανθεκτικής στην πακλιταξέλη σειράς τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού MDA-MB-468 PTX res.
- Η μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της σειράς αυτής, συγκριτικά με την πατρική MDA-MB-468 parental σειρά.
- Η ανάλυση και σύγκριση των μεταγραφικών προφίλ των δύο κυτταρικών σειρών, με σκοπό την ταυτοποίηση βιολογικών διαδικασιών και μονοπατιών, που πιθανώς εμπλέκονται στην δημιουργία χημειοανθεκτικού φαινοτύπου, όπως και των παραγόντων που τις απαρτίζουν.
- Η ανάλυση και σύγκριση των μεταβολικών προφίλ των δύο σειρών.
- Η ανάδειξη γονιδίων πιθανώς κομβικής σημασίας για τη χημειοανθεκτικότητα, ικανών να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, με εφαρμογή στην κλινική πράξη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταροκαλλιέργεια κυτταρικής σειράς MDA-MB-468

Η κυτταρική σειρά MDA-MB-468 απομονώθηκε το 1977 από μία 51χρονη γυναίκα με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα στο στήθος (www.atcc.org). Ανήκει στον υπότυπο των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (TNBC), γεγονός που σημαίνει ότι δεν εκφράζει ούτε τους ορμονικούς υποδοχείς (ER, PR) ούτε τον υποδοχέα HER2, και πιο συγκεκριμένα στον τριπλά αρνητικό υπότυπο Basal-like 1 (BL-1), που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και επιδιορθωτική ικανότητα του DNA. Η καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς έγινε σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM)(Sigma-Aldrich, D6429) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου μόσχου (FBS) (Gibco FBS, Qualified, Standard, REF 10270-106) σε περιεκτικότητα 10% και αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 1% (Biosera, XC-A4122/100). Τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστήρα στους 37°C με 5% CO₂. Για τις πλύσεις των κυττάρων πριν την μεταφορά τους σε νέο τρυβλίο χρησιμοποιείται το Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich D8537) ενώ η αποκόλληση τους από την επιφάνεια του τρυβλίου γίνεται με χρήση Trypsin EDTA (1X) (Biosera, LM-T1705/100).

Δημιουργία ανθεκτικής σειράς στο φάρμακο Paclitaxel (Paclitaxel-resistant cell line, PTX res.)

Η ανθεκτική σειρά δημιουργήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δ. Κορδιά. Η κυτταρική σειρά MDA-MB-468 αναπτύχθηκε παρουσία συνεχώς αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμάκου Paclitaxel (Taxol) (PATAXEL, Vianex S.A., Αθήνα, Ελλάδα). Το φάρμακο χορηγούνταν για 2 ημέρες και στην συνέχεια απομακρύνονταν για 2-3 ημέρες ώστε να ανακάμψουν τα κύτταρα. Συνολικά πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για περίπου 25 κύκλους. Η ανθεκτική αυτή σειρά (PTX res. MDA-MB-468) χρησιμοποιήθηκε ως ένα in vitro μοντέλο για την μελέτη των μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού μαζί με την πατρική σειρά (Parental MDA-MB-468), στα πειράματα που θα περιγραφούν στην συνέχεια.

2.2 Φάρμακα

Πακλιταξέλη (Paclitaxel)

Η πακλιταξέλη (Paclitaxel, Taxol) (PATAXEL, Vianex S.A., Αθήνα, Ελλάδα) είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας της οικογένειας των ταξανών, που χρησιμοποιείται για την θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου (εικόνα 2.1A). Η δραστική του ουσία, η πακλιταξέλη, απομονώθηκε από τον φλοιό του έλατου του Ειρηνικού. Η πακλιταξέλη είναι ένας μιτωτικός αναστολέας. Μέσω της σύνδεσης

της με τα μόρια της β-τουμπουλίνης σταθεροποιεί την δομή των μικροσωληνίσκων και αποτρέπει τον αποπολυμερισμό τους. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, η οποία είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μίτωσης, οδηγώντας τα κύτταρα σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή αποπτωτικό θάνατο. Συγκεντρώσεις εύρους 1 nM-5 μM του φαρμάκου αυτού χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Δοσεταξέλη (Docetaxel)

Η δοσεταξέλη (Docetaxel) είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας της κατηγορίας των ταξανών και η δραστική του ουσία είναι η δοσεταξέλη, ένα ημισυνθετικό ανάλογο της πακλιταξέλης που δημιουργήθηκε το 1986 (εικόνα 2.1B). Χρησιμοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνου και δρα σταθεροποιώντας την δομή των μικροσωληνίσκων, μέσω πρόσδεσης στην μονάδα της β-τουμπουλίνης και αποτρέποντας τον αποπολυμερισμό τους. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, η οποία είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μίτωσης. Ο μηχανισμός δράσης της δοσεταξέλης είναι ίδιος με αυτόν της πακλιταξέλης, με τη διαφορά ότι η δοσεταξέλη εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την θέση δέσμευσης στην μονάδα της τουμπουλίνης και πετυχαίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση και μεγαλύτερη διάρκεια παραμονής στο εσωτερικό των κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτών είναι να αναστέλλει τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων δύο φορές πιο ισχυρά από την πακλιταξέλη. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 1 nM-5 μM του φαρμάκου αυτού.

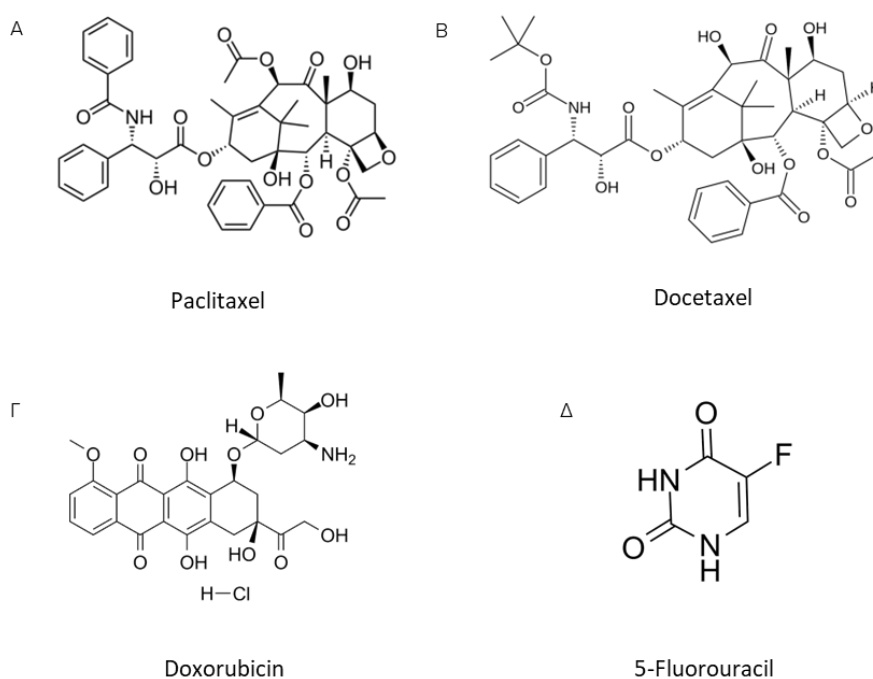
Δοξορουβικίνη (Doxorubicin)

Η δοξορουβικίνη (Doxorubicin) (Adriablastina, Hydrochloride 10 mg/5 mL VIAL, Pfizer) ανήκει στην κατηγορία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (εικόνα 2.1Γ). Η δραστική ουσία του φαρμάκου, η δοξορουβικίνη, είναι ένα κυτταροτοξικό αντιβιοτικό τύπου ανθρακυκλίνης που απομονώνεται από τον *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Χρησιμοποιείται χάρη στην αντιμιτωτική και κυτταροτοξική δράση της. Πιο συγκεκριμένα παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA δημιουργώντας σύμπλοκα και σταθεροποιεί το σύμπλοκο DNA- τοποϊσομεράσης II αναστέλλοντας έτσι της δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 10 nM-5 μM του φαρμάκου αυτού.

5-φθοροουρακίλη (5-Fluorouracil)

Η φθοροουρακίλη (powder, 51-21-8, Sigma-Aldrich) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό της κατηγορίας των αντιμεταβολιτών (εικόνα 2.1Δ). Ο ρόλος των αντιμεταβολιτών, λόγω της ομοιότητας τους με

φυσιολογικές ουσίες του κυττάρου, είναι να ενσωματώνονται στις θέσεις τους και να παρεμποδίζουν με αυτό τον τρόπο την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου οδηγώντας το στον θάνατο. Η φθοροουρακίλη είναι ένα ανάλογο της πυριμιδινικής ουρακίλης και παρεμποδίζει την πορεία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρεμβαίνοντας στην αλληλουχία του DNA. Πιο συγκεκριμένα, ανταγωνίζεται το φυσιολογικό υπόστρωμα dUMP για την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου θυμιδική συνθάση (FS), με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την πορεία βιοσύνθεσης πυριμιδινών, που αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 1 μM -10.000 μM του φαρμάκου αυτού.



Εικόνα 2.3 Χημικές δομές χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Α) Πακλιταξέλη (*paclitaxel*), Β) Δοσεταξέλη (*docetaxel*), Γ) Δοξορουβικίνη (*doxorubicin*), Δ) 5-φθοροουρακίλη (*5-fluorouracil*).

2.3 Δοκιμασία σχηματισμού μαμμόσφαιρων (Mammospheres formation assay)

Η διαδικασία σχηματισμού σφαιρών χρησιμοποιείται με σκοπό τον έλεγχο της βλαστικότητας των βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία αυξητικών παραγόντων (EGF, FGF) και συμπληρώματος B27, όπου περιέχονται απαραίτητες πρωτεΐνες, ένζυμα, βιταμίνες και οξέα για την ανάπτυξη των κυττάρων, απουσία ορού από το μέσο καλλιέργειας και σε τρυβλία που δεν επιτρέπουν την προσκόλληση τους σε αυτά. Υπό αυτές τις συνθήκες τα

κύτταρα με βλαστικές ιδιότητες επιβιώνουν σχηματίζοντας σφαιροειδείς δομές στο εναιώρημα, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα πεθαίνουν.

Για την καλλιέργεια των σφαιρών χρησιμοποιείται το Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12)(Biosera, LM-D1220/500) ως μέσο καλλιέργειας, εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 1% και παρουσία B27 (2%) (Gibco B27 Supplement, REF 12587-010) και των παραγόντων EGF (Immunotools Cat N. 11343406), FGF (20 ng/ml) (Immunotools Cat.No. 11343625) και βακτηριακά πιάτα τα οποία δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια τους.

Σφαίρες πρώτης γενιάς (1st generation mammospheres)

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MCF-7 τα οποία βρίσκονταν για 5 περάσματα στην καλλιέργεια και σε πυκνότητα 70-80%. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με χρήση τρυψίνης και συλλέγονται σε ένα σωληνάριο. Ο αριθμός των κυττάρων μετριέται με χρήση πλάκας Neubauer από όπου υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Έπειτα ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων φυγοκεντρείται στα 1500 rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό σφαιρών. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε βακτηριακά πιάτα των 100mm (100.000 κύτταρα ανά πιάτο) με 8 ml θρεπτικό σφαιρών στο καθένα και επωάζονται στον επωαστήρα στους 37°C, 5% CO₂ για 7 ημέρες με σκοπό την δημιουργία σφαιρών πρώτης γενιάς.

Από την δεύτερη ημέρα και μετά μετριέται καθημερινά ο αριθμός των σφαιρών. Σε κάθε συνθήκη μετριέται ο αριθμός των σφαιρών σε έξι διαφορετικά, τυχαία πεδία του πιάτου και από αυτές τις μετρήσεις υπολογίζεται ο μέσος όρος. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει το MFE (mammospheres formation efficiency), που είναι ένα in vitro μέτρο βλαστικότητας. Ο υπολογισμός αυτός βασίζεται στον τύπο:

$$M.F.E. = (\text{number of mammospheres per well} / \text{number of cells seeded per well}) \times 100$$

Την έβδομη ημέρα οι σφαίρες συλλέγονται με σκοπό την χρήση τους σε άλλα πειράματα.

2.4 Δοκιμασία αύξησης κυτταρικού πληθυσμού (cell population growth assays)

Για τον προσδιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Incucyte Zoom System (Essen BioScience, Hertfordshire, United Kingdom). Το Incucyte είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα παρακολούθησης των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Επιτρέπει επίσης την καταγραφή διαφόρων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, όπως η βιωσιμότητα, υπό διαφορετικές συνθήκες. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προσδιορίζεται βάσει της πυκνότητας των κυττάρων) με την πάροδο του χρόνου. Καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, η πυκνότητα τους αυξάνεται στο εκάστοτε πιάτο καλλιέργειας. Στην προκειμένη περίπτωση η

κυτταρική σειρά MDA-MB-468 καλλιεργήθηκε σε δυάδες σε πιάτο 96 θέσεων (96-well) και η λήψη φωτογραφιών ανά 24 ώρες για ένα σύνολο 7 ημερών χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πυκνότητας των κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή μέσω του λογισμικού του προγράμματος.

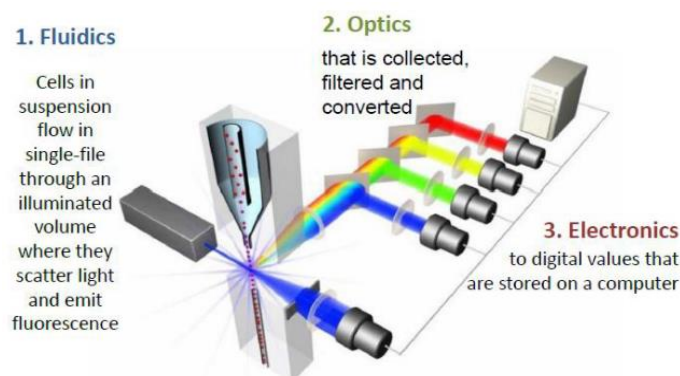
2.5 Προσδιορισμός χημειοανθεκτικότητας των κυττάρων

Όμοια με την δοκιμασία πολλαπλασιασμού, το Incucyte Zoom System (Essen BioScience, Hertfordshire, United Kingdom) χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση αυτή. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε δυάδες σε πιάτο 96 θέσεων (96-well) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων. Ελήφθησαν φωτογραφίες των κυττάρων στην κάθε συνθήκη για 48 ώρες με σκοπό τον προσδιορισμό της πυκνότητας τους. Για την εξακρίβωση της δράσης των φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε η τιμή του IC₅₀. Το IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration), αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και δείχνει την ευαισθησία των κυττάρων στην δράση του συγκεκριμένου φαρμάκου. Το IC₅₀ σε κάθε συνθήκη υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Graphpad Prism 8.01.

2.6 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία ποσοτική, υψηλής ακρίβειας και αξιοπιστίας μέθοδος, που βασίζεται στην μέτρηση διαφόρων φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Η ταυτοποίηση των κυττάρων γίνεται με την χρήση αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ουσίες, τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται σε επιφανειακά ή ενδοκυτταρικά μόρια και αναλύονται σε ειδικά όργανα με τη βοήθεια φωτεινών πηγών (laser). Η μέθοδος αυτή βρίσκει πολλές διαφορετικές εφαρμογές, όπως ο χαρακτηρισμός διαφορετικών τύπων κυττάρων σε έναν πληθυσμό, η ανάλυση της έκφρασης διαφορετικών ενδοκυτταρικών και επιφανειακών μορίων και η ανάλυση του μεγέθους και του όγκου των κυττάρων. Σημαντική εφαρμογή αποτελεί και η δυνατότητα του κυτταροδιαχωρισμού (Cell Sorting) δηλαδή της απομόνωσης μεμονωμένων κυτταρικών υποπληθυσμών. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιείται σε ειδικά σύνθετα μηχανήματα, τους κυτταρομετρητές ροής. Ένας κυτταρομετρητής ροής λειτουργεί βασιζόμενος σε τρία ξεχωριστά συστήματα. Το υδροδυναμικό σύστημα κατευθύνει τα μονήρη κύτταρα που βρίσκονται στο εναιώρημα μπροστά από μία εστιασμένη δέσμη laser. Τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα χάρη στην πρόσπτωση της δέσμης laser συλλέγονται από το οπτικό σύστημα του κυτταρόμετρου. Ένα μέρος

της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται από το κύτταρο ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται είτε στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας δέσμης laser, οπότε και ονομάζεται πρόσθια σκέδαση (FSC), είτε κάθετα στην δέσμη laser και ονομάζεται πλευρική ή πλάγια σκέδαση (SSC). Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με βάση το σκεδασμένο φως και τον εκπεμπόμενο φθορισμό (FL). Τα δεδομένα από τις τρεις αυτές παραμέτρους συλλέγονται από το ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομέτρου, μεταφράζονται σε χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος (FSC), η κοκκίωση (SSC) και η ένταση του φθορισμού (FL) και παρουσιάζονται σε μορφή κυτταρογράμματος. Προκειμένου να αναλυθούν τα δείγματα στο κυτταρομέτρο πρέπει να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία και να βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Επιπλέον τα κύτταρα θα πρέπει να σημανθούν με τα κατάλληλα φθοριοχρώματα τα οποία έχουν την ικανότητα να διεγείρονται από ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και να εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος χαρακτηριστική για το καθένα.



Εικόνα 2.2 Λειτουργία κυτταρομετρητή ροής

2.6.1 Προσδιορισμός πληθυσμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τα κύτταρα βρισκόντουσαν σε εναιώρημα PBS παρουσία FBS 2% και χρησιμοποιήθηκαν τα φθοριοχρώματα ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), συζευγμένη με αντίσωμα anti-CD24, που εκπέμπει σε μήκος κύματος 520 nm (πράσινος φθορισμός) και φυκοερυθρίνη (PE), συζευγμένη με αντίσωμα anti-CD24, σε 575 nm (πορτοκαλί φθορισμός). Σκοπός ήταν η ανίχνευση των αντιγόνων επιφανείας CD24 και CD44 στον κυτταρικό πληθυσμό σφαιρών (mammospheres) και ο χαρακτηρισμός του υποπληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CD44+/CD24-/low). Αρχικά οι σφαίρες συλλέχθηκαν σε ένα σωληνάριο (falcon), φυγοκεντρήθηκαν στα 800 rpm για 3 min και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Επαναιωρήθηκαν σε 100 μl τρυψίνη ώστε να σπάσουν και να γίνουν μονήρη κύτταρα και η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε με προσθήκη 900 μl θρεπτικού. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια (erpendorfs) και περάστηκαν 4-5 φορές από σύριγγα ινσουλίνης 1 ml ώστε να είναι σίγουρο ότι δεν υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων ή σφαίρες στο δείγμα. Τα κύτταρα μετρούνται με χρήση πλάκας Neubauer, ώστε να υπάρχει ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε δείγμα, φυγοκεντρώνται στα 1500 rpm για 5 min και

επαναιωρούνται σε 100 μl PBS με 2% FBS. Γίνεται η προσθήκη 3 μl του πρώτου αντισώματος για τον CD44 (BD Pharmingen, Cat 555479) το οποίο είναι συζευγμένο με PE, το δείγμα αναδεύεται στο Vortex και τοποθετείται στους 4°C τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο και υπό ανάδευση στον ρότορα για 20 min. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για το δεύτερο αντίσωμα για το CD24 (BD Pharmingen, Cat 555427) το οποίο είναι συζευγμένο με FITC. Στο τέλος της διαδικασίας γίνονται πλύσεις με PBS + 2% FBS και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 200 μl PBS + 2% FBS ώστε να αναλυθούν από το κυτταρόμετρο BD FACS Aria II instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.6.2 Προσδιορισμός πληθυσμού αποπτωτικών κυττάρων

Με σκοπό να προσδιοριστεί η ύπαρξη αποπτωτικών κυττάρων στην πατρική και την ανθεκτική σειρά τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτο 6 θέσεων και την επόμενη ημέρα επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία του φαρμάκου Paclitaxel σε συγκεντρώσεις 10nM, 25nM, 50nM και 100nM. Μετά το πέρας 48 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε πλύση με PBS εις διπλούν. Εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν σε 1500 rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 50 μl Annexin V binding buffer, όπου προστέθηκαν 4 μl ανεξίνης (Annexin V-FITC) (BD Pharmigen, Cat:556419). Η ανεξίνη προσδένεται στην φωσφατιδυλοσερίνη που βρίσκεται εκτεθειμένη στην μεμβράνη μόνο των αποπτωτικών κυττάρων. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι και έπειτα προστέθηκαν άλλα 250 μl Annexin V binding buffer. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο BD FACS Aria II instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.6.3 Έλεγχος κυτταρικού κύκλου

Συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων (5×10^5) συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS. Στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 rpm για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και επαναιωρήθηκαν σε 80% παγωμένη αιθανόλη, η οποία προστέθηκε στάγδην και υπό ανάδευση στο Vortex. Τα κύτταρα παρέμειναν τουλάχιστον 3 ώρες στους -20°C. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκε πλύση με PBS εις διπλούν και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PI/RNase staining buffer (BD Pharmigen, Cat: 550825) για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο BD FACS Aria II instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.6.4 Ανάλυση της πρόσληψης Δοξορουβικίνης από τα κύτταρα

Τόσο η πατρική όσο και η ανθεκτική σειρά MDA-MB-468 στρώθηκαν σε πιάτο 12 θέσεων και την επόμενη ημέρα επώαστηκαν με το φάρμακο δοξορουβικίνη σε συγκεντρώσεις 100 nM, 150nM, 200nM και 500nM για 6 ώρες. Στην συνέχεια συλλέχθηκαν τα κύτταρα από την κάθε συνθήκη, φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρήθηκαν σε PBS. Τα κύτταρα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο BD FACS Aria II instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) όπου εντοπίστηκε το ποσοστό των θετικών για την δοξορουβικίνη κυττάρων στην κάθε συνθήκη λόγω της φθορίζουσας φύσης του φαρμάκου.

2.7 Ανοσοφθορισμός

Κύτταρα της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς MDA-MB-468 καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες σε πιάτο 12 θέσεων και την επόμενη ημέρα επώαστηκαν παρουσία του φαρμάκου πακλιταξέλη στις συγκεντρώσεις 25nM, 50nM και 100nM για 48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA και στην συνέχεια προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα anti-tubulin (1:500) (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)-E7) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα (Goat anti-Mouse IgG AlexaFluor 488, 1:400, cat. No. A-1100, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ενώ έγινε και χρώση του DNA με TOPRO-3 (cat. No. T3605, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (Leica SP5 confocal microscope).

2.8 Απομόνωση RNA

Απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του NucleoZol (Macherey-Nagel). Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 1500 rpm για 5 λεπτά για προσκολλημένα (attached) κύτταρα και στα 800 rpm για 3 λεπτά για σφαίρες. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl NucleoZol (Macherey-Nagel). Προστίθεται πρώτα RNase-free H₂O 40 μl, τα δείγματα αφήνονται για 5 λεπτά και μετά χλωροφόρμιο 40 μl και αφήνονται πάλι για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4ο C. Στο τέλος της φυγοκέντρησης προκύπτουν 3 φάσεις. Η υδατική-πάνω φάση, η οποία περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο (tube) και προστίθεται ισοπροπανόλη 100 μl. Τα δείγματα επώάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στα 12.000 g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Τέλος πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με

αιθανόλη 75% (φυγοκέντρηση στα 8.000 g, 3 λεπτά και απομάκρυνση υπερκείμενου). Το σωληνάριο (tube) αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι, ώστε να εξατμιστεί και η τελευταία ποσότητα διαλύτη από το ίζημα, και έπειτα επαναιωρείται σε 10 μl RNase-free H₂O. Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του RNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε το NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.9 Αντίστροφη μεταγραφή (cDNA synthesis)

Η αντίστροφη μεταγραφή περιλαμβάνει την σύνθεση ενός μορίου DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Το νεοσυντιθέμενο μόριο DNA (cDNA) είναι συμπληρωματικό (complementary) ως προς την αλληλουχία του RNA. Για την διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη των δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), των κατάλληλων μορίων εκκινητών (oligo dt primers), του εκμαγείου RNA. Η διαδικασία καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο αυτό φυσιολογικά καταλύει στους ρετροϊούς την αντίδραση της σύνθεσης DNA με εκμαγείο το γονιδίωμα του που είναι μονόκλωνο RNA. Οι ρετροϊοί με τον τρόπο αυτό καταφέρνουν να εισάγουν το γονιδίωμα τους στο γονιδίωμα των ξενιστών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η PrimeScript (TAKARA) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας.

2.10 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια απλή και ευαίσθητη in vitro μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA και την παραγωγή πολλών αντιγράφων σε μικρό χρονικό διάστημα. Η ποσότητα του αρχικού DNA που απαιτείται για την αντίδραση είναι πολύ μικρή και αυτό κάνει την τεχνική ιδιαίτερα ευαίσθητη. Η τεχνική αυτή στην βάση της μιμείται την φυσιολογική διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Εκτός από το εκμαγείο DNA (template DNA) απαραίτητη είναι και η ύπαρξη μορίων εκκινητών (primers), νουκλεοτιδίων (dNTPs), Mg²⁺ και του ενζύμου DNA πολυμεράση (DNA polymerase). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλοποιητές (thermocyclers) που εξασφαλίζουν τις κατάλληλες συνθήκες. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της κλασικής τεχνικής PCR, μια από αυτές είναι η RT-qPCR η οποία δίνει την δυνατότητα σύγκρισης των επιπέδων του DNA στα διαφορετικά δείγματα που αναλύονται. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και την εύρεση διαφορών στην έκφραση διαφόρων γονιδίων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ποσοτική μέθοδος της RT-qPCR με σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης ορισμένων γονιδίων στα υπό μελέτη κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) (KAPABIOSYSTEMS Cat KK4602). Το housekeeping

γονίδιο που χρησιμοποιείται ως συνθήκη ελέγχου (control) είναι το GAPDH και οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer
MT1E	CTCATTGCCCGTGCATT	AGAACCCAGACCCAGAGGA
MLLT3	GTCATTCATAGCAGCCTCTTCAT	CTGCACGGCACACGAGCTAG
CHAC1	CTTGAAGATCATGAGGGCTGC	TATCGTAGCCACCAAGCACTG
ABCB4	GAGGTGAAGAAAGGCCAGACA	ACCAAAGTCCACAAACACTGTCC
ABCB1	GAAGCAACCAGATAAAAGATCAAAA	CACCTTCTGTCTCCGCTC
ALDH3A1	TCCAGCAACGACAAGGTGATT	GGCAGAGAGTGCAAGGTGATG
ITGB4	CGCCTGACTGCTGGTGTG	GGGATGTTGAGCCGATGC
HDAC9	GAGGACGAGAAAGGGCAGTG	GCGGCTCACGGAATGATTT
TET1	CGAGTTGGAAAGTTTGCCC	CACACAAGGTTTGGTCGCT
KDM5B	ACCAAGATGGGGTTTGCTCC	GCAAACACCTTAGGCTGTCTCC

2.11 Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing) και βιοπληροφορική ανάλυση

Η αλληλούχιση RNA (RNA sequencing) είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του μεταγραφώματος ενός βιολογικού δείγματος, μια δεδομένη χρονική στιγμή επιτρέποντας την μελέτη του υπό διαφορετικές συνθήκες. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, η αλληλούχιση του RNA, χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της μεγάλης ευαισθησίας και ακρίβειας στον προσδιορισμό της έκφρασης όλων των γονιδίων σε ένα δείγμα και όχι μεμονωμένα επιλεγμένων γονιδίων στόχων). Στην παρούσα εργασία, η αλληλούχιση RNA δείγματος της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς επέτρεψε την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό του μεταγραφικού προφίλ των δύο κυτταρικών σειρών και τη σύγκρισή τους για την εύρεση γονιδίων πιθανότατα σημαντικών στην Ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας.

Για την απομόνωση του ολικού RNA με σκοπό την χρήση του για την αλληλούχιση του RNA χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Kit (Qiagen) και η συγκέντρωση του RNA που απομονώθηκε προσδιορίστηκε με το NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το *Illumina NextSeq500 sequencer* και η επεξεργασία των αρχικών δεδομένων έγινε με το πακέτο *DESeq2* (Bioconductor version: Release (3.13)) Η διαδικασία της αλληλούχισης του RNA και η επεξεργασία των αρχικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών, Ακαδημία Αθήνας (ΙΙΒΕΑΑ).

Στην συνέχεια ακλούθησε επεξεργασία των δεδομένων με σκοπό να εντοπιστούν τα γονίδια που εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς (Differentially Expressed Genes, DEGs). Για τον λόγο αυτό εφαρμόστηκαν επιπλέον τα κριτήρια $reads > 10$, $P_{adj} < 0,01$ και $fold-change \geq 2$. Τα DEGs χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη των γονιδιακών οντολογιών (Gene Ontology, GO) μέσω του προγράμματος DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov>). Το Volcano plot πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος VolcaNoseR (huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR)

2.12 Προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων

2.12.1 Απομόνωση ενδοκυττάρων μεταβολιτών

Τα κύτταρα της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς MDA-MB-468 καλλιεργήθηκαν συστηματικά, μεταφερόμενα σε νέο τρυβλίο ανά δύο ημέρες μέχρι το passage 3, ενώ 24 ώρες πριν από την απομόνωση των μεταβολιτών ανανεώνονταν το μέσο καλλιέργειας τους. Συνολικά χρησιμοποιούνταν περίπου 15 εκ. κύτταρα για την κάθε συνθήκη. Η απομόνωση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε μέσω της δημιουργίας ενός διφασικού συστήματος με μεθανόλη, χλωροφόρμιο και νερό σε αναλογία 1:1:0,33 (v/v/v). Αρχικά τα κύτταρα πλένονται με PBS, στην συνέχεια προστίθενται παγωμένη μεθανόλη 80% και τα κύτταρα ξεκολλώνται από το τρυβλίο με χρήση scraper. Έπειτα προστίθεται το χλωροφόρμιο, το δείγμα αναδεύεται στο Vortex και ακολουθεί επώαση 15 λεπτών. Μετά το πέρας την επώασης πραγματοποιούνται 3 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων, 30% amp. Διάσπασης μέσω υπερήχων (sonication) και προθήκη του υπόλοιπου χλωροφορμίου. Τέλος προστίθεται το νερό και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000g για 15 λεπτά στους 4°C. Από τις δύο φάσεις που δημιουργούνται μετά την φυγοκέντρηση, ή φάση μεθανόλης-νερού περιέχει τους μεταβολίτες, η χλωροφορμική φάση τα λιπίδια και η ενδιάμεση φάση περιέχει άλλες πρωτεΐνες και μακρομόρια. Η κάθε φάση συλλέγεται χωριστά και ακολουθεί εξάτμιση παρουσία ροής αζώτου N_2 . Οι μεταβολίτες αποθηκεύονται στους -80 °C μέχρι την χρήση τους.

2.12.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μία ποιοτική και ποσοτική τεχνική που επιτρέπει την μελέτη των μορίων σε φυσικό, δομικό και χημικό επίπεδο. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην φυσική ιδιότητα των πυρήνων να απορροφούν και να εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν τοποθετούνται εντός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου. Αυτή η ανταλλαγή ενέργειας καταγράφεται από τον φασματογράφο ως συνάρτηση της συχνότητας και εκφράζεται ως φάσμα NMR. Πιο συγκεκριμένα, το προς μελέτη

δείγμα (χημική ένωση ή μείγμα ενώσεων) τοποθετείται σε σταθερό μαγνητικό πεδίο και στην συνέχεια εφαρμόζεται σε αυτό κάθετο μαγνητικό πεδίο συχνότητας ραδιοκυμάτων (RF), με αποτέλεσμα οι πυρήνες του δείγματος να απορροφούν ακτινοβολία και να μεταβαίνουν σε μια κατάσταση υψηλής ενέργειας. Η χαλάρωση των πυρήνων, με εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, οδηγεί στην συνέχεια την μετατόπιση τους σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση και τελικά στην αποκατάσταση της ισορροπίας. Το φαινόμενο αυτό αφορά πυρήνες που έχουν μαγνητικές ιδιότητες, δηλαδή ικανότητα αυτοστροφής ή στροφορμής γύρω από έναν φανταστικό άξονα και επομένως εμφανίζουν μη μηδενικό spin. Οι πιο μελετημένοι πυρήνες στην μέθοδο NMR είναι οι ^1H και ^{13}C αλλά και πυρήνες ισοτόπων όπως ^2H , ^6Li και ^{11}B . Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η ταχύτητα, η ακρίβεια και η ευαισθησία της, η ικανότητα ανίχνευσης μεγάλου αριθμού ενώσεων σε ένα φάσμα και η επαναληψιμότητα της.

Τα πειράματα φασματοσκοπίας NMR πραγματοποιήθηκαν στο Bruker Avance DRX NMR φασματόμετρο (κέντρο NMR, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) στα 500 MHz (συχνότητα συντονισμού πρωτονίων). Το φάσμα NMR δημιουργήθηκε από συλλογή 128 scans ενώ η φάση (phase) και η βάση (baseline) του φάσματος ορίστηκαν χειροκίνητα μέσω του λογισμικού TopSpin (TopSpin software package version 4.0.6). Η χημικές μετατοπίσεις προσδιορίστηκαν βάσει του TSP ($\delta=0.00$ ppm). Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε μέσω του προγράμματος Chenomx NMR Suite 8.4 profiler (Chenomx, Edmonton, AB, Canada) και για την ποσοτικοποίηση τους η βιβλιοθήκη αναφοράς 500-MHz του προγράμματος Chenomx NMR Suite software. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων (One-factor statistical analysis, enrichment pathway & joint-pathway analysis) πραγματοποιήθηκε μέσω του MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) ενώ η ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων (multivariate supervised method Partial-Least-Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA) χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ενός μοντέλου αναγνώρισης μοτίβων για την πατρική και την ανθεκτική σειρά βάσει των προσδιορισμένων και ποσοτικοποιημένων μεταβολιτών. Η ποσοτική ανάλυση εμπλουτισμού (Quantitative enrichment analysis, QEA) πραγματοποιήθηκε με χρήση των μονοπατιών Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

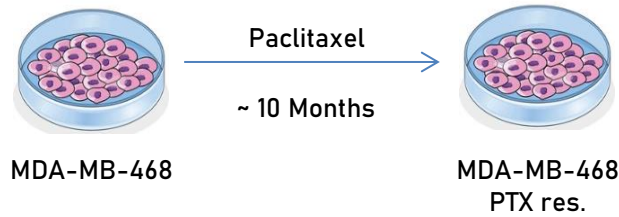
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός μίας νέας κυτταρικής σειράς TAKM MDA-MB-468 ανθεκτικής σε πακλιταξέλη (PTX res. MDA-MB-468)

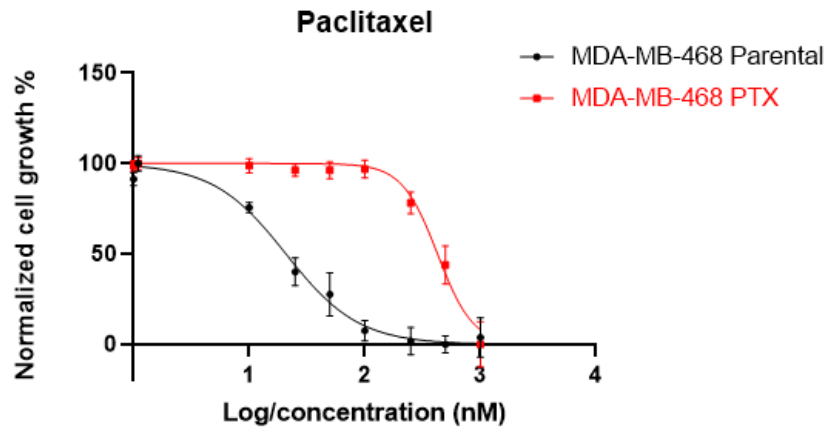
Η δημιουργία της χημειοανθεκτικής σειράς είχε ως σκοπό την εγκαθίδρυση ενός *in vitro* συστήματος μελέτης των παραγόντων που συμβάλλουν στην χημειοανθεκτικότητα του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού έναντι του φαρμάκου πακλιταξέλη.

Όπως περιγράφηκε και νωρίτερα (ενότητα 2.1), η ανάπτυξη της ανθεκτικής σειράς πραγματοποιήθηκε μετά από 25 επαναλαμβανόμενους κύκλους έκθεσης της πατρικής σειράς MDA-MB-468 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πακλιταξέλης για 2 ημέρες, ενώ ενδιάμεσα από κάθε κύκλο ακολουθούσε περίοδος ανάκαμψης 2-3 ημερών χωρίς φάρμακο (εικόνα 3.1A). Για τον σκοπό αυτό, βασικό στάδιο αποτελεί η επιβεβαίωση της χημειοανθεκτικότητας της σειράς. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω της παρακολούθησης της απόκρισης, τόσο της πατρικής όσο και της ανθεκτικής σειράς, στη χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων πακλιταξέλης για 48 ώρες και του υπολογισμού του IC_{50} του φαρμάκου για την κάθε σειρά. Η τιμή του IC_{50} αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του φαρμάκου, που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και είναι επομένως δείκτης την ανθεκτικότητας των κυττάρων έναντι του συγκεκριμένου φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα, σταθερός αριθμός κυττάρων της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς, στρώνεται σε πιάτο 96 θέσεων σε δυάδες και την επόμενη ημέρα χορηγούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου εύρους 1 nM-5 μ M για 48 ώρες. Σκοπός είναι οι χορηγούμενες συγκεντρώσεις να ξεκινούν από χαμηλές, χωρίς ιδιαίτερη επίπτωση στην βιωσιμότητα, έως μεγαλύτερες που πλήττουν την βιωσιμότητα των κυττάρων. Η επίδραση του φαρμάκου παρακολουθείται μέσω του συστήματος Incucyte Zoom System, λαμβάνοντας υπόψη την πυκνότητα των κυττάρων κάθε πηγαδιού, με λήψη φωτογραφιών. Για τον υπολογισμό της τιμής του IC_{50} συγκρίνεται η πυκνότητα την αρχική χρονική στιγμή της χορήγησης του φαρμάκου ($t=0$) με αυτήν την τελική στιγμή, μετά το πέρασ 48 ωρών ($t=48$), με χρήση του προγράμματος Graphpad Prism 8.01. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1B, η ανθεκτική σειρά (PTX res.) εμφανίζει τιμή IC_{50} 426,7nM, έναντι 20,87nM της πατρικής σειράς (parental), μετά από τη χορήγηση της πακλιταξέλης, με την διαφορά τους να ξεπερνά τις 20 φορές (p -value < 0,001). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει πως η νέα σειρά που παράξαμε εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην πακλιταξέλη συγκριτικά με την πατρική. Επιπλέον, εικόνες των δύο κυτταρικών πληθυσμών από το οπτικό μικροσκόπιο (εικόνα 3.1Γ) αποκαλύπτουν μορφολογικές διαφορές, με τα πατρικά κύτταρα να εμφανίζουν πιο καθορισμένα όρια, ενώ τα ανθεκτικά φαίνονται πιο διάχυτα, με ελαφρώς μεγαλύτερο μέγεθος.

A)

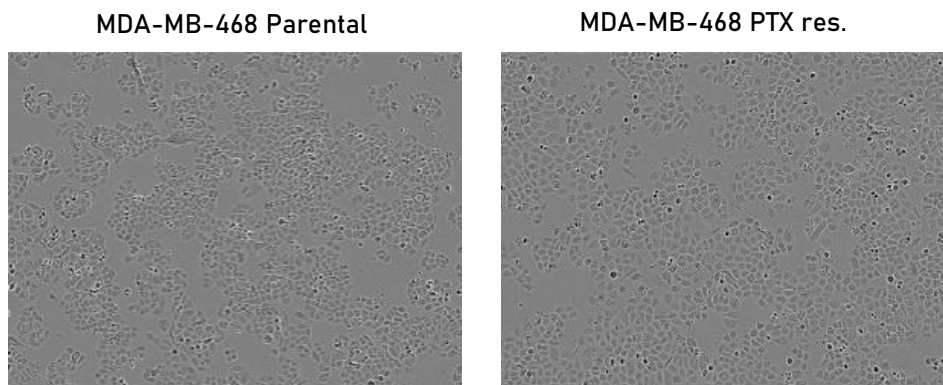


B)



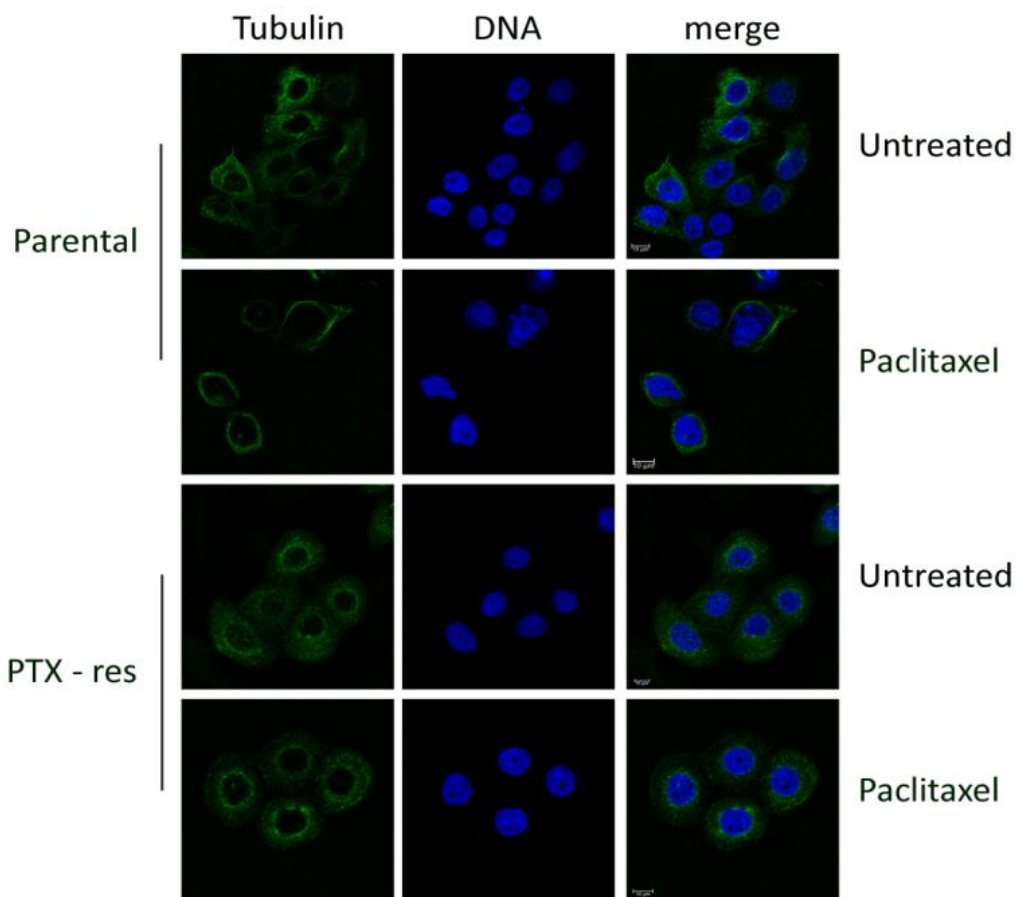
IC ₅₀ Paclitaxel (nM)	MDA-MB-468 Parental	20,87 +/- 1,86
	MDA-MB-468 PTX res.	426,7 +/- 18,7

Γ)



Εικόνα 3.1 Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός χημειοανθεκτικής σειράς MDA-MB-468 (PTX res.). A) Η χημειοανθεκτική σειρά δημιουργήθηκε μετά από 25 επαναλαμβανόμενους κύκλους έκθεσης της πατρικής σειράς MDA-MB-468 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις πακλιταξέλης (Paclitaxel) για 2 ημέρες. Ενδιάμεσα από κάθε κύκλο ακλουθούσε περίοδος ανάκαμψης 2-3 ημερών χωρίς φάρμακο. B) Η πατρική και η ανθεκτική σειρά επιστρώθηκαν σε πιάτο 96-θέσεων σε δυάδες και χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πακλιταξέλης για 48 ώρες. Η κυτταρική πυκνότητα υπολογίστηκε μέσω του Incucyte Zoom live imaging system και η τιμή του IC₅₀ μέσω του Graphpad Prism 8.01. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (p-value < 0,001). Γ) Μορφολογία πατρικής (parental) και ανθεκτικής (PTX res.) κυτταρικής σειράς MDA-MB-468, εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (4X).

Είναι γνωστό ότι η πακλιταξέλη δρα σταθεροποιώντας την δομή των μικροσωληνίσκων, μέσω πρόσδεσης στην μονάδα της β-τουμπουλίνης, δομικό στοιχείο των μικροσωληνίσκων. Πιο συγκεκριμένα, η πακλιταξέλη προσδένεται αντιστρεπτά στο αμινο-τελικό άκρο της β-τουμπουλίνης και το σύμπλοκο πακλιταξέλης-τουμπουλίνης δεν έχει την ικανότητα αποσύνθεσης με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται η δομή των μικροσωληνίσκων και να παρεμποδίζεται η ευελιξία και η δυναμική του κυτταροσκελετού, οδηγώντας τελικά τα κύτταρα σε θάνατο (Kamran et al. 2015). Με σκοπό να εντοπιστούν διαφορές στην δομή του κυτταροσκελετού των πατρικών και ανθεκτικών κυττάρων, παρουσία της πακλιταξέλης, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός. Μετά από χρώση της β-τουμπουλίνης στα πατρικά (parental) και τα ανθεκτικά κύτταρα (PTX res.), παρατηρήθηκαν διαφορές στην κατανομή του κυτταροσκελετού (εικόνα 3.2). Τόσο στα πατρικά όσο και στα ανθεκτικά κύτταρα, απουσία του φαρμάκου (untreated), φαίνεται ότι ο κυτταροσκελετός (πράσινο) έχει μία φυσιολογική κατανομή, σχηματίζοντας ένα δίκτυο γύρω από τον πυρήνα (μπλε), με τους μικροσωληνίσκους να απλώνονται στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση της πατρικής σειράς, μετά από την χορήγηση της πακλιταξέλης (paclitaxel), φαίνεται ότι η κατανομή του κυτταροσκελετού έχει αλλάξει. Οι μικροσωληνίσκοι εντοπίζονται συσπειρωμένοι γύρω από τον πυρήνα, έχοντας χάσει τη φυσιολογική τους απλωμένη διάταξη δικτύου. Η εικόνα αυτή αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα της δράσης της πακλιταξέλης στην δομή των μικροσωληνίσκων. Αντίθετα, η ανθεκτική σειρά φαίνεται να μην επηρεάζεται από την χορήγηση του φαρμάκου. Η δομή του κυτταροσκελετού μετά από την χορήγηση της πακλιταξέλης, ομοιάζει περισσότερο με αυτή των κυττάρων, απουσία του φαρμάκου (untreated). Οι μικροσωληνίσκοι διατηρούν τον φυσιολογικό σχηματισμό τους, εκτεινόμενοι στο κυτταρόπλασμα σε μορφή δυναμικού δικτύου. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ανθεκτική σειρά δεν επηρεάζεται από τη χορήγηση της πακλιταξέλης, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της πιθανής ανάπτυξης σε αυτά τα κύτταρα μηχανισμών αποφυγής και αντιμετώπισης της δράσης του φαρμάκου.



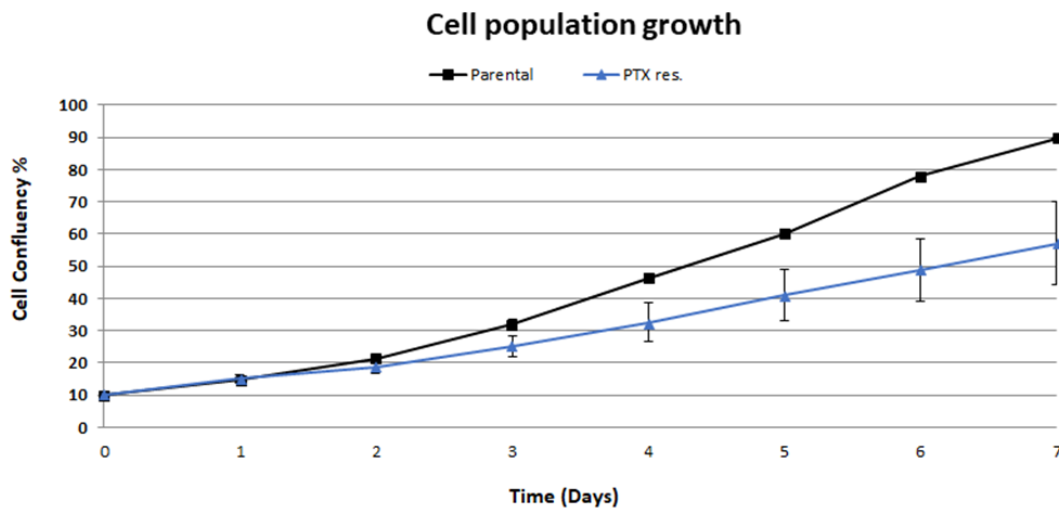
Εικόνα 3.2 Η δομή των μικροσωληνίσκων της πατρικής (parental) και της ανθεκτικής (PTX-res) σειράς μετά από χορήγηση της πακλιταξέλης. Ανοσοφθορισμός στα κύτταρα της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς με αντίσωμα έναντι της τουμποουλίνης (πράσινο) και TOPRO3 (μπλε). Χορηγήθηκε συγκέντρωση 50nM πακλιταξέλης για 48 ώρες.

3.2 Διερεύνηση του ρυθμού κυτταρικής αύξησης του πληθυσμού της πατρικής (parental) και της ανθεκτικής (PTX res.) σειράς MDA-MB-468

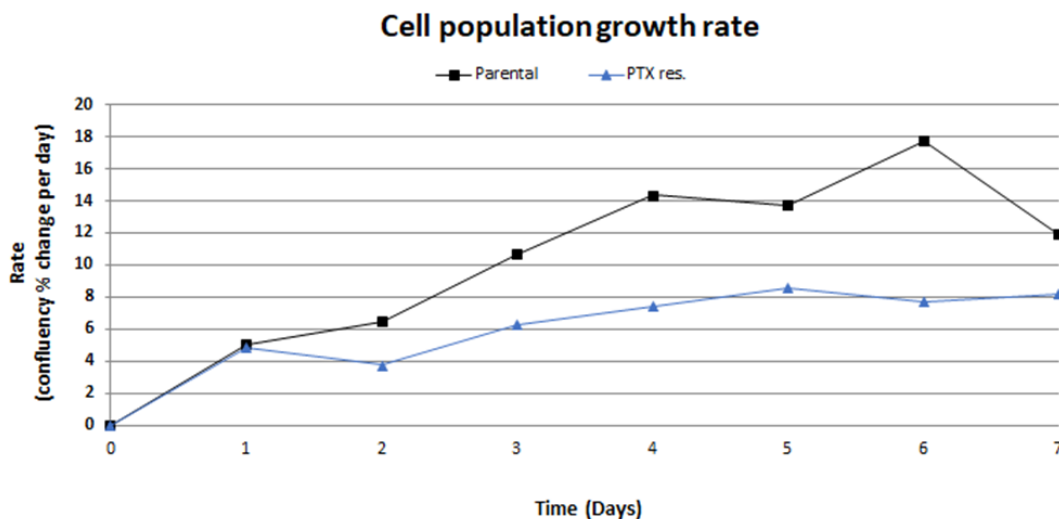
Ο ρυθμός κυτταρικής αύξησης του πληθυσμού αποτελεί ένα ακόμα κριτήριο στην περιγραφή και την σύγκριση των δύο κυτταρικών σειρών, καθώς αποτελεί ιδιαίτερο στοιχείο της κάθε σειράς και οι αλλαγές σε αυτόν αποτελούν σημαντικό δείκτη διάφορων άλλων κυτταρικών λειτουργιών. Ήδη από την καλλιέργεια των δύο σειρών, υπήρχε μία σημαντική διαφορά στον ρυθμό αύξησης της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς, όπως παρατηρήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου, την οποία θελήσαμε να ελέγξουμε και πειραματικά. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κυτταρικής αύξησης (cell growth assay) μέσω του Incucyte Zoom System, όπου ίδιος αριθμός κυττάρων από τις δύο σειρές επιστρώθηκε σε τρυβλίο 96 θέσεων σε δυάδες και στην συνέχεια λαμβάνονταν φωτογραφίες από την κάθε συνθήκη καθημερινά για συνολικά 7 ημέρες. Μέσω των φωτογραφιών και του προγράμματος Incucyte Zoom System, προσδιορίστηκε η % πυκνότητα των κυττάρων για την κάθε συνθήκη και στην συνέχεια οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία μίας καμπύλης ανάπτυξης, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3A. Επιπλέον, ο ημερήσιος ρυθμός αύξησης των δύο σειρών

προσδιορίστηκε από την διαφορά στην πυκνότητα (confluency) της μίας ημέρα από την προηγούμενη και ο μέσος όρος υπολογίστηκε από το σύνολο αυτών των τιμών. Παρατηρείται λοιπόν, μια διαφορά στην αύξηση των δύο κυτταρικών σειρών στην διάρκεια των 7 ημερών. Ειδικά, από την τέταρτη ημέρα και μετά φαίνεται ότι η πυκνότητα των κυττάρων της πατρικής σειράς (μαύρο) είναι αισθητά μεγαλύτερη από αυτή της ανθεκτικής (γαλάζιο). Επιπλέον, ενώ και οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί ξεκίνησαν με τον ίδιο αριθμό κυττάρων (t=0), την έβδομη ημέρα (t=7), φαίνεται ότι η πατρική σειρά έχει φθάσει στο 90% της πυκνότητας, ενώ η ανθεκτική μόλις στο 50% (p-value<0,001). Επιπρόσθετα, παρατηρώντας τους ρυθμούς μεταβολής της πυκνότητας των δύο κυτταρικών πληθυσμών ημερησίως (εικόνα 3.3B), φαίνεται ότι η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται την τέταρτη έως και την έκτη ημέρα και στις δύο σειρές, ενώ συνολικά ο ρυθμός της πατρικής σειράς είναι αισθητά αυξημένος με μέσο όρο 11,4, έναντι 6,7 της ανθεκτικής, για το σύνολο των 7 ημερών. Φαίνεται, επομένως, ότι η αύξηση του πληθυσμού της ανθεκτικής κυτταρικής σειράς επιτελείται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με την πατρική, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως σε ενεργοποίηση κάποιου προγράμματος κυτταρικού θανάτου ή σε αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο των ανθεκτικών κυττάρων.

A)



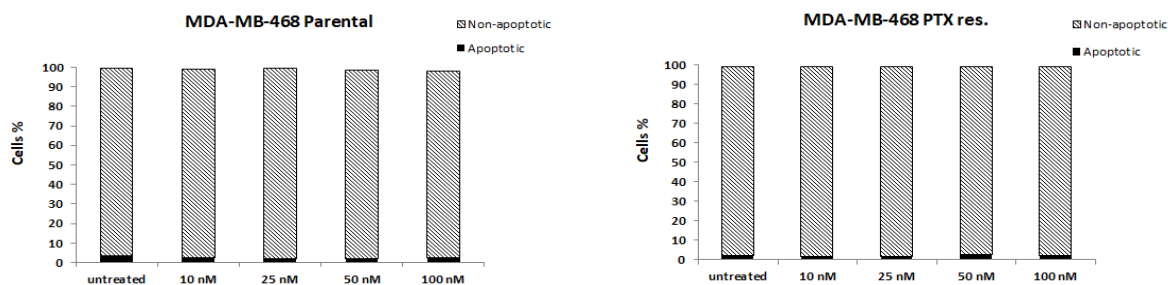
B)



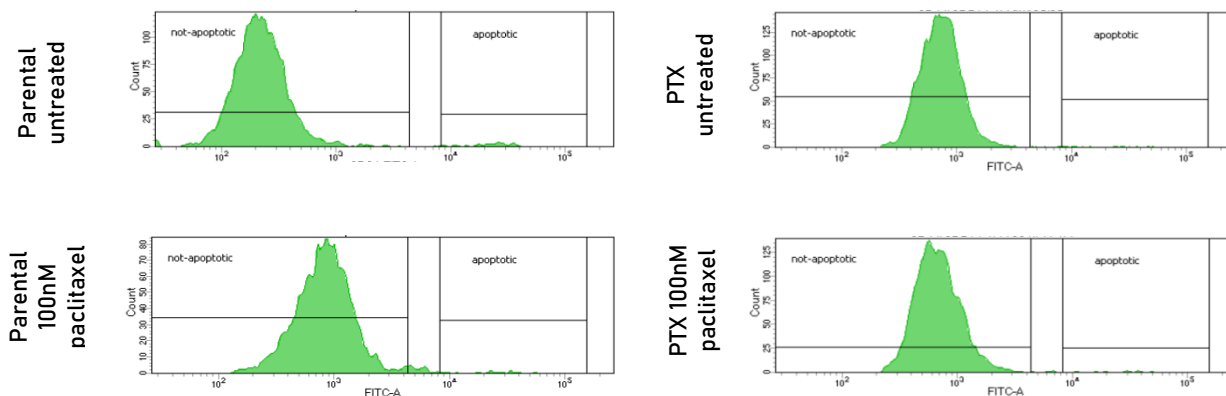
Εικόνα 3.3 Κυτταρική αύξηση πατρικής και ανθεκτικής σειράς. Α) Δοκιμασία αύξησης κυτταρικού πληθυσμού για την πατρική και την ανθεκτική σειρά. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτο 96-θέσεων σε δυάδες, το μέσο καλλιέργειας ανανεώνονταν κάθε 2 ημέρες και η κυτταρική πυκνότητα προσδιορίστηκε μέσω του Incucyte zoom live imaging system για 7 ημέρες. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων ($p\text{-value}<0,001$). Β) Ρυθμός μεταβολής (growth rate) του πληθυσμού της πατρικής και ανθεκτικής σειράς για κάθε μία ημέρα από τις 7 συνολικά βάσει της καμπύλης ανάπτυξης. Ο ρυθμός μεταβολής κάθε ημέρας προέκυψε από την διαφορά της πυκνότητας της μίας ημέρας από την προηγούμενη, ενώ υπολογίστηκε και ο μέσος όρος αυτών για την κάθε σειρά.

Πρώτο στάδιο στη διερεύνηση του μηχανισμού, πίσω από την διαφορά του ρυθμού αύξησης του πληθυσμού των δύο σειρών, ήταν η μελέτη της ύπαρξης αποπτωτικών κυττάρων. Η απόπτωση αποτελεί τον πιο συνηθισμένο μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς με διαφορετικές συγκεντρώσεις του φάρμακου πακλιταξέλη και στην συνέχεια χρώση των κυττάρων με ανεξίνη V (Annexin V-FITC). Η ανεξίνη προσδέεται στα μόρια φωσφατιδυλοσερίνης, φωσφολιπίδια που εμφανίζονται εκτεθειμένα μόνο στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων, κάνοντας έτσι ικανό τον εντοπισμό τους στο κυτταρόμετρο. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε το φάρμακο πακλιταξέλη σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100nM για 6 και 48 ώρες και τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 3.5 και 3.6 αντίστοιχα. Όπως γίνεται εμφανές και στα αποτελέσματα, δεν φαίνεται να υπάρχουν αποπτωτικοί πληθυσμοί κυττάρων, ούτε στην πατρική, ούτε στην ανθεκτική σειρά, σε καμία από τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις. Ενδεικτικά, στις εικόνες 3.5B & 3.6B, φαίνονται οι καμπύλες που προκύπτουν από το κυτταρόμετρο για την συνθήκη ελέγχου (untreated) και την μεγαλύτερη συγκέντρωση που χορηγήθηκε (100nM) στην πατρική και την ανθεκτική σειρά. Παρατήρηση των δύο κυτταρικών σειρών, καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας τους, δεν έδειξε αυξημένη εμφάνιση νεκρών κυτταρικών πληθυσμών στην ανθεκτική σειρά, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την απουσία αποπτωτικών κυττάρων και πιθανώς και κάποιας άλλης μορφής κυτταρικού θανάτου.

A)

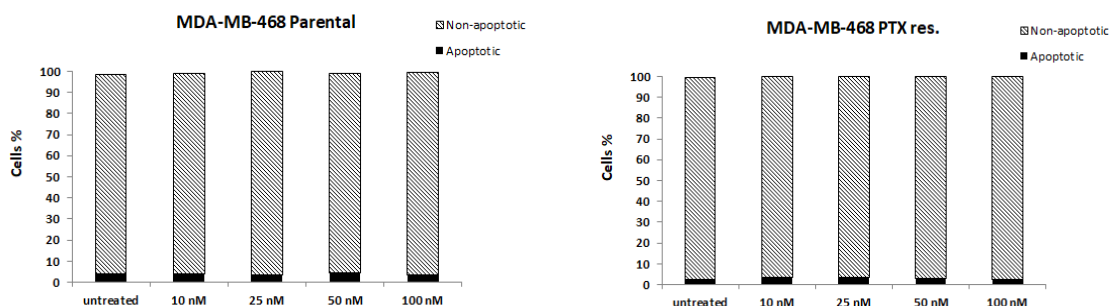


B)

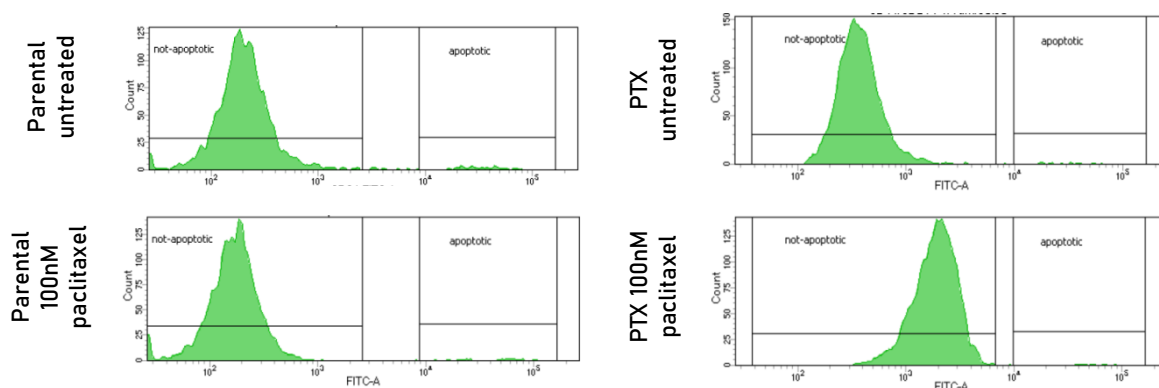


Εικόνα 3.4 Προσδιορισμός αποπτωτικού πληθυσμού στην πατρική και ανθεκτική σειρά. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πακλιταξέλης για 6 ώρες και ο αποπτωτικός πληθυσμός προσδιορίστηκε με την μέθοδο της ανεξίνης V (Annexin V-FITC). Α) Γραφική απεικόνιση ποσοστών αποπτωτικού πληθυσμού. Β) Ενδεικτικά διαγράμματα από το κυτταρόμετρο μετά τη χορήγηση 100 nM πακλιταξέλης και έλεγχου για απόπτωση.

A)

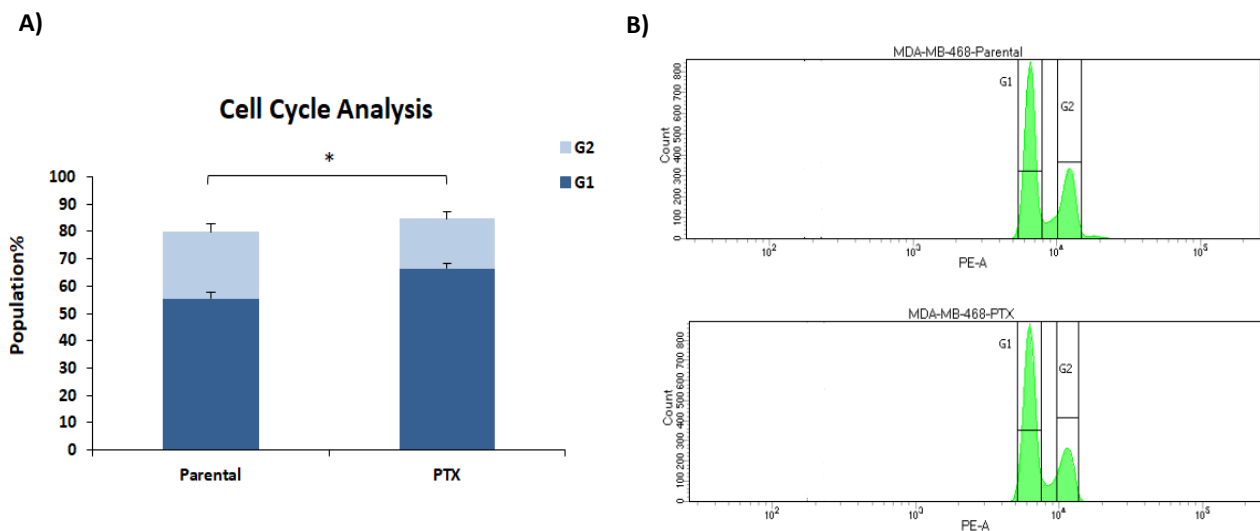


B)



Εικόνα 3.5 Προσδιορισμός αποπτωτικού πληθυσμού στην πατρική και ανθεκτική σειρά. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πακλιταξέλης για 48 ώρες και ο αποπτωτικός πληθυσμός προσδιορίστηκε με την μέθοδο της ανεξίνης V (Annexin V-FITC). Α) Γραφική απεικόνιση ποσοστών αποπτωτικού πληθυσμού. Β) Ένδειξη αποπτωτικού πληθυσμού από εικόνες κυτταρόμετρου.

Η πακλιταξέλη, όπως προαναφέρθηκε, είναι γνωστό ότι παρεμβαίνει στην δομή του κυτταροσκελετού, παρεμποδίζοντας βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. Με γνώμονα το μηχανισμό δράσης της πακλιταξέλης και την απουσία αποπτωτικού θανάτου, θελήσαμε να διερευνήσουμε πιθανές διαφορές στον κυτταρικό κύκλο μεταξύ των πατρικών και των ανθεκτικών κυττάρων. Συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων και από τις δύο σειρές μελετήθηκε στο κυτταρόμετρο, μετά από χρώση του DNA με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το ιωδιούχο προπίδιο είναι ένας κόκκινος φθορίζων παράγοντας, που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε μεθόδους εντοπισμού και ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων. Στην περίπτωση της μελέτης του κυτταρικού κύκλου, ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων σε κάθε φάση, γίνεται μέσω της έντασης του φθορισμού του ιωδιούχου προπιδίου, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA στα κύτταρα. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα 3.7A, το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκεται στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, παρουσιάζει μια αύξηση της τάξεως του 10% (p -value < 0,05), από 55,7% στην πατρική σειρά σε 66,6% στην ανθεκτική. Γίνεται δηλαδή αντιληπτό, ότι ένα αυξημένο ποσοστό των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς παραμένει στην φάση G1, με συνέπεια την παρεμπόδιση της πρόοδου του κυτταρικού κύκλου. Δεδομένου ότι η διαφορά αυτή φαίνεται να είναι και στατιστικά σημαντική (p -value<0,05), η αύξηση του ποσοστού στην φάση G1 των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς, θα μπορούσε να αποτελεί μια εξήγηση στην παρατηρούμενη διαφορά στον ρυθμό κυτταρικής αύξησης μεταξύ των δύο σειρών.



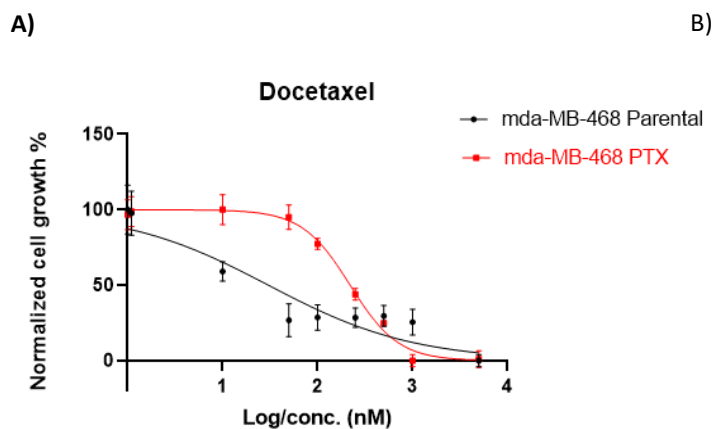
Εικόνα 3.6 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου πατρικής και ανθεκτικής σειράς. Κύτταρα της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς μελετήθηκαν στο κυτταρόμετρο για τον εντοπισμό του ποσοστού των κυττάρων στις φάσεις G1 και G2 του κυτταρικού κύκλου μετά από χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). A) Διάγραμμα κυτταρομέτρου για το ποσοστό των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. B) Γραφική απεικόνιση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*: p -value < 0,05).

3.3 Διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε χημειοφάρμακα

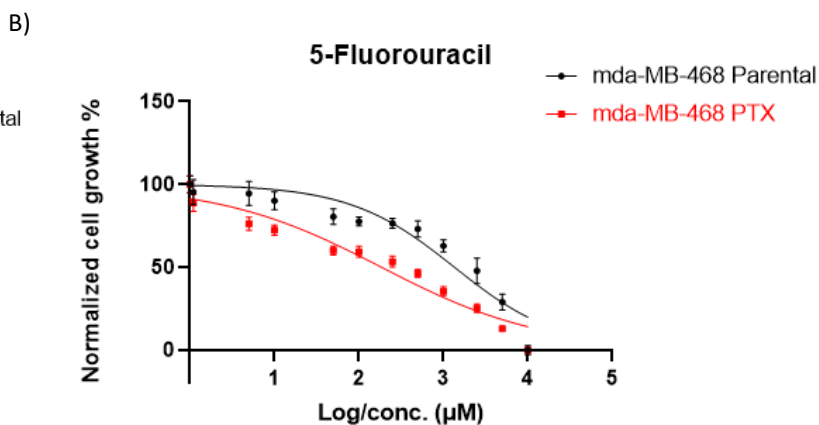
Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία (Bukowski et al. 2020) (Assaraf et al. 2019) (Ji et al 2019), ότι οι χημειοανθεκτικές σειρές συχνά εμφανίζουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα και σε άλλα φάρμακα. Θελήσαμε, λοιπόν, να διερευνήσουμε πώς ανταποκρίνεται η δική μας ανθεκτική σειρά στην χορήγηση άλλων γνωστών και ευρέως χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα φάρμακα δοσεταξέλη, δοξορουβικίνη και 5-φθοροουρακίλη. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.1, με το φάρμακο πακλιταξέλη και προσδιορίστηκε το IC_{50} του κάθε φαρμάκου για την πατρική (Parental) και την ανθεκτική σειρά (PTX res.) MDA-MB-468.

Η δοσεταξέλη είναι ένα φάρμακο της οικογένειας των ταξανών, όπως και η πακλιταξέλη και επομένως διαθέτουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.8A, η ανθεκτική σειρά εμφανίζει μεγαλύτερη χημειοανθεκτικότητα στην δοσεταξέλη, με περίπου 7 φορές μεγαλύτερη τιμή IC_{50} από την πατρική (220,8nM έναντι 30,48nM). Μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το γεγονός αυτό λογικό, δεδομένου ότι τόσο η πακλιταξέλη όσο και η δοσεταξέλη, δρουν στοχεύοντας στη σταθεροποίηση της δομής των μικροσωληνίσκων, επομένως η ανθεκτική σειρά στο ένα φάρμακο (πακλιταξέλη) θα περιμέναμε να εμφανίζει ανθεκτικότητα και σε άλλα της ίδιας οικογένειας (δοσεταξέλη). Όμως, ενώ στη πατρική σειρά, οι τιμές IC_{50} των δύο φαρμάκων είναι σχεδόν ίδιες (20,87 nM στην πακλιταξέλη και 30,48 nM στην δοσεταξέλη), στην ανθεκτική σειρά το IC_{50} της πακλιταξέλης (436,7 nM) είναι σχεδόν διπλάσιο από αυτό της δοσεταξέλης (220,8 nM) (εικόνα 3.2A, εικόνα 3.8A). Η δοσεταξέλη είναι ένα φάρμακο μεταγενέστερο της πακλιταξέλης, με αυξημένη συγγένεια για την θέση δέσμησης στην μονάδα της τουμπουλίνης και υψηλότερη απόδοση ως προς την συγκέντρωση και την διάρκεια παραμονής στο εσωτερικό των κυττάρων (Jones 2006). Επομένως, δικαιολογημένα, τα κύτταρα της ανθεκτικής PTX res. σειράς εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην δοσεταξέλη, συγκριτικά με την πακλιταξέλη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η απόκριση της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς στην 5-φθοροουρακίλη. Ενώ η πατρική σειρά εμφανίζει τιμή IC_{50} της τάξεως των mM (1,36 mM), η αντίστοιχη τιμή της ανθεκτικής σειράς φαίνεται να μειώνεται έως και 7 φορές (186,5 μ M). Επομένως, η περίπτωση της 5-φθοροουρακίλης διαφοροποιείται συγκριτικά με τα ως τώρα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, με την ανθεκτική σειρά να εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στο φάρμακο αυτό από την πατρική (εικόνα 3.8B). Η 5-φθοροουρακίλη δρα ως ανάλογο της πυριμιδινικής ουρακίλης και παρεμβάλλεται στην αλληλουχία του DNA, παρεμποδίζοντας την αντιγραφή και τη φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, ανταγωνίζεται το φυσιολογικό υπόστρωμα dUMP για την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου θυμιδική συνθάση (FS), με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την πορεία βιοσύνθεσης πυριμιδινών, που αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA. Σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την πορεία δράσης της 5-φθοροουρακίλης πιθανότατα να είναι αλλαγμένα στην ανθεκτική σειρά εξηγώντας την παρατηρούμενη ευαισθησία στο φάρμακο αυτό (βλ. Ενότητα 3.3).



IC ₅₀ Docetaxel (nM)	MDA-MB-468 Parental	30,48 +/- 7,2
	MDA-MB-468 PTX res.	220,8 +/- 54,38

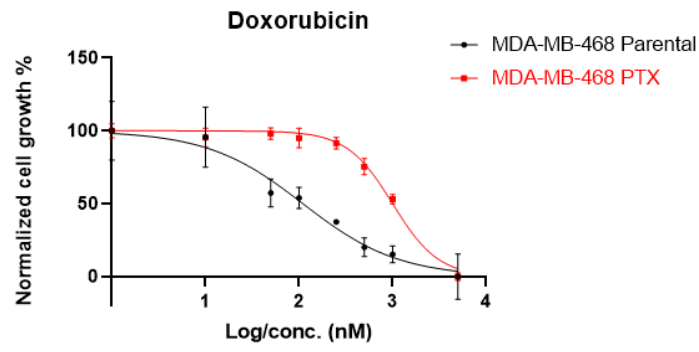


IC ₅₀ 5-FU (µM)	MDA-MB-468 Parental	186,5 +/- 37,8
	MDA-MB-468 PTX res.	1360 +/- 59,4

Εικόνα 3.7 Διασταυρούμενη χημειοανθεκτικότητα. Η πατρική και η ανθεκτική σειρά επιστρώθηκαν σε πιάτο 96-θέσεων σε δυάδες και χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις δοσεταξέλης (A) ή 5-φθοριουρακίλης (B) για 48 ώρες. Η κυτταρική πυκνότητα υπολογίστηκε μέσω του Incucyte Zoom live imaging system και η τιμή του IC₅₀ μέσω του Graphpad Prism 8.01. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (p-value < 0,05, p-value < 0,001).

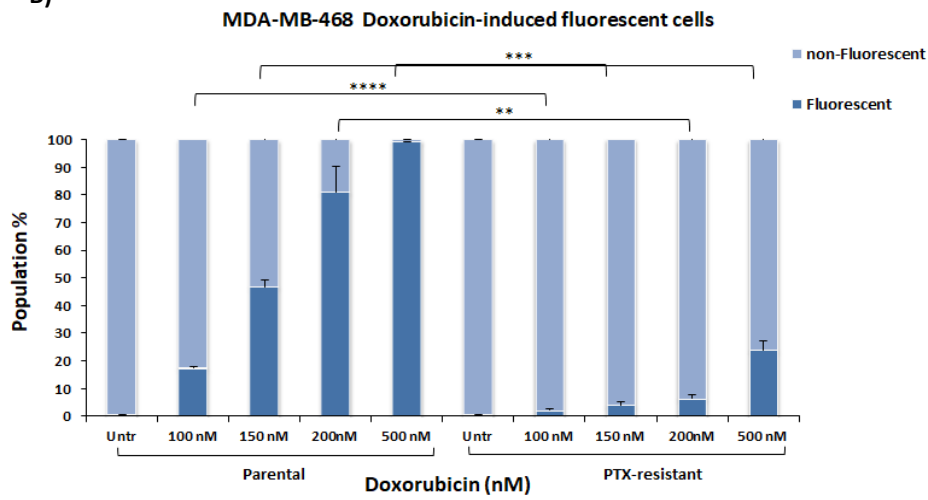
Η δοξορουβικίνη είναι ένα ακόμα ευρέως χρησιμοποιούμενο χημειοφάρμακο, το οποίο δρα αναστέλλοντας την λειτουργία της τοποϊσομεράσης II. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.9A, η ανθεκτική σειρά έχει εμφανώς μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην δοξορουβικίνη, με τιμή IC₅₀ σχεδόν δεκαπλάσια από την πατρική (1 µM έναντι 110,7 nM). Για να διερευνήσουμε περισσότερο αυτό το αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής στην πατρική και την ανθεκτική σειρά, μετά από επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Η δοξορουβικίνη εντοπίζεται μέσω κυτταρομετρίας ροής λόγω της φθορίζουσας φύσης της. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι σε όλες τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις το ποσοστό των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς που έχουν προσλάβει το φάρμακο, είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό της πατρικής (εικόνα 3.9B & 3.9Γ). Ειδικά στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, τα 500 nM, 99,2% των κυττάρων της πατρικής σειράς είναι θετικά για το φάρμακο (fluorescent), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό της ανθεκτικής σειράς είναι πολύ χαμηλότερο (23,9%). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξαρτάται από διαφορετικούς μηχανισμούς χημειοανθεκτικότητας των κυττάρων, όπως η μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης, η αύξηση των αντλιών εκροής φαρμάκου στην επιφάνεια τους, ή ακόμα και η ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών αποτοξίνωσης του κυττάρου.

A)

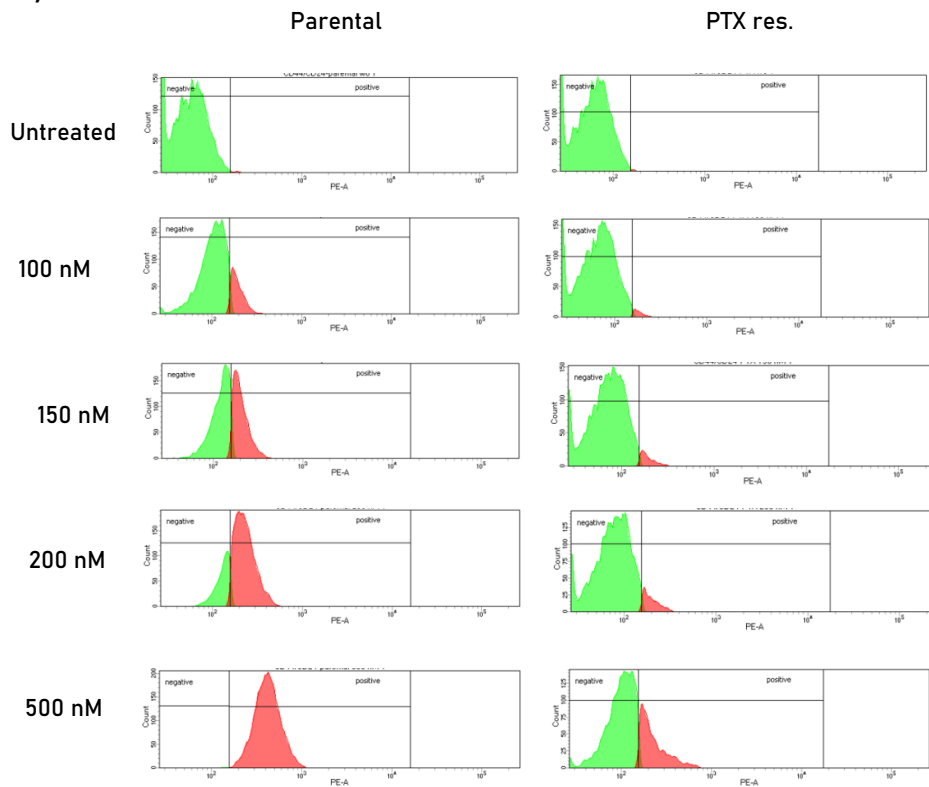


IC50 Doxorubicin (nM)	MDA-MB-468 Parental	110,7 +/- 22,96
	MDA-MB-468 PTX res.	1004 +/- 56,61

B)



Γ)

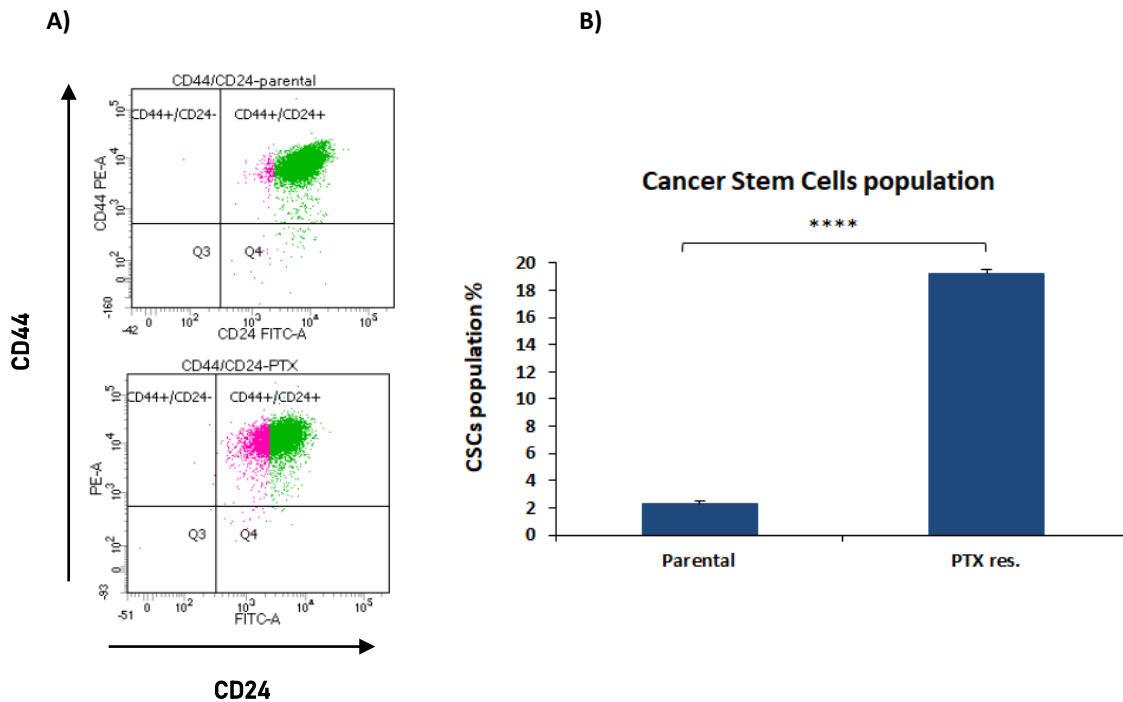


Εικόνα 3.8 Χημειοανθεκτικότητα στην δοξορουβικίνη. Α) Η πατρική και η ανθεκτική σειρά επιστρώθηκαν σε πιάτο 96-θέσεων σε δυάδες και χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 48 ώρες. Η κυτταρική πυκνότητα υπολογίστηκε μέσω του Incucyte Zoom live imaging system και η τιμή του IC50 μέσω του Graphpad Prism 8.01. Β) Προσδιορισμός του ενδοκυττάριου φαρμάκου (δοξορουβικίνη) 6 ώρες μετά από την χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (**: p-value < 0,01, ***: p-value < 0,005, ****: p-value < 0,001).

Συνολικά, φαίνεται ότι η ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας σε μία κυτταρική σειρά έναντι ενός φαρμάκου, επιφέρει αλλαγές σε πολλές διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες των κυττάρων, οι οποίες μπορούν τόσο να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα τους σε μία σειρά άλλων φαρμάκων, όσο και να τα ευαισθητοποιήσουν απέναντι σε άλλα. Η διερεύνηση του μεταγραφικού προφίλ των προς μελέτη κυττάρων και η επιμέρους εξερεύνηση των μονοπατιών και των βιολογικών διαδικασιών που σχετίζονται με αυτό, θα μπορούσαν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς πίσω από την απόκριση των κυττάρων στο εκάστοτε χορηγούμενο φάρμακο.

3.4 Μελέτη του πληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην πατρική (parental) και ανθεκτική (PTX res.) σειρά MDA-MB-468

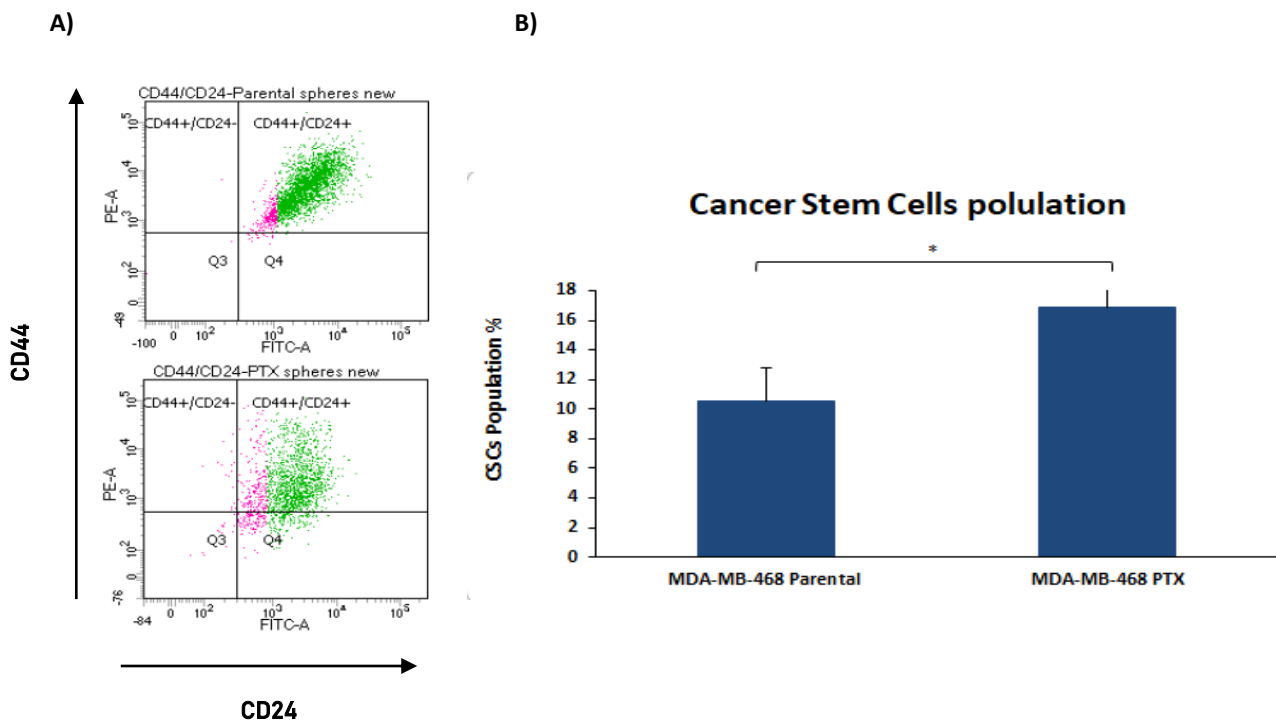
Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο πληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων αποτελεί βασικό παράγοντα της χημειοανθεκτικότητας (ενότητα 1.6.7) Για τον λόγο αυτό, θελήσαμε να ελέγξουμε τα ποσοστά των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην 2D καλλιέργεια (attached). Τα κύτταρα της πατρικής και την ανθεκτικής σειράς καλλιεργήθηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες και ακολούθησε χρώση για τους δείκτες CD44 και CD24, όπως έχει περιγραφεί. Τα δείγματα οδηγήθηκαν στο κυτταρόμετρο, ώστε να προσδιοριστεί ο υποπληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CD44⁺/CD24^{-low}), όπου το αποτέλεσμα εμφάνισε ιδιαίτερο ενδιαφέρον (εικόνα 3.9). Το ποσοστό του υποπληθυσμού στην πατρική σειρά, όπως ήταν και αναμενόμενο, ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλό επίπεδο, μόλις 2,3%. Αντίθετα, στην ανθεκτική σειρά η αύξηση του υποπληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ήταν θεαματική, με ποσοστό 19,1%, δηλαδή σχεδόν 9 φορές πάνω από την πατρική σειρά (p-value<0,001). Η σημαντική αυτή διαφορά τονίζει την πιθανή συμβολή του υποπληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον φαινότυπο της ανθεκτικής σειράς και την ύπαρξη μηχανισμών και μονοπατιών βλαστικού χαρακτήρα που μπορεί να παίζουν ενεργό ρόλο στην παρατηρούμενη χημειοανθεκτικότητα.



Εικόνα 3.9 Προσδιορισμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων, KBK (CSCs) στην 2D καλλιέργεια (attached cell culture). Κύτταρα της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς μελετώνται στο κυτταρόμετρο για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, KBK στην 2D καλλιέργεια μετά από χρώση για τους επιφανειακούς δείκτες CD44, CD24 (CD44⁺/CD24^{-/low}). A) Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής. B) Γραφική απεικόνιση του πληθυσμού των KBK στις δύο σειρές. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (****:p-value <0,001).

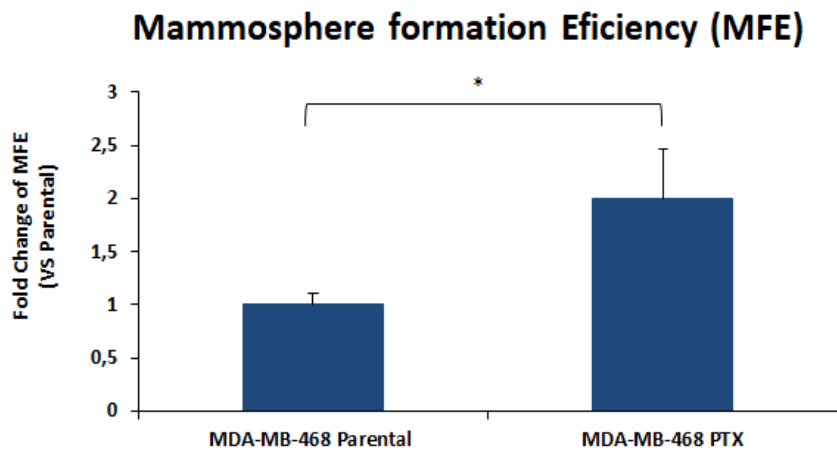
Σε συνέχεια του αποτελέσματος που είδαμε για τον πληθυσμό των KBK στην 2D καλλιέργεια, θελήσαμε να προσδιορίσουμε και την βλαστικότητα μέσω μιας 3D καλλιέργειας μαμμόσφαιρων (mammospheres formation assay). Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη λειτουργική δοκιμασία για τον προσδιορισμό της βλαστικότητας, επιτρέποντας τον εμπλουτισμό της καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων σε βλαστικά κύτταρα και κάνοντας την μελέτη τους ευκολότερη. Οι σφαίρες καλλιεργούνται 7 ημέρες υπό ειδικές συνθήκες, όπως έχουν περιγραφεί στην ενότητα 2.6. Ο υποπληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων εντοπίζεται στην συνέχεια με χρήση ορισμένων χαρακτηριστικών δεικτών επιφάνειας, στην προκειμένη περίπτωση των CD24 και CD44, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Επιπλέον, από την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας των σφαιρών και μετά, μετριέται καθημερινά ο αριθμός των σφαιρών σε κάθε συνθήκη, βάσει του οποίου προσδιορίζεται η ικανότητα σχηματισμού σφαιρών (Mammosphere formation efficiency, MFE). Το MFE αποτελεί δείκτη της βλαστικότητας του υπό μελέτη πληθυσμού κυττάρων. Παρατηρώντας την εικόνα 3.10A, βλέπουμε ότι ο πληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (ροζ υποπληθυσμός), ο οποίος χαρακτηρίζεται από τον φαινότυπο CD44⁺/CD24^{-/low} (AI-

Hajj et al. 2003), αυξάνεται σημαντικά στην ανθεκτική σειρά συγκριτικά με την πατρική. Πιο συγκεκριμένα, από 10,5% στην πατρική σειρά αυξάνει σε 16,9% στην ανθεκτική σειρά, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (εικόνα 3.10B), γεγονός που μας δείχνει ότι η ανθεκτική σειρά είναι εμπλουτισμένη σε βλαστικά κύτταρα. Επίσης, από τη μέτρηση των σφαιρών την έβδομη ημέρα (εικόνα 3.11A), προκύπτει ότι η ανθεκτική σειρά εμφανίζει σχεδόν διπλάσιο αριθμό σφαιρών, μετά το πέρας επτά ημερών, σε σύγκριση με την πατρική, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στις εικόνες του μικροσκοπίου (εικόνα 3.11B). Οι παρατηρήσεις αυτές σε επίπεδο καλλιέργειας σφαιρών, δηλαδή, η αύξηση του πληθυσμού των KBK και η αυξημένη ικανότητα σχηματισμού σφαιρών στην ανθεκτική σειρά, επιβεβαιώνουν το αποτέλεσμα της 2D καλλιέργειας δίνοντας ένα ακόμα στοιχείο για τον ρόλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην χημειοανθεκτικότητα.



Εικόνα 3.10 Προσδιορισμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων, KBK (CSCs) με την μέθοδο 3D καλλιέργειας σφαιρών (Mammosphere formation assay). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλο μέσο, εμπλουτισμένο με αυξητικούς παράγοντες και σε ειδικά πιάτα για 7 ημέρες. Την έβδομη ημέρα μετρείται ο μέσος όρος του αριθμού των σφαιρών σε κάθε συνθήκη (mammosphere formation) A) Προσδιορισμός του υποπληθυσμού των KBK με κυτταρομετρία ροής με χρήση των δεικτών CD44, CD24. Ο υποπληθυσμός των KBK χαρακτηρίζεται από τον φαινότυπο CD44⁺/CD24^{-low}. B) Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των KBK. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*:p-value < 0,05).

A)



B)

MDA-MB-468 Parental



MDA-MB-468 PTX res.



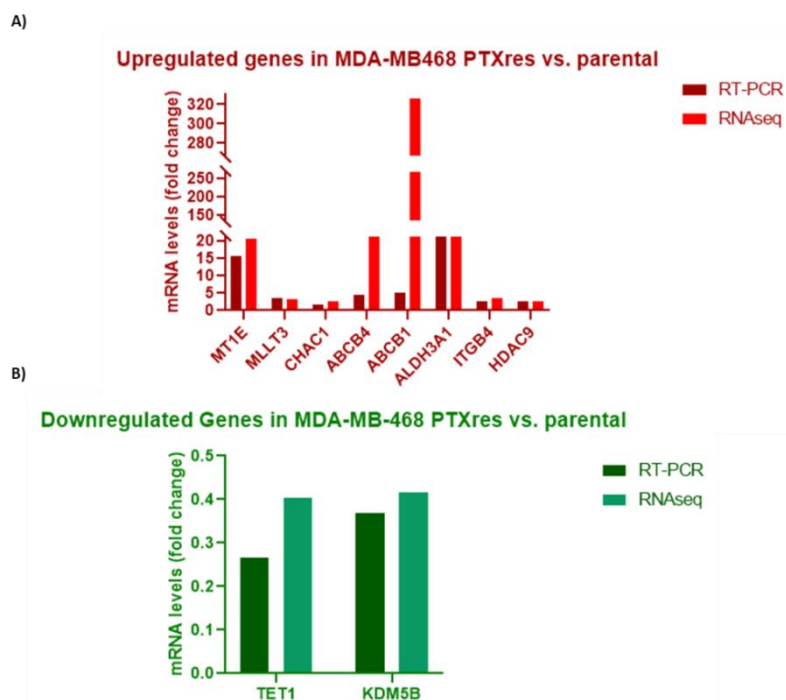
Εικόνα 3.11 Προσδιορισμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων, KBK (CSCs) με την μέθοδο 3D καλλιέργειας σφαιρών (Mammosphere formation assay). A) Διάγραμμα απεικόνισης της ικανότητας σχηματισμού σφαιρών (mammosphere formation efficiency, MFE) των δύο σειρών. B) Εικόνες σφαιρών έβδομης ημέρας από το οπτικό μικροσκόπιο. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*:p-value < 0,05).

3.5 Μελέτη του μεταγραφικού προφίλ της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς MDA-MB-468 μέσω αλληλούχισης RNA (RNA-sequencing)

Όπως φάνηκε στα έως τώρα αποτελέσματα, η ανθεκτική σειρά (PTX res.) παρουσιάζει αρκετές διαφορές από την πατρική και δείχνει να έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν στην χημειοανθεκτικότητα που εμφανίζει. Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στην διερεύνηση του μεταγραφικού προφίλ των δύο σειρών, της πατρικής και την ανθεκτικής, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πίσω από τις παρατηρούμενες διαφορές, αλλά και την εύρεση γονιδίων πιθανά κομβικής σημασίας για την χημειοανθεκτική σειρά. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε αλληλούχιση του RNA (RNA seq.) των δυο σειρών.

3.5.1 Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων αλληλούχισης RNA (RNA-seq) μέσω RT-PCR

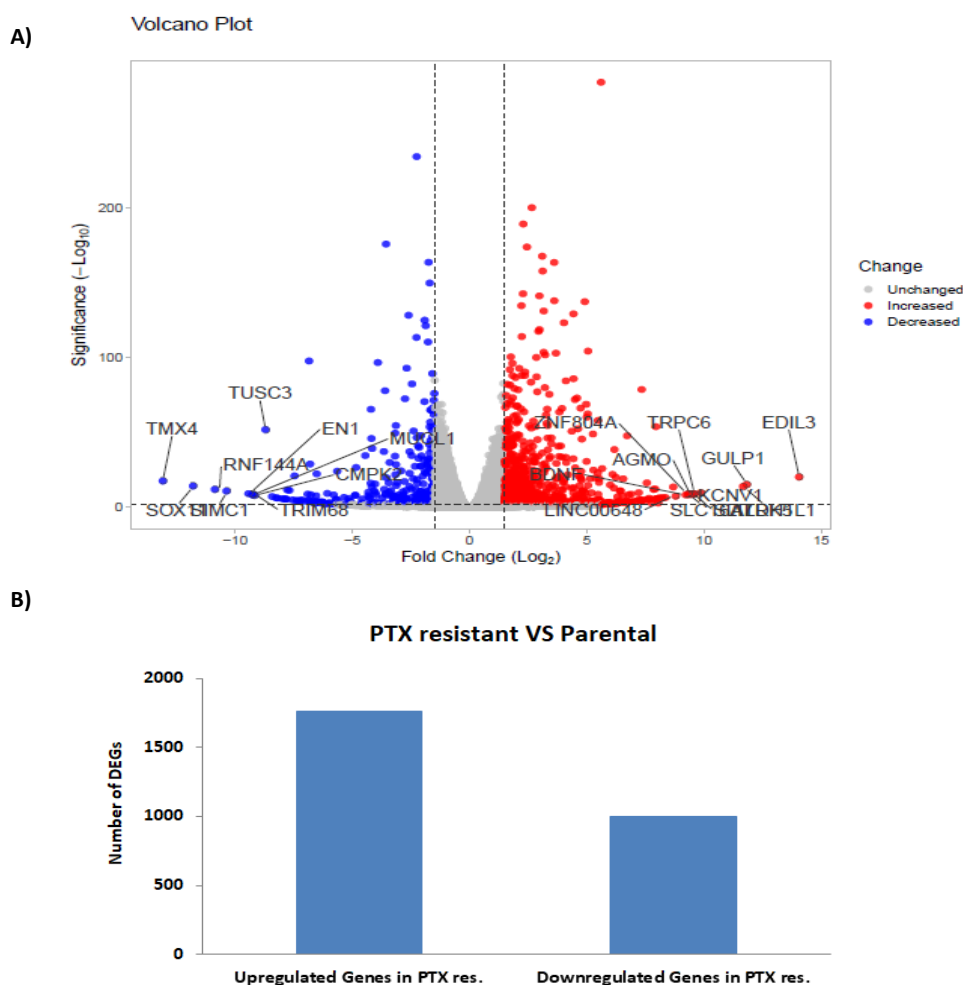
Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση του RNA, επιλέχθηκαν γονίδια με διαφορετική έκφραση μεταξύ πατρικής και ανθεκτικής σειράς, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης ελέγχθησαν και με RT-PCR. Στην εικόνα 3.12, φαίνονται τα επίπεδα mRNA των γονιδίων, όπως προκύπτουν από το RNA-seq και την RT-PCR. Επιλέξαμε να εξετάσουμε τόσο γονίδια που υπερεκφράζονταν (Εικ. 3.12A) όσο και γονίδια που εμφάνιζαν μειωμένη έκφραση στην ανθεκτική σειρά (Εικ. 3.12B) σε σύγκριση με την πατρική. Όπως φαίνεται, οι τιμές που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους συμφωνούν, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του RNA-seq.



Εικόνα 3.12 Σύγκριση αποτελεσμάτων RNA-seq και RT-PCR για τα επίπεδα mRNA γονιδίων που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ πατρικής (Parental) και ανθεκτικής (PTX res.) σειράς. Στην RT-PCR τα επίπεδα mRNA κανονικοποιούνται βάσει των επιπέδων του γονιδίου αναφοράς, GAPDH, ενώ στο διάγραμμα απεικονίζεται η σχετική έκφραση στην ανθεκτική σειρά συγκριτικά με την πατρική. Α) Επίπεδα mRNA γονιδίων που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά. Β) Επίπεδα mRNA γονιδίων που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά.

3.5.2 Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης RNA (RNA-seq.) και επιλογή γονιδίων με διαφορετική έκφραση μεταξύ πατρικής και ανθεκτικής σειράς (DEGs)

Μέσω RNA-seq έγινε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης 27.968 γονιδίων, όπως φαίνονται στην εικόνα 3.13A (Volcano plot). Βιοπληροφορική ανάλυση μέσω του πακέτου DESeq2 προσδιόρισε τα γονίδια που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορετική έκφραση (Differentially Expressed Genes, DEGs) μεταξύ πατρικής και χημειοανθεκτικής σειράς. Στο Volcano plot (εικόνα. 3.13A) φαίνονται με κόκκινο και μπλε χρώμα τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται στη χημειοανθεκτική σειρά συγκριτικά με την πατρική αντίστοιχα, ενώ με γκρι χρώμα είναι τα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταξύ των δύο σειρών δεν εμφανίζει σημαντική διαφορά. Επιπλέον, στο ίδιο διάγραμμα, φαίνονται και τα γονίδια που εμφανίζουν την μεγαλύτερη διαφορά έκφρασης μεταξύ των δύο σειρών, όπως τα TRPC6, KCNV1, SOX11, και EDIL3. Συνολικά, μετά την επεξεργασία των επιπέδων έκφρασης των 27.968 γονιδίων, προέκυψαν 1759 γονίδια, που υπερεκφράζονται και 999 γονίδια, που υποεκφράζονται, στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.13B).



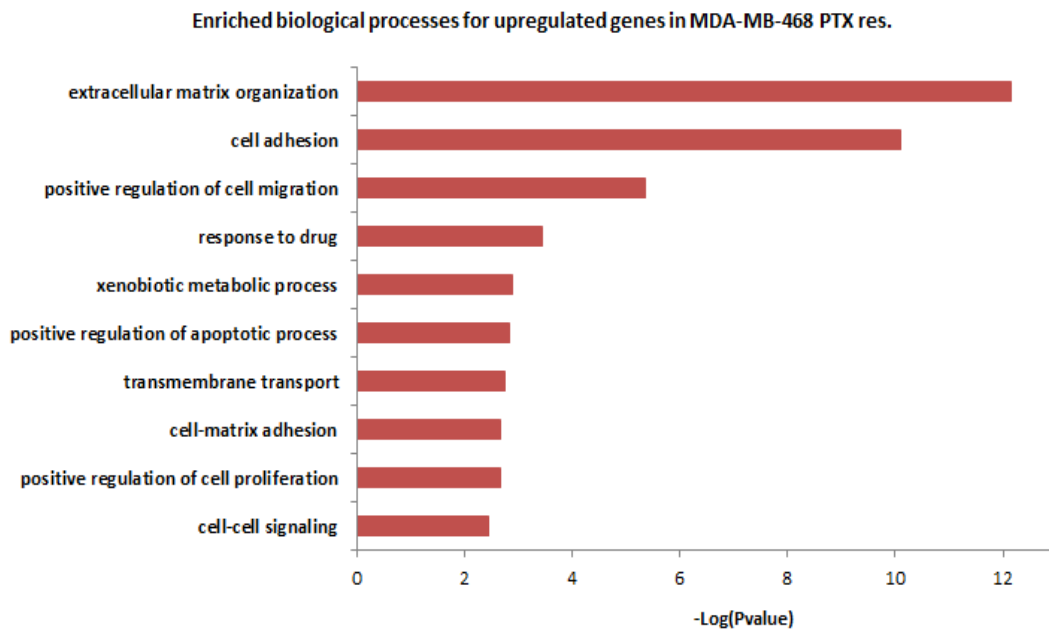
Εικόνα 3.13 Ανάλυση του μεταγραφώματος της πατρικής (Parental) και ανθεκτικής σειράς (PTX res.) μέσω RNA-seq. A) Volcano plot (p -value vs. $\log_2(\text{FoldChange})$). Απεικόνιση του συνόλου των 27.968 γονιδίων που προέκυψαν από την αλληλούχιση του RNA. Τα γονίδια που εμφανίζουν σημαντική διαφορά στην έκφραση φαίνονται με κόκκινο, για αυτά που υπερεκφράζονται και μπλε για όσα υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά ($\text{padj} < 0,01$, $\text{FoldChange} > 2$). Αναγράφονται τα ονόματα των γονιδίων με το μεγαλύτερο Fold-Change. B) Διάγραμμα απεικόνισης μόνο των DEGs, 1759 γονίδια υπερεκφράζονται (upregulated) και 999 γονίδια υποεκφράζονται (downregulated) στην ανθεκτική σειρά (PTX res.).

3.5.3 Ανάλυση οντολογιών γονιδίων (Gene ontologies, GO)

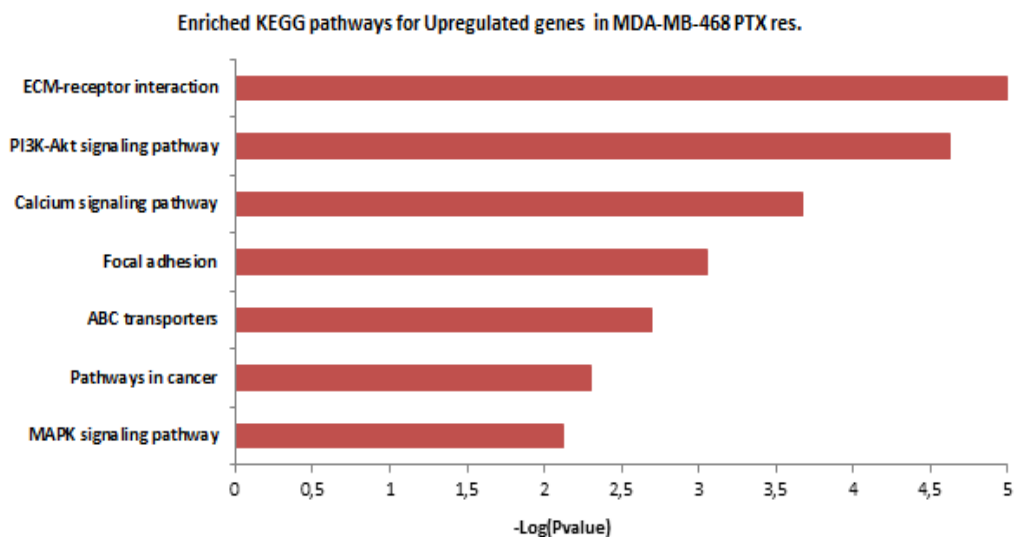
Οντολογίες γονιδίων που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (Upregulated genes in PTX res. cell line)

Εν συνεχεία της ανάλυσης των δεδομένων του RNA seq. και της εύρεσης γονιδίων με σημαντικά διαφορετική έκφραση (DEGs) στις δύο σειρές, θελήσαμε να εμβαθύνουμε και να ταυτοποιήσουμε ομάδες γονιδίων με παρόμοια βιολογική λειτουργία και κοινά μοτίβα έκφρασης, που θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη χημειοανθεκτικότητα. Η ανάλυση οντολογιών γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος DAVID, το οποίο αποτελεί ένα βιοπληροφορικό εργαλείο που ομαδοποιεί την εισερχόμενη πληροφορία (συνήθως λίστα γονιδίων), βάσει του βαθμού ομοιότητας των βιολογικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών τους. Η εικόνα 3.14A απεικονίζει τις πιο σημαντικές βιολογικές διαδικασίες (biological processes), στις οποίες συμμετέχουν γονίδια, που υπερεκφράζονται (upregulated) στην ανθεκτική σειρά (PTX res.). Παρατηρούμε ότι η οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular matrix organization) εμφανίζεται πρώτη, ως πιο σημαντική διαδικασία, στη λίστα, ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στα φάρμακα (response to drug) και τον μεταβολισμό ξενοβιοτικών (xenobiotics metabolism).

A)



B)



Εικόνα 3.14 Ανάλυση οντολογιών γονιδίων (Gene ontologies. GO) για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (PTX res.). 1759 γονίδια που εμφανίζουν αυξημένη έκφραση στην ανθεκτική σειρά (upregulated) από τα DEGs, μελετήθηκαν μέσω του προγράμματος DAVID με σκοπό να εντοπιστούν πιθανές βιολογικές ομάδες και μονοπάτια που συνδέονται με αυτά. A) Οι πιο στατιστικά σημαντικές βιολογικές διαδικασίες (biological processes). B) Τα πιο στατιστικά σημαντικά μονοπάτια (KEGG pathways). (p -value<0,05)

Στα αποτελέσματά μας παρατηρούμε κάποιες βιολογικές διαδικασίες και μονοπάτια με παρόμοια βιολογική δράση, όπως η «οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας» (extracellular matrix organization), η «προσκόλληση κυττάρων-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας» (cell-matrix adhesion) και η «αλληλεπίδραση υποδοχέων-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας» (ECM-receptor interaction). Σε αυτές τις ομάδες εντοπίζουμε γονίδια της οικογένειας των ιντεγκρινών, όπως τα ITGB4, ITGA3, ITGA1 και ITGBL1, που αποτελούν βασικούς διαμεμβρανικούς παράγοντες της επικοινωνίας κυττάρων-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μεταφέροντας καθοδικά σήματα για τον έλεγχο της έκφραση γονιδίων στον πυρήνα των κυττάρων (Anderson, Owens, and Naylor 2014). Επιπλέον, σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών (matrix metalloproteinases, MMPs), που είναι ένζυμα, με ενεργότητα ενδοπεπτιδάσης, και συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, χάρη στην ικανότητα του να καταστρέφουν παράγοντες, όπως κυτοκίνες, ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες (Li et al. 2018). Εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, όπως η εμβρυογένεση, η αγγειογένεση και η επιδιόρθωση των ιστών και κατηγοριοποιούνται σε διάφορες λειτουργικές ομάδες, ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος που καταλύουν (Cabral-Pacheco et al. 2020). Η αυξημένη έκφραση τους στον καρκίνο, έχει συνδεθεί με αυξημένες μεταστατικές ικανότητες (Karoor et al. 2016). Αρκετά μέλη των μεταλλοπρωτεϊνών εμφανίζονται υπερεκφρασμένα στην ανθεκτική σειρά (MMP28, MMP14, MMP24). Όλες οι παραπάνω διαδικασίες, σχετίζονται άμεσα με την οργάνωση και αλληλεπίδραση των κυττάρων με τον εξωκυττάριο χώρο.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.14A, μπορούμε να εντοπίσουμε κάποιες επιπλέον βιολογικές διαδικασίες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανθεκτική σειρά. Η «απόκριση στο φάρμακο» (response to drug), ο «μεταβολισμός Ξενοβιοτικών» (xenobiotics metabolism) και η «διαμεμβρανική μεταφορά» (transmembrane transport), φαίνεται να είναι τρεις ομάδες γονιδίων που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά. Σε αυτές περιλαμβάνονται αρκετά μέλη της οικογένειας των ABC αντλιών, όπως οι ABCB1, ABCC1, ABCB4, ABCC3 και ABCC6, ενώ τα επίπεδα mRNA δύο εξ αυτών, των ABCB1 και ABCB4 φαίνονται στην εικόνα 3.12A. Επίσης, ανάλυση των μονοπατιών KEGG για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, έδειξε την οικογένεια των ABC μεταφορέων (ABC transporters) ως ένα από τα πιο στατιστικά σημαντικά μονοπάτια, που παρουσιάζουν αλλαγές στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.14B). Οι αντλίες αυτές έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν εκτός των κυττάρων μια πληθώρα χημικών μορίων και αρκετά χημειοθεραπευτικά φάρμακα και για τον λόγο αυτό συνδέονται με την εμφάνιση χημειοανθεκτικότητας σε αρκετούς τύπους καρκίνου (Fletcher et al. 2010) Ιδιαίτερα η αντλία ABCB1 (γνωστή και ως MDR1 ή P-glycoprotein), αποτελεί το πιο μελετημένο μέλος την οικογένειας και ευθύνεται και την εμφάνιση πολλαπλής ανθεκτικότητας σε φάρμακα (multidrug resistance) (Robey et al. 2018). Επιπλέον, η αντλία ABCC3, αρκετά μελετημένη και αυτή στον καρκίνο, έχει την ικανότητα να μεταφέρει διάφορα χημειοθεραπευτικά, μεταξύ των οποίων και η δοξορουβικίνη (Wang et al. 2019). Στον μεταβολισμό Ξενοβιοτικών εντοπίζεται και το ένζυμο ALDH3A1, μεταβολικό ένζυμο που συμμετέχει τόσο στον μεταβολισμό διαφόρων βιοχημικών μορίων αλλά και στην αποτοξίνωση του κυττάρου από Ξενοβιοτικά (Clark and

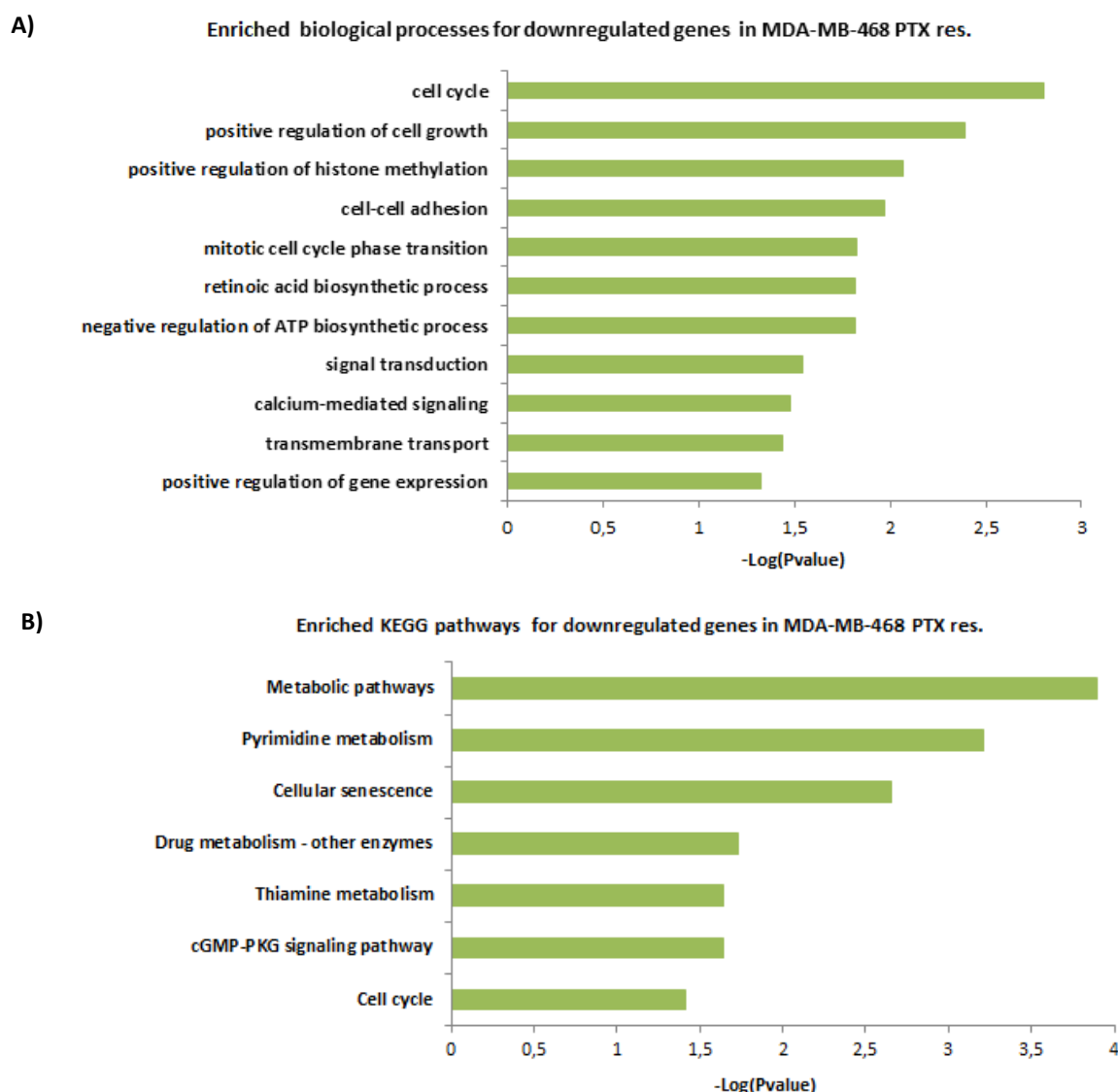
Palle 2016). Αυξημένη έκφραση του ALDH3A1 έχει συνδεθεί με διάφορους τύπους καρκίνου και ιδιαίτερα με τον φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs) (Clark and Palle 2016). Το γονίδιο του ενζύμου αυτού φαίνεται να υπερεκφράζεται και στα δικά μας αποτελέσματα (εικόνα 3.12A), με πενήντα φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην ανθεκτική σειρά συγκριτικά με την πατρική. Επιπλέον, ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος (CYP), εμφανίζονται υπερεκφρασμένα στην ανθεκτική σειρά. Τα ένζυμα αυτά, ανήκουν στην οικογένεια των μόνο-οξυγονασών και λειτουργούν ως βιομετατροπείς διαφόρων χημικών μορίων στο κύτταρο, ενδογενών και εξωγενών, με αποτέλεσμα είτε να ενεργοποιούν είτε να απενεργοποιούν την δραστηριότητά τους (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006).

Μελετώντας τα αντίστοιχα μονοπάτια (KEGG pathways) που αφορούν γονίδια που υπερεκφράζονται, εκτός από την οικογένεια των ABC μεταφορέων βλέπουμε και δύο γνωστά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, το PI3K-Akt μονοπάτι και το μονοπάτι των MAP κινασών (εικόνα 3.14B). Τα μονοπάτια αυτά συμμετέχουν σε μια ποικιλία κυτταρικών διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση (Fresno Vara et al. 2004) (McCubrey et al. 2007). Αντίστοιχα ενεργοί, εντοπίζονται και άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν σε βλαστικού χαρακτήρα σηματοδοτικά μονοπάτια, στην ομάδα «Pathways in cancer». Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, διατηρεί το αναπαραγωγικό δυναμικό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και καθορίζει την διαφοροποίησή τους (Karami et al. 2022). Φαίνεται ότι αρκετά μέλη των Wnt γλυκοπρωτεϊνών (WNT5B, WNT9A, WNT11, WNT10B), υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, οδηγώντας σε ενεργή σηματοδότηση του συγκεκριμένου μονοπατιού. Οι Wnt πρωτεΐνες, λειτουργούν ως υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων μεταφέροντας καθοδικά σήματα στο εσωτερικό τους και ενεργοποιώντας τα αντίστοιχα μονοπάτια. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση στην ανθεκτική σειρά, φαίνεται να έχουν και παράγοντες του JAK-STAT μονοπατιού (JAK3, STAT4, STAT6). Το μονοπάτι αυτό, ελέγχει τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση και η σηματοδότηση του ενεργοποιείται από την παρουσία κυτοκινών (Yang et al. 2020). Η πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης JAK3, συμμετέχει στην σηματοδοτική διαδικασία του μονοπατιού, ενώ οι πρωτεΐνες STAT4 και STAT6 ενεργοποιούνται παρουσία κυτοκινών στο περιβάλλον και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ενεργοποιώντας την γονιδιακή έκφραση (Awasthi, Liongue, and Ward 2021). Το σύνολο αυτών των μονοπατιών και των επιμέρους παραγόντων που τα απαρτίζουν θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης για την εύρεση υποψηφίων στόχων θεραπευτικής αξίας.

Οντολογίες γονιδίων που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (Downregulated genes in PTX res. cell line)

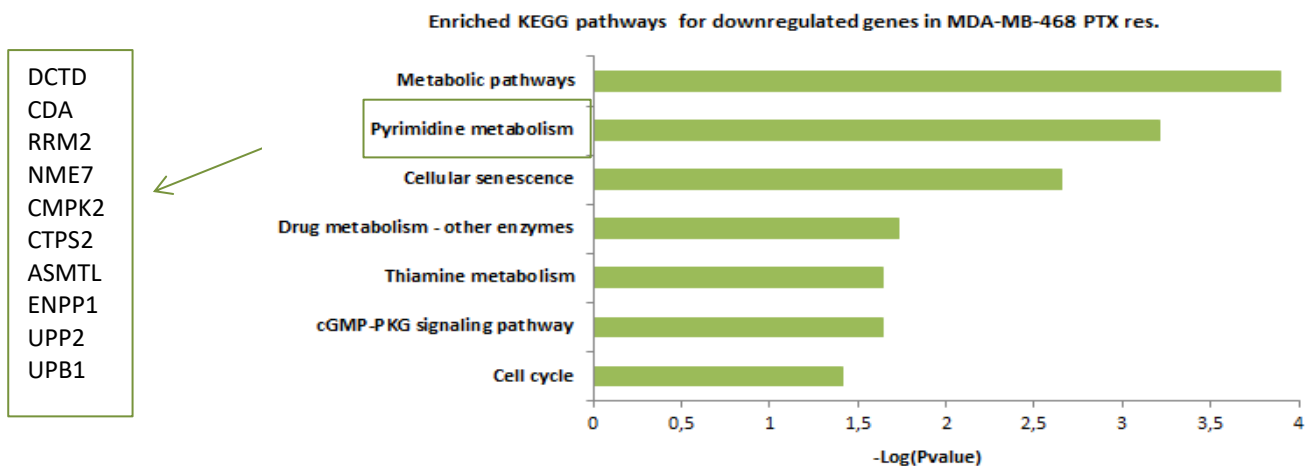
Αντίστοιχα, μελετώντας τις πιο σημαντικές βιολογικές διαδικασίες γονιδίων που υποεκφράζονται (downregulated) στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.15A), βλέπουμε ότι ο κυτταρικός κύκλος (cell cycle) και ο έλεγχος αυτού (mitotic cell

cycle phase transition) ανήκουν στις πιο σημαντικές διαδικασίες. Επιπλέον, συναντάμε μια ομάδα γονιδίων ρυθμιστών της μεθυλίωσης ιστονών (positive regulation of histone methylation), τα οποία πιθανόν και να επηρεάζουν την έκφραση άλλων σημαντικών γονιδίων στα δεδομένα μας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η εικόνα 3.15B, όπου μονοπάτια που σχετίζονται με το μεταβολισμό (metabolic pathways) και πιο ειδικά με το μεταβολισμό φαρμάκων (drug metabolism-other enzymes) αλλά και το μεταβολισμό των πυριμιδινών (pyrimidine metabolism) ανήκουν στις σημαντικότερες κατηγορίες, ενώ συναντάται και εδώ ο κυτταρικός κύκλος (cell cycle).

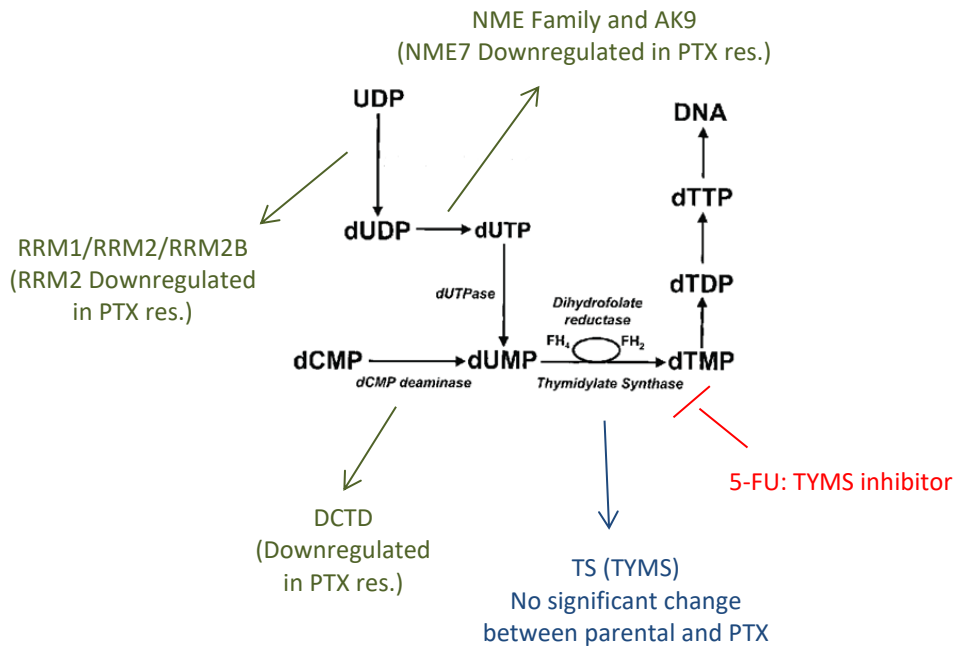


Εικόνα 3.15 Ανάλυση οντολογιών γονιδίων (Gene ontologies. GO) για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (PTX res.). 999 γονίδια που εμφανίζουν μειωμένη έκφραση στην ανθεκτική σειρά (downregulated) από τα DEGs, μελετήθηκαν μέσω του προγράμματος DAVID με σκοπό να εντοπιστούν πιθανές βιολογικές ομάδες και μονοπάτια που συνδέονται με αυτά. A) Οι πιο στατιστικά σημαντικές βιολογικές διαδικασίες (biological processes). B) Τα πιο στατιστικά σημαντικά μονοπάτια (KEGG pathways). P-value<0,05.

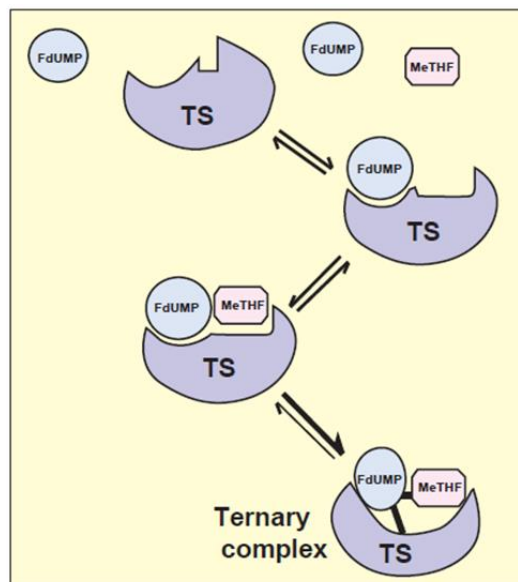
Ο «μεταβολισμός πυριμιδινών» (pyrimidine metabolism), είναι υπεύθυνος για την βιοσύνθεση των πυριμιδινικών βάσεων, που συμμετέχουν στην αλληλουχία του DNA, επομένως, είναι απαραίτητος τόσο για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όσο και για τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Newman and Santi 1982). Το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-φθοριοουρακίλη δρα παρεμβαίνοντας στην πορεία αυτή. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει το ένζυμο θυμιδική συνθάση (TS ή TYMS) το οποίο καταλύει το στάδιο σχηματισμού του μεταβολίτη dTMP από το dUMP, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.17. Παρουσία του φαρμάκου 5-FU, η ενεργός μορφή του, το F-dUMP, ανταγωνίζεται το φυσιολογικό υπόστρωμα, dUMP για πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (εικόνα 3.18). Όπως όμως είδαμε στα αποτελέσματα μας (εικόνα 3.16) αρκετά ένζυμα της πορείας αυτής, όπως τα DCTD, UPP2, RRM2 και UPB1, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα στην ανθεκτική σειρά, γεγονός που οδηγεί και συνολικά στην μειορρύθμιση της μεταβολικής οδού, με αποτέλεσμα να είναι μειωμένα και τα επίπεδα του υποστρώματος, dUMP. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα περισσότερες θέσεις πρόσδεσης στην θυμιδική συνθάση (TS ή TYMS), της οποίας τα επίπεδα έκφρασης δεν διαφέρουν μεταξύ των δύο σειρών, να καταλαμβάνονται από το F-dUMP στην ανθεκτική σειρά και να αναστέλλεται η σύνθεση πυριμιδινών, οδηγώντας αυξημένο αριθμό κυττάρων σε θάνατο. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα παρατηρούμενα αποτελέσματα της χορήγησης της 5-φθοριοουρακίλης στην πατρική και την ανθεκτική σειρά, όπου φάνηκε ότι η ανθεκτική σειρά, PTX res., ήταν πιο ευαίσθητη στην 5-φθοριοουρακίλη συγκριτικά με την πατρική.



Εικόνα 3.16 Μεταβολισμός πυριμιδινών. Ο μεταβολισμός πυριμιδινών εμφανίζεται ως μια από τις πιο σημαντικές ομάδες στην ανάλυση οντολογιών γονιδίων (gene ontologies, GO) για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, μέσω του προγράμματος DAVID. Τα αντίστοιχα γονίδια του μονοπατιού φαίνονται στο πλαίσιο αριστερά,



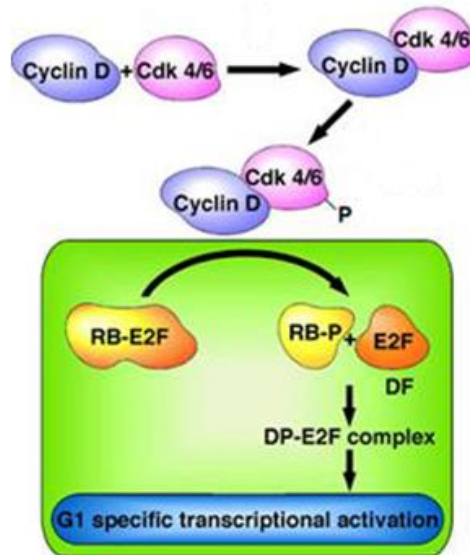
Εικόνα 3.17 Η μεταβολική πορεία βιοσύνθεσης πυριμιδινών και οι επιμέρους παράγοντες που δρουν σε αυτή. Η θυμιδική συνθάση (thymidylate synthase), καταλύει ένα κομβικό βήμα της βιοσύνθεσης των πυριμιδινών, που αποτελούν βασικές μονάδες της αλληλουχίας του DNA.



Εικόνα 3.18 Μηχανισμός δράσης της 5-φθοροουρακίλης (5-FU). Η ενεργός μορφή της 5-φθοροουρακίλης στα κύτταρα, F-dUMP, ανταγωνίζεται το φυσιολογικό υπόστρωμα dUMP της θυμιδικής συνθάσης (TS) για πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Parameichael 1999).

Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η κινάση NME7, η οποία συναντάται στο μονοπάτι «μεταβολισμός πυριμιδινών» (εικόνα 3.16) και της οποίας η έκφραση φαίνεται να μειώνεται στο μισό στην ανθεκτική σειρά. Η κινάση αυτή, εκτός της κατάλυσης ενδιάμεσου σταδίου στον μεταβολισμό των πυριμιδινών, συμμετέχει και στο σύμπλοκο γ -TuRC, στο κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων (MTOCs) (Liu, Choi, and Qi 2014). Όπως αναφέρθηκε ξανά, οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν το κέντρο δράσης της πακλιταξέλης, επομένως αλλαγές σε παράγοντες όπως η κινάση MNE7, θα μπορούσαν να συντελούν στην ανθεκτικότητα των κυττάρων ενάντια στην πακλιταξέλη.

Σημαντική φαίνεται να είναι και η παρουσία γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Παρατηρούμε ότι, όσον αφορά τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, προκύπτουν τρεις σημαντικές ομάδες, σχετιζόμενες με τον κυτταρικό κύκλο. Οι βιολογικές διαδικασίες «κυτταρικός κύκλος» (cell cycle) και «μετάβαση φάσεων κυτταρικού κύκλου» (mitotic cell cycle phase transition), όπως και το μονοπάτι «κυτταρικός κύκλος» (cell cycle) στα μονοπάτια KEGG, εμφανίζονται μέσα στις πιο σημαντικές ομάδες. Μια πιο λεπτομερής ματιά στα γονίδια αυτών των ομάδων αποκάλυψε κάποιες σημαντικές πληροφορίες για την ανθεκτική σειρά. Φαίνεται ότι γονίδια που ελέγχουν την είσοδο και πορεία των κυττάρων στην φάση G1, όπως η κυκλίνη CCND3 και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F2 (Barbash and Diehl 2008) εμφανίζουν μειωμένη έκφραση στην ανθεκτική σειρά. Αντίστοιχα, μειωμένη είναι και η έκφραση της κυκλίνης CCNE1, παράγοντα του κυτταρικού κύκλου που ελέγχει την μετάβαση από την G1 στην S φάση, αλλά και του συμπαραγόντα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK), CKS1B (Liao, Ji, and Ying 2017). Συνοπτικά ο ρόλος των παραπάνω παραγόντων περιγράφεται στην εικόνα 3.19. Φαίνεται, επομένως, ότι παράγοντες που σχετίζονται με την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και με το σημείο ελέγχου στην μετάβαση από την G1 στην S, είναι μειορρυθμισμένοι. Επιπλέον, μελέτη του κυτταρικού κύκλου των δύο σειρών, πατρικής και ανθεκτικής, έδειξε μία αύξηση της τάξεως του 10%, στο ποσοστό των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς, στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 3.6). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων και του μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων, είναι πιθανό, η στάση αυτή στην G1 φάση να συνδέεται με την μειωμένη έκφραση των παραγόντων του κυτταρικού κύκλου που προαναφέρθηκαν.



Εικόνα 3.19 Οι ρυθμιστικοί παράγοντες της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η έναρξη του κυτταρικού κύκλου και η είσοδος στην G1 ελέγχεται από τις κυκλίνες τύπου D (CCND) και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6, σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα. Σημαντικός στόχος αυτών των συμπλόκων είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb, η οποία φωσφορυλιώνεται οδηγώντας στην απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F, οι οποίοι σχηματίζουν σύμπλοκα E2F-DP που με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που δρουν στην G1 φάση αλλά ελέγχουν και την μετάβαση G1-S.

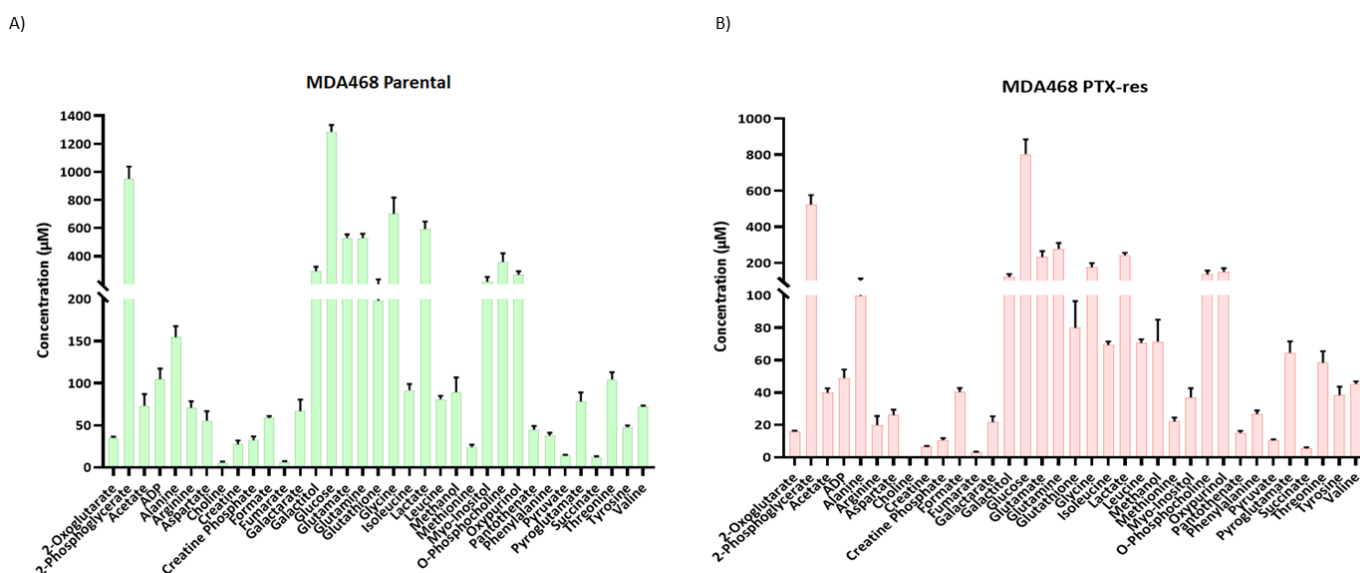
Επιπρόσθετα, μειωμένη έκφραση εμφανίζουν και δύο παράγοντες της μιτωτικής φάσης του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη CCNB3 και η αντίστοιχη κυκλινοεξαρτώμενη κινάση CDK1. Η CDK1 σηματοδοτεί την είσοδο του κυττάρου στην μίτωση (φάση M), ενεργοποιώντας χαρακτηριστικούς μιτωτικούς παράγοντες και ρυθμίζει και τις επιμέρους διαδικασίες, όπως η συμπύκνωση του DNA και ο διαχωρισμός του κυτταροπλάσματος (Li, Barbash, and Diehl 2015). Μελέτη του μηχανισμού δράσης της πακλιταξέλης, έδειξε ότι, παρουσία της, τα κύτταρα οδηγούνται σε στάση στην G2-M φάση του κυτταρικού κύκλου, λόγω παρεμπόδισης του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων της ατράκτου (Schiff and Horwitz 1980). Συνολικά, φαίνεται ότι τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και η επιμέρους ρύθμιση αυτών, εμφανίζουν μεγάλες αλλαγές μεταξύ πατρικής και ανθεκτικής σειράς

Συνολικά, φαίνεται ότι η ανθεκτική σειρά, PTX res., χαρακτηρίζεται από ένα ιδιαίτερο μεταγραφικό προφίλ. Παράγοντες της μεμβράνης, όπως αντλίες και υποδοχείς, μεταβολικά μόρια, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και σηματοδοτικά μονοπάτια εντοπίζονται σημαντικά αλλαγμένα στην ανθεκτική σειρά. Η δράση καθενός από αυτούς τους μηχανισμούς ξεχωριστά, αλλά και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση πιθανότατα να καθοδηγούν τα χαρακτηριστικά της ανθεκτικής σειράς, ενεργοποιώντας σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που οδηγούν στην ανάπτυξη χημειοανθεκτικών μηχανισμών, ως απόκριση στο χορηγούμενο φάρμακο. Επομένως, η περαιτέρω μελέτη τους θα μπορούσε να αποκαλύψει σημαντικούς ρυθμιστές της χημειοανθεκτικότητας, η στόχευση των οποίων θα βοηθούσε στην αποφυγή των χημειοανθεκτικών μηχανισμών και την αύξηση της αποτελεσματικότητας των χορηγούμενων θεραπειών.

3.6 Ανάλυση του μεταβολικού προφίλ της πατρικής (parental) και της ανθεκτικής (PTX res.) σειράς MDA-MB-468

3.6.1 Ποσοτικοποίηση ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μεταβολιτών

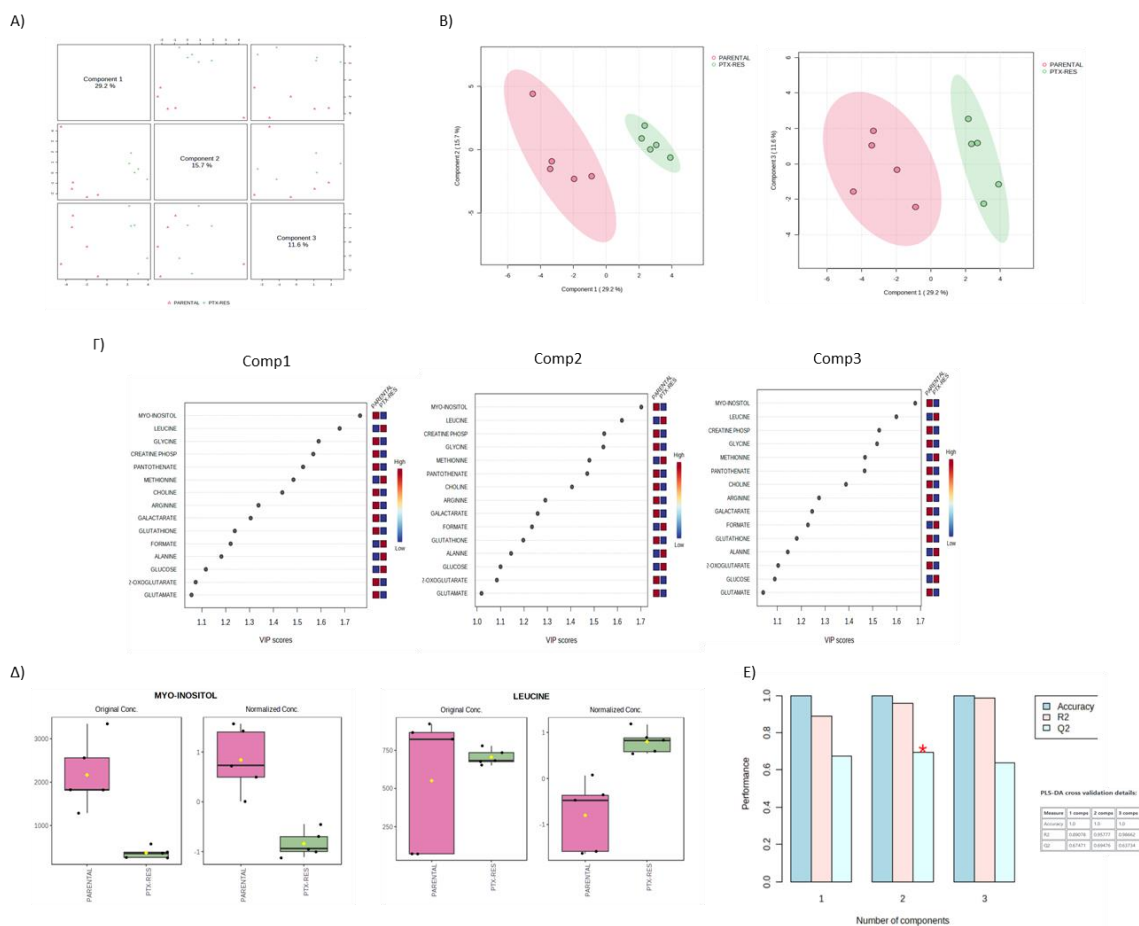
Πρώτο στάδιο της διερεύνησης του μεταβολικού προφίλ των δύο σειρών ήταν η ποσοτικοποίηση, τόσο των ενδοκυττάρων, όσο και των εξωκυττάρων μεταβολιτών. Για τον σκοπό αυτό, πρωτονιακά (¹H) φάσματα NMR από τις δύο σειρές, πατρική και ανθεκτική, λήφθηκαν μέσω του φασματογράφου Bruker Avance DRX NMR στα 500MHz και η ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα TopSpin (version 4.0.6). Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Chenomx, ενώ μεταβολίτες των οποίων οι κορυφές επικαλύπτονταν με άλλες κορυφές του φάσματος ή διέφεραν αρκετά μεταξύ των διαφορετικών πειραμάτων, δεν αναλύθηκαν περαιτέρω. Όσον αφορά τους ενδοκυττάρους μεταβολίτες, εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν συνολικά τριάντα-πέντε μεταβολίτες (εικόνα 3.20). Οι μεταβολίτες γλυκόζη (glucose), 2-φωσφογλυκερικό (2-phosphoglycerate), γλυκίνη (glycine), γαλακτικό (lactate), γλουταμικό (glutamate) και γλουταμίνη (glutamine) ήταν οι πιο άφθονοι στην πατρική σειρά (parental) (εικόνα 3.20A), ενώ στην ανθεκτική (PTX res.) οι μεταβολίτες γλυκόζη (glucose), 2-φωσφογλυκερικό (2-phosphoglycerate), γλουταμίνη (glutamine), γλουταμικό (glutamate), γαλακτικό (lactate) και γλυκίνη (glycine) έδειξαν την υψηλότερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση αντίστοιχα (εικόνα 3.20B).



Εικόνα 3.20 Ποσοτικοποίηση ενδοκυττάρων μεταβολιτών. Μεταβολίτες από την πατρική (parental) και την ανθεκτική (PTX res.) MDA-MB-468 σειρά απομονώθηκαν μέσω ενός συστήματος δύο φάσεων και ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος Chenomx. Συνολικά ποσοτικοποιήθηκαν τριάντα-πέντε μεταβολίτες. A) ποσοτικοποίηση ενδοκυττάρων μεταβολιτών στην πατρική σειρά. B) ποσοτικοποίηση ενδοκυττάρων μεταβολιτών στην ανθεκτική σειρά. Οι γραμμές σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν το SEM πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

3.6.2 Ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των δύο σειρών

Με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο οι δύο σειρές, πατρική και ανθεκτική, εμφανίζουν διαφορετικά μεταβολικά προφίλ ή όχι, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων (PLS-DA) μέσω του προγράμματος MetaboAnalyst. Η ανάλυση για τους ενδοκυττάριους μεταβολίτες έδειξε μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο μεταβολικών προφίλ, όπως δείχνει η ανάλυση των τριών πρώτων συστοιχιών (components) (εικόνα 3.21A) και η σύγκριση των συστοιχιών 1 με 2 και 1 με 3 (εικόνα 3.21B). Συμπεραίνουμε, λοιπόν ότι, η σύνθεση των μεταβολικών προφίλ διαφέρει σημαντικά μεταξύ της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς. Στην συνέχεια αναλύθηκαν περαιτέρω οι 15 πιο σημαντικοί μεταβολίτες για τον διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των δύο σειρών της κάθε συστοιχίας (component) μέσω του δείκτη VIP (variable importance projection) (εικόνα 3.21Γ). Μεγαλύτερη τιμή VIP δείχνει και μεγαλύτερη συμμετοχή του συγκεκριμένου μεταβολίτη στην διάκριση των μεταβολικών προφίλ. Παρατηρούμε ότι η μυο-ινοσιτόλη (myo-inositol) βγαίνει ως πιο σημαντικός μεταβολίτης και για τις τρεις συστοιχίες (components), ενώ αμέσως μετά έρχεται η λευκίνη (leucine) με αρκετά κοντινές τιμές. Παράλληλα, στο διάγραμμα φαίνεται και η συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη συγκριτικά, στην πατρική και στην ανθεκτική σειρά ανάλογα με το αν είναι υψηλή (κόκκινο) ή χαμηλή (μπλε). Οι συγκεντρώσεις των δύο στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών στην πατρική και την ανθεκτική σειρά φαίνονται αναλυτικότερα στην εικόνα 3.21Δ, όπου βλέπουμε ότι η μεν μυο-ινοσιτόλη (myo-inositol) (P value=6,52E-4) βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στην πατρική συγκριτικά με την ανθεκτική σειρά, ενώ το αντίθετο ισχύει για την λευκίνη (leucine) (P value=0,002). Η εγκυρότητα και η ακρίβεια του μοντέλου εκτιμήθηκαν (10-fold cross validation, CV) μέσω των δεικτών Q^2 (> 0,6) και R^2 (>0,89), δείχνοντας ότι οι προβλέψεις του μοντέλου είναι έγκυρες (εικόνα 3.21Ε).

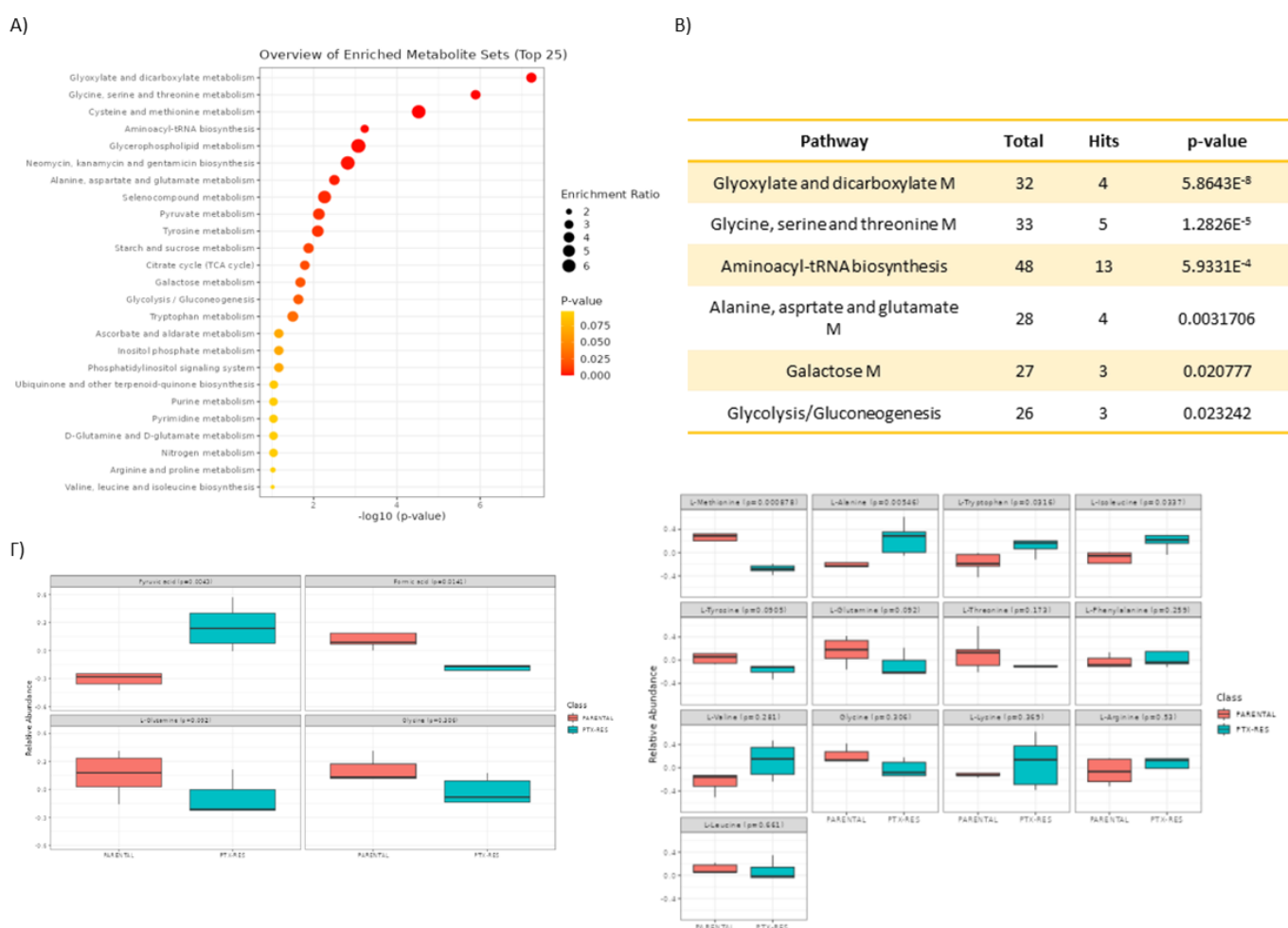


Εικόνα 3.21 Ποσοτική ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων (PLS-DA) για την πατρική (parental) και ανθεκτική (PTX res.) σειρά MDA-MB-468 με χρήση του MetaboAnalyst. A) Διάγραμμα απεικόνισης των τριών πρώτων συστοιχιών (components) και 2D απεικόνιση της σχέσης των συστοιχιών 1 και 2 και 1 και 3. B) οι 15 πιο σημαντικοί ενδοκυττάριοι μεταβολίτες για των διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ των δύο σειρών σε κάθε συστοιχία βάσει του δείκτη VIP. Δ) Οι δύο πιο σημαντικοί ενδοκυττάριοι μεταβολίτες για τον διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ. E) Δείκτες R² και Q² για τον έλεγχο της ακρίβειας του προβλεπόμενου μοντέλου.

3.6.3 Metabolite enrichment analysis

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν υπάρχουν ομάδες συναφών λειτουργικά μεταβολιτών (enriched metabolite sets), αλλά και μονοπάτια (KEGG pathways) που να εμφανίζονται εμπλουτισμένα στην ανθεκτική σειρά. Αναφορικά με τους ενδοκυττάριους μεταβολίτες, στην εικόνα 3.22 A, βλέπουμε τα είκοσιπέντε πρώτα μονοπάτια που εμφανίζονται εμπλουτισμένα, ενώ ο πίνακας (εικόνα 3.22B) δείχνει επτά από αυτά, που είναι στατιστικά σημαντικά και εκπροσωπούνται από τρεις και πάνω μεταβολίτες. Επιπλέον, στον πίνακα φαίνεται ο αριθμός των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν στα δείγματα μας (hits) και ο συνολικός αριθμός μεταβολιτών του κάθε μονοπατιού (total). Φαίνεται ότι η ομάδα «βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA (aminoacyl-tRNA biosynthesis) είναι η πιο σημαντική, διότι δέκα-τρεις μεταβολίτες από τους συνολικά σαράντα-οκτώ του μονοπατιού εντοπίζονται στα δείγματα μας (13/48). Οι δεκατρείς αυτοί

μεταβολίτες, με τις σχετικές συγκεντρώσεις τους στην πατρική (parental) και την ανθεκτική (PTX res.) σειρά, φαίνονται στην εικόνα 3.22Γ. Η λευκίνη (l-leucine) και η μεθειονίνη (l-methionine) εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στην ανθεκτική σειρά, ενώ η γλυκίνη (Glycine) και η αργινίνη (l-arginine) υψηλότερες στην πατρική. Επίσης σημαντικό μονοπάτι φαίνεται να είναι και ο «μεταβολισμός καρβοξυλικού και δικαρβοξυλικού» (carboxylate and dicarboxylate Metabolism) με 7/32 μεταβολίτες, αλλά και άλλα μονοπάτια όπως η βιοσύνθεση «πανθοθενικού και συνεζύμου A» (Panthonate and CoA Biosynthesis), ο «μεταβολισμός γλουταθειόνης» (Glutathione metabolism) και ο «μεταβολισμός γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης» (glycine, serine and threonine metabolism).

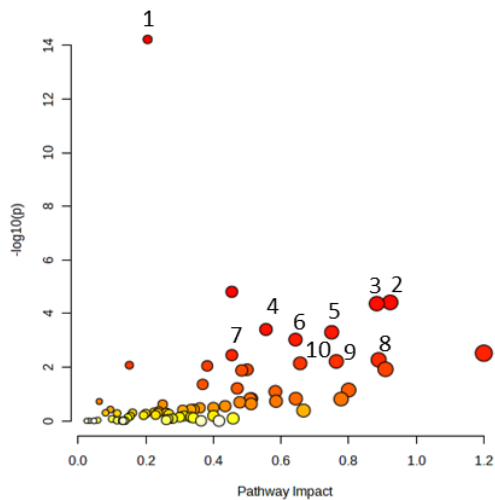


Εικόνα 3.22. Έλεγχος εμπλουτισμού ενδοκυττάρων μεταβολιτών στην πατρική (parental) και την ανθεκτική (PTX res.) σειρά MDA-MB-468 μέσω του MetaboAnalyst. Α) Ποσοτική απεικόνιση των εμπλουτισμένων μονοπατιών βάσει των ποσοτικοποιημένων ενδοκυττάρων μεταβολιτών από την πατρική και την ανθεκτική σειρά. Για την ταυτοποίηση των μονοπατιών χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη KEGG Pathways. Β) πίνακας όπου συνοψίζονται τα στατιστικά σημαντικά μονοπάτια ($p < 0.05$ and $FDR < 0.1$) που εμφανίζονται εμπλουτισμένα με πάνω από τρεις μεταβολίτες στα δεδομένα μας. Γ) Συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μεταβολιτών που συνδέονται με το πιο στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμένο μονοπάτι.

3.6.4 Συνδυαστική ανάλυση μεταβολικού και μεταγραφικού προφίλ (Metabolomics and RNAseq joint analysis)

Ο συνδυασμός των μεταβολιτών που ποσοτικοποιήθηκαν στα δεδομένα μας και των γονιδίων που έδειξαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο σειρών (differentially expressed genes, DEGs), θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες για την ανθεκτική σειρά και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στα χαρακτηριστικά της. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων των δύο μεθόδων, μέσω του MetaboAnalyst 5.0. Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των ποσοτικοποιημένων μεταβολιτών, ενώ ξεχωριστά μελετήθηκαν τα υπερεκφραζόμενα (upregulated) και τα υποεκφραζόμενα (downregulated) γονίδια. Όσον αφορά την ανάλυση για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στα ανθεκτικά κύτταρα, τα μονοπάτια που βρέθηκαν κοινά μεταξύ των δειγμάτων φαίνονται στην εικόνα 3.23Α. Από αυτά, τα πιο σημαντικά φαίνονται στον πίνακα 3.23Β, ενώ ο πίνακας 3.23Γ αναγράφει τους μεταβολίτες και τα γονίδια που εκπροσωπούν το κάθε μονοπάτι. Το μονοπάτι «βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA» (Aminoacyl-tRNA Biosynthesis) προκύπτει από την ανάλυση ως το πιο σημαντικό με δέκα-πέντε μεταβολίτες, αλλά κανένα γονίδιο. Παρατηρούμε επίσης ότι το μονοπάτι «γλυκόλυση και γλυκονεογένεση» (glycolysis and gluconeogenesis) περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων (10) σε συνδυασμό με πέντε ποσοτικοποιημένους μεταβολίτες, ενώ αρκετά γονίδια (8) και μεταβολίτες (5) φαίνεται να εντοπίστηκαν και στο μονοπάτι «μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης» (arginine and proline metabolism).

A)



B)

Pathway	(M.G.)/Total	p-value	-log(p)
Aminoacyl-tRNA B (1)	(15, 0)/74	5.91E-15	14.23
Arginine B (2)	(6, 3)/27	3.80E-5	4.42
Glycolysis or Gluconeogenesis (3)	(5, 10)/61	4.24E-5	4.37
Nitrogen M (4)	(2, 3)/10	3.89E-4	3.41
Alanine, aspartate and glutamate M (5)	(8, 4)/61	4.98E-4	3.30
Butanoate M (6)	(3, 5)/29	9.30E-4	3.03
Arginine and proline M (7)	(5, 8)/78	0.0035	2.45
D-Glutamine and D-glutamate M (8)	(3, 1)/10	0.0053	2.28
Glutathione M (9)	(4, 6)/56	0.0061	2.22
Glycine, serine and threonine M (10)	(5, 6)/68	0.0071	2.15
Glyoxylate and dicarboxylate M	(6, 3)/56	0.0089	2.05
Pyruvate M	(4, 4)/45	0.012	1.93
Histidine M	(2, 5)/32	0.013	1.88

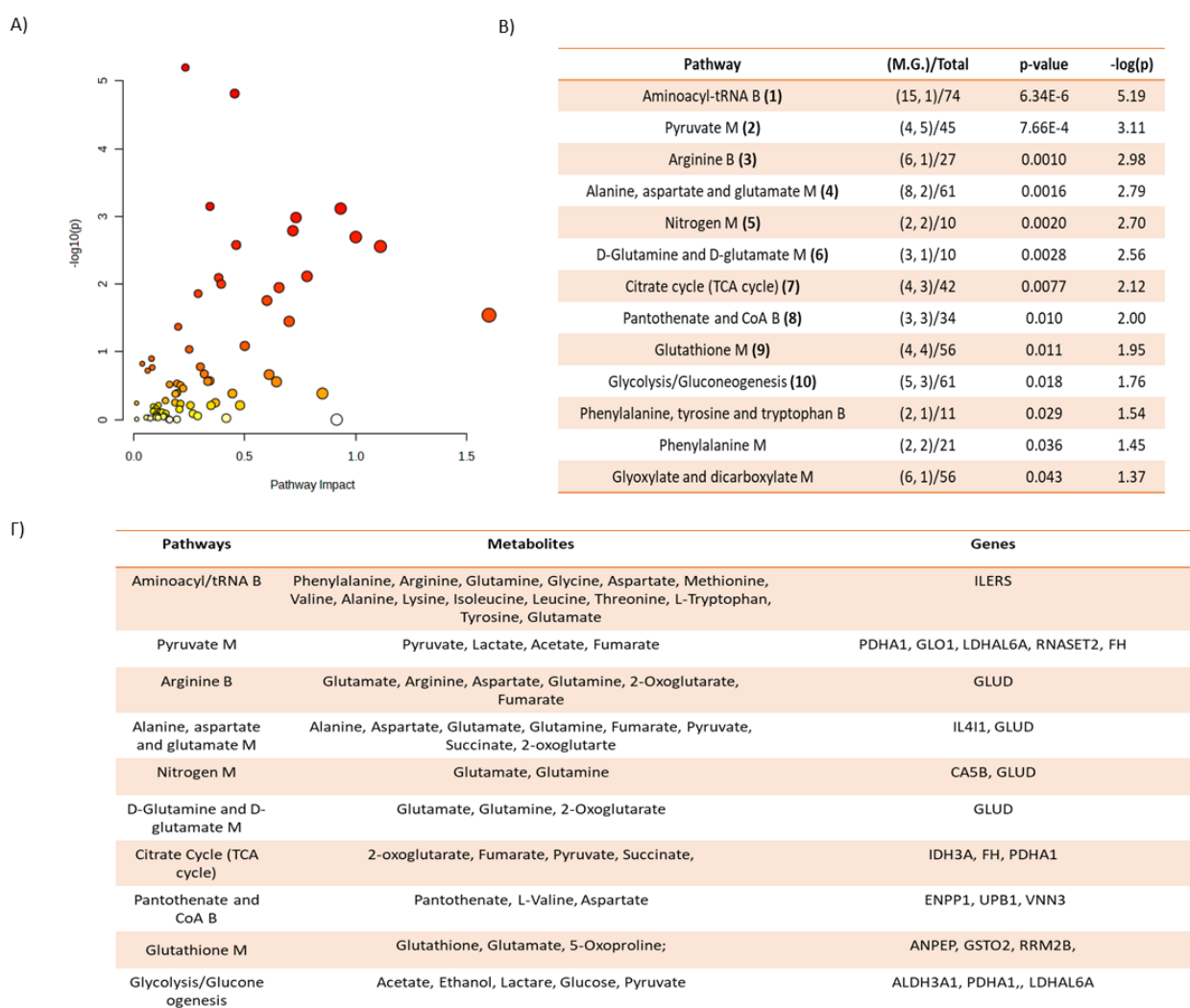
Γ)

Pathways	Metabolites	Genes
Arginine B	Glutamate, Arginine, Aspartate, Glutamine, 2-Oxoglutarate, Fumarate	NOS1, NAGS, ASL
Glycolysis or Gluconeogenesis	Acetate, Ethanol, Lactate, Glucose, Pyruvate	ALDH2, ALDH3A1, ADH1A, ENO1, ALDOA, ATP-PFK, FBP1, GALM, ACAS2, ACECS
Nitrogen M	Glutamate, Glutamine	CASB, CA-VB, CAVB
Alanine, aspartate and glutamate M	Alanine, Aspartate, Glutamate, Glutamine, Fumarate, Pyruvate, Succinate, 2-oxoglutarate	NAT8L, ASL, ABAT, GAD1
Butanoate M	2-oxoglutarate, Glutamate, Succinate	BDH2, HMGCL, ABAT, GAD1, ACSM1
Arginine and proline M	Arginine, Creatine, Creatine phosphate, Glutamate, Pyruvate	NOS1, GAMT, CKB, AGMAT, ALDH2, MAOA, CARN1, L3HYPDH
D-Glutamine and D-glutamate M	Glutamate, Glutamine, 2-Oxoglutarate	DGLUCY
Glutathione M	Glutathione, Glycine, Glutamate, 5-Oxoproline	GGT6, GPX6, GPX5p, GPX3p, GPx-6, GSHPx-6
Glycine, serine and threonine M	Choline, Creatine, Glycine, Pyruvate, Threonine	GAMT, CBS, MAOA, GRHPR, AMT, GCE

Εικόνα 3.23 Συνδυαστική ανάλυση μεταβολιτών και γονιδίων που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική (PTX res.) σειρά. Α) Απεικόνιση όλων των μονοπατιών βάσει του Pvalue της συνδυαστικής ανάλυσης (Joint pathways Analysis) των μεταβολιτών με τα γονίδια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (PTX res.) MDA-MB-468. Οι τελείες αντιπροσωπεύουν όλα τα μονοπάτια που βρέθηκαν εμπλουτισμένα στα DEGs ή/και στους ποσοτικοποιημένους μεταβολίτες. Β) Στατιστικά σημαντικά μονοπάτια (Pvalue<0,05) που βρέθηκαν εμπλουτισμένα στα γονίδια που υπερεκφράζονται και στους μεταβολίτες. Γ) Μεταβολίτες και γονίδια που αντιστοιχούν στα μονοπάτια που προέκυψαν από την συνδυαστική ανάλυση.

Αντίστοιχα και για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, η σύνοψη όλων των μονοπατιών φαίνεται στην εικόνα 3.24Α και τα πιο σημαντικά μονοπάτια μαζί με τα αντίστοιχα γονίδια και τους μεταβολίτες στους πίνακες 3.24Β και 3.24Γ. Εδώ το μονοπάτι «βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA» (Aminoacyl-tRNA Biosynthesis) προκύπτει και πάλι ως το σημαντικότερο με δέκα-πέντε μεταβολίτες και ένα γονίδιο, ενώ από τα πιο εκπροσωπημένα μονοπάτια φαίνεται να είναι και ο «μεταβολισμός του πυροσταφυλικού» (pyruvate metabolism), με τέσσερις μεταβολίτες και πέντε γονίδια. Τέλος, στα σημαντικά μονοπάτια εμφανίζεται και ο «κύκλος του κιτρικού οξέος» (citrate cycle, TCA cycle), μονοπάτι που γνωρίζουμε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων, μετέχοντας στην διαδικασία της οξειδωτικής

φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια (Marquez et al. 2019). Όπως έχει αναφερθεί ξανά, τα καρκινικά κύτταρα ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια για την παραγωγή ενέργειας, κυρίως μέσω αερόβιας γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα (O. Warburg 1956). Αλλαγές στον κύκλο του κιτρικού οξέος αλλά και σε ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτόν (IDH, SDH, FH) έχουν συνδεθεί με την καρκινογένεση, ενώ μεταβολίτες του μονοπατιού είναι πιθανό να εμπλέκονται σε άλλες βιολογικές διαδικασίες, λειτουργώντας ως μόρια-προσδέτες σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Epiafe 2021). Φαίνεται, επομένως, ότι παράγοντες που σχετίζονται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του χημειοανθεκτικού προφίλ της σειράς.



Εικόνα 3.24 Συνδυαστική ανάλυση μεταβολιτών και γονιδίων που υποεκφράζονται στην ανθεκτική (PTX res.) σειρά. Α) Απεικόνιση όλων των μονοπατιών βάσει του Pvalue της συνδυαστικής ανάλυσης (Joint pathways Analysis) των μεταβολιτών με τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (PTX res.) MDA-MB-468. Η τελείες αντιπροσωπεύουν όλα τα μονοπάτια που βρέθηκαν εμπλουτισμένα στα DEGs ή/και στους ποσοτικοποιημένους μεταβολίτες. Β) Στατιστικά σημαντικά μονοπάτια (Pvalue<0,05) που βρέθηκαν εμπλουτισμένα στα γονίδια που υποεκφράζονται και στους μεταβολίτες. Γ) Μεταβολίτες και γονίδια που αντιστοιχούν στα μονοπάτια που προέκυψαν από την συνδυαστική ανάλυση.

Συνολικά, από την συνδυαστική ανάλυση των ποσοτικοποιημένων μεταβολιτών με τα υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα στην ανθεκτική σειρά γονίδια, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε κάποια γονίδια, που συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου και εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ πατρικής και ανθεκτικής σειράς. Μέσα σε αυτά, εντοπίζουμε αρκετές μεταβολικές πορείες αμινοξέων, τα οποία αποτελούν βασικές μονάδες των κυττάρων συμμετέχοντας ως δομικά μόρια αλλά και για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων (Lieu et al. 2020). Επιπλέον, συμπεραίνουμε ότι εκτός από τις μεμονωμένες διαφορές στους μεταβολίτες των δύο σειρών, εντοπίζονται διαφορές και στα μεταβολικά μονοπάτια, δηλαδή σε ομάδες μεταβολιτών που συμμετέχουν στην ίδια μεταβολική διεργασία. Το γεγονός αυτό, ενισχύει τις παρατηρήσεις μας, για την ύπαρξη διαφορετικών μεταβολικών προφίλ μεταξύ των δύο σειρών, ενώ η μελέτη των επιμέρους γονιδίων που συμμετέχουν στα μεταβολικά μονοπάτια θα μπορούσε να αποκαλύψει νέα γονίδια καθοριστικής σημασίας για την χημειοανθεκτικότητα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη πιο θανατηφόρο νόσο της εποχής μας και η πολύπλοκη φύση του παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, σε κλινικό και ερευνητικό επίπεδο. Ο καρκίνος του μαστού κατέχει την πρώτη θέση σε συχνότητα μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου και είναι ο πιο συχνός στις γυναίκες, ενώ η θεραπευτική του αντιμετώπιση αποτελεί πρόκληση, λόγω της ιδιαίτερης ετερογένειας που παρουσιάζει (Global Cancer Observatory, International Agency for Research in Cancer, WHO). Ιδιαίτερα, ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TAKM), περιλαμβάνει το 15-20% των καρκίνων του μαστού και θεωρείται ο πιο επιθετικός υπότυπος, με υψηλά ποσοστά μεταστάσεων και περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (Echeverria et al. 2019). Βασικό πρόβλημα του TAKM είναι η ιδιαίτερα ετερογενής φύση του, με αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης στοχευτικών θεραπευτικών μέσων. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται ευρέως στον υπότυπο αυτό, δεν αποτελούν αποτελεσματική προσέγγιση, διότι μεγάλο ποσοστό των ασθενών αναπτύσσει ανθεκτικότητα μετά την χορήγηση της θεραπείας, μακρινές μεταστάσεις και τελικά οι ασθενείς υποτροπιάζουν (Bianchini et al. 2016). Υπάρχει, λοιπόν, επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μέσων που στοχεύουν παράγοντες ή/και βιολογικές διαδικασίες, που συντελούν στο ανθεκτικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μελέτες στον τριπλά αρνητικό υπότυπο έχουν στραφεί στην μελέτη και κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών, πίσω από την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα, προσβλέποντας στην ταυτοποίηση υποψήφιων γονιδίων στόχων (Ji et al 2019). Αρκετοί κυτταρικοί μηχανισμοί φαίνεται να εντοπίζονται αλλαγμένοι στα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα, μεταξύ αυτών ο μεταβολισμός (Gatenby and Gillies 2004), οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA (Assaraf et al. 2019), η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του όγκου και η κυτταρική σηματοδότηση (Ji et al 2019) και η έκφραση επιφανειακών μορίων (Bukowski et al. 2020). Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι αλλαγές στους μηχανισμούς αυτούς καθοδηγούνται από γονιδιακές μεταλλαγές ή επιγενετικές αλλαγές στα ανθεκτικά κύτταρα (Wang et al. 2019). Παρ' όλα αυτά, η κινητήριος δύναμη για την δημιουργία τους και ο ακριβής τρόπος συμβολής τους στην χημειοανθεκτικότητα δεν είναι πλήρως μελετημένα, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ελάχιστες διαθέσιμες στοχευμένες θεραπείες (Echeverria et al. 2019).

Στην παρούσα εργασία, βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, θελήσαμε να δημιουργήσουμε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης της χημειοανθεκτικότητας στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, με σκοπό την περιγραφή, τον χαρακτηρισμό και την επικύρωσή του, καθώς και την προκαταρκτική διερεύνηση πιθανών φαρμακευτικών στόχων. Η ανάλυση του μεταγραφικού και μεταβολικού προφίλ της ανθεκτικής σειράς επέτρεψε την λεπτομερή μελέτη των παραγόντων που την διαφοροποιούν από την πατρική και την εύρεση γονιδίων-στόχων με προοπτικές θεραπευτικής αξίας. Η ανθεκτική σειρά έναντι της πακλιταξέλης, MDA-MB-468 PTX res., δημιουργήθηκε μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους χορήγησης του φαρμάκου στην πατρική σειρά (MDA-MB-468). Εν συνεχεία, επιβεβαιώθηκε η

ανθεκτικότητα της σειράς, όπου φάνηκε ότι η νέα σειρά εμφανίζει είκοσι φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην πακλιταξέλη από την πατρική (ενότητα 3.1). Εικόνες της διαμόρφωσης των μικροσωληνίσκων, στόχων της πακλιταξέλης, μετά από την χορήγηση της στις δύο σειρές, επιβεβαίωσε την ανθεκτικότητα αυτή. Η ανθεκτική σειρά φάνηκε να μην επηρεάζεται από την δράση της πακλιταξέλης, σε αντίθεση με την πατρική σειρά, όπου η χορήγηση του φαρμάκου άλλαξε εντελώς την φυσιολογική δομή των μικροσωληνίσκων (εικόνα 3.2). Δεδομένα από την ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των δύο σειρών, ανέδειξαν την κινάση NME7 στο μονοπάτι «μεταβολισμός πυριμιδινών», η οποία φαίνεται να υποεκφράζεται στην ανθεκτική σειρά. Ο βασικός ρόλος της κινάσης αυτής, είναι η συμμετοχή της στο σύμπλοκο γ -TuRC, στο κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων (MTOCs), (Liu, Choi, and Qi 2014). Γνωρίζοντας ότι η πακλιταξέλη δρα στοχεύοντας την δομή των μικροσωληνίσκων, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο και την διαμόρφωση των μικροσωληνίσκων, όπως το NME7, υποψήφιους στόχους. Έπειτα, μελετήθηκε η κυτταρική αύξηση των δύο σειρών, όπου φάνηκε ότι τα κύτταρα της ανθεκτικής σειράς αναπτύσσονται με μειωμένο ρυθμό, συγκριτικά με την πατρική (εικόνα 3.3). Τόσο η απόπτωση, όσο και ο κυτταρικός κύκλος των δύο σειρών μελετήθηκαν, με σκοπό να βρεθεί ο πιθανός μηχανισμός πίσω από την μειωμένη αύξηση της ανθεκτικής σειράς. Ενώ η απόπτωση δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των δύο σειρών (εικόνα 3.5, εικόνα 3.6), εντοπίστηκε μία στάση των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 3.7), δίνοντας μια εξήγηση στη διαφορά που εντοπίστηκε στο ρυθμό αύξησης των δύο σειρών. Δεδομένα από την ανάλυση του μεταγραφώματος, έδειξαν ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο να υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.15). Πιο συγκεκριμένα, γονίδια που ρυθμίζουν, την είσοδο, την πρόοδο και την έξοδο των κυττάρων από την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (CCND3, E2F2, CCNE1 και CKS1B) είναι μειορρυθμισμένα. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να συνδέεται με την στάση στην G1 των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς. Είναι γνωστό, ότι η δημιουργία και εξέλιξη του όγκου συνδέονται άρρηκτα με την λειτουργία του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα (Sun et al. 2021). Η πακλιταξέλη ανήκει στα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία στοχεύουν μηχανισμούς των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύει την δομή των μικροσωληνίσκων, παρεμποδίζοντας τελικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η παρατηρούμενη στάση στην G1 και ο επακόλουθα μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης της ανθεκτικής σειράς, θα μπορούσαν να είναι ένας τρόπος προσαρμογής των ανθεκτικών κυττάρων στον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Επομένως, η διαφορετική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στην ανθεκτική σειρά και οι επιμέρους ρυθμιστικοί παράγοντες θα μπορούσαν να αποτελούν έναν παράγοντα που συνεισφέρει στην χημειοανθεκτικότητα και θα είχαν ενδιαφέρον για την στόχευση των χημειοανθεκτικών κυττάρων.

Έπειτα, θελήσαμε να δούμε εάν η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην πακλιταξέλη, επηρεάζει την απόκριση των κυττάρων στη χορήγηση άλλων χημειοθεραπευτικών. Η δοσεταξέλη, συγγενές φάρμακο της πακλιταξέλης, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα (εικόνα 3.8A). Η ανθεκτική σειρά, PTX res., φάνηκε να είναι

πιο ανθεκτική στην δοσεταξέλη από την πατρική, γεγονός που είναι λογικό, λόγω του ίδιου μηχανισμού δράσης των δύο φαρμάκων. Οι τιμές IC_{50} των δύο φαρμάκων στην ανθεκτική σειρά είχαν διαφορά, με την δοσεταξέλη να έχει χαμηλότερη τιμή, λόγω αυξημένης συγγένειας για την θέση δέσμευσης στην μονάδα της τουμπουλίνης και υψηλότερη απόδοση (Jones 2006). Στην συνέχεια επιλέχθηκε ένα γνωστό και συχνά χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό φάρμακο, η 5-φθοροουρακίλη. Η 5-φθοροουρακίλη έχει δομή παρόμοια με αυτή των πυριμιδινικών βάσεων, γεγονός που της επιτρέπει να παρεμβαίνει στην αλληλουχία του DNA και να παρεμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας τα κύτταρα σε θάνατο (Zhang et al. 2008). Το αποτέλεσμα της χορήγησης του στις δύο σειρές, είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η ανθεκτική σειρά έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία στην 5-φθοροουρακίλη από ότι η πατρική, αποκαλύπτοντας, σε συνδυασμό με το μεταγραφικό προφίλ της σειράς, σημαντικές πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά της (εικόνα 3.8B). Η ομάδα «μεταβολισμός πυριμιδινών» προέκυψε ως ένα από τα πιο στατιστικά σημαντικά μονοπάτια, που διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο σειρών (εικόνα 3.15). Η δράση της 5-φθοροουρακίλης ως ανταγωνιστικού αναστολέα ενός ενζύμου του μονοπατιού βιοσύνθεσης των πυριμιδινών (εικόνα 3.17 και 3.18), σε συνδυασμό με την μειορρύθμιση του συγκεκριμένου μονοπατιού στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.17), συντέλεσαν στην ευαισθητοποίηση της σειράς στον συγκεκριμένο φάρμακο. Επιπρόσθετα, κλινικές μελέτες σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, έδειξαν αυξημένη αποτελεσματικότητα της 5'-δεοξυ-5-φθορο-N [(πεντυλοξυ) καρβονυλ] κυτιδίνης (καπεσιταβίνη) (capecitabine) σε ασθενείς που προηγουμένως είχε χορηγηθεί θεραπεία βασισμένη σε ταξάνες (Rivera and Gomez 2010). Η καπεσιταβίνη (capecitabine) είναι ένα προ-φάρμακο του αντιμεταβολίτη 5-φθοροουρακίλη και μετατρέπεται σε αυτό στα κύτταρα από την φωσφορυλάση θυμιδίνης, η οποία φαίνεται να είναι αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς (Hernandez-Aya and Ma 2016). Αντίστοιχη κλινική μελέτη ανέδειξε την χορήγηση της καπεσιταβίνης (capecitabine) ως αποτελεσματική θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι οποίοι είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα στην πακλιταξέλη (Blum et al. 1999). Τα στοιχεία αυτά, υποδεικνύουν πως οι παρατηρήσεις μας σε επίπεδο κυτταρικής σειράς θα μπορούσαν να βρίσκουν εφαρμογή και στην κλινική πράξη. Ο προσδιορισμός των μηχανισμών πίσω από την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο φαρμάκων, θα μπορούσε να αποκαλύψει γονίδια-ρυθμιστές της ανθεκτικότητας και πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, με εφαρμογή στην κλινική πράξη.

Η δοξορουβικίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που δρα στοχεύοντας την τοποϊσομεράση II. Η χορήγηση του στις δύο σειρές, έδειξε σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα της ανθεκτικής σειράς στο φάρμακο αυτό (εικόνα 3.9A). Επιπλέον, η φθορίζουσα φύση του φαρμάκου επέτρεψε τον προσδιορισμό των θετικών για το φάρμακο κυττάρων της πατρικής και της ανθεκτικής σειράς (εικόνα 3.9B και 3.9Γ). Ακόμα και στην μεγαλύτερη χορηγούμενη συγκέντρωση της δοξορουβικίνης, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων της ανθεκτικής σειράς φαίνεται να έχει προσλάβει το φάρμακο, σε αντίθεση με την πατρική σειρά, όπου σχεδόν το 100% των κυττάρων είναι θετικά. Η παρατήρηση αυτή, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι με κάποιον μηχανισμό, τα ανθεκτικά

κύτταρα είτε απενεργοποιούν, είτε αποβάλλουν το φάρμακο από το εσωτερικό τους, καταφέροντας έτσι να διαφεύγουν της θεραπείας. Ομάδες γονιδίων που προέκυψαν από την μεταγραφική ανάλυση των σειρών, φάνηκε να συσχετίζονται με την απόκριση στην δοξορουβικίνη. Η «απόκριση στο φάρμακο», ο «μεταβολισμός ξενοβιοτικών», η «διαμεμβρανική μεταφορά» και οι «ABC μεταφορείς» φαίνεται ότι ανήκουν στις στατιστικά σημαντικές διαδικασίες και μονοπάτια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.14). Σε αυτές, εντοπίζονται διαφόρων ειδών διαμεμβρανικοί μεταφορείς, οι οποίοι φαίνεται να συμμετέχουν στην μεταφορά διαφόρων χημικών μορίων, εντός και εκτός των κυττάρων. Μέσα στα υποστρώματα αυτών των ενζύμων ανήκουν και πολλά είδη χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Αρκετά μέλη της ομάδας αυτής έχουν δειχθεί να υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα στον basal-like 1 υπότυπο, και συνδέονται άμεσα με την χημειοανθεκτικότητα, τις μεταστατικές ιδιότητες και πρόγνωση της νόσου (Luo et al. 2021). Η αυξημένη έκφραση αντλιών και μεταφορέων στην ανθεκτική σειρά, όπως και η δράση μεταβολικών ενζύμων αποτοξίνωσης, θα μπορούσαν να συνδέονται με την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα της σειράς και σε άλλα φάρμακα, διαφορετικού μηχανισμού δράσης από αυτόν της πακλιταξέλης, όπως, παραδείγματος χάριν, στην απόκριση της ανθεκτικής σειράς στην δοξορουβικίνη. Η ικανότητα των μεταφορέων αυτών να αποβάλλουν μια ποικιλία χημειοθεραπευτικών από τα κύτταρα, τους καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς παράγοντες της χημειοανθεκτικότητας, έναντι διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων (Fletcher et al. 2010). Η στόχευση των συγκεκριμένων μορίων, θα μπορούσε να έχει πολλαπλά οφέλη έναντι της αναπτυσσόμενης χημειοανθεκτικότητας, αυξάνοντας κατά πολύ την αποτελεσματικότητα διαφορετικών φαρμάκων (Bukowski et al. 2020). Η ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα των μεταβολικών μορίων των κυττάρων, θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην χημειοανθεκτική σειρά. Ο «μεταβολισμός ξενοβιοτικών» περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων, απενεργοποιώντας ενδογενή και εξωγενή χημικά μόρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών, η οικογένεια ενζύμων κυτοχρώματος (CYP), αρκετά μέλη της οποίας φαίνεται να υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση αυτών των ενζύμων αυξάνεται σημαντικά μετά από έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι την ανθεκτικότητα των κυττάρων (Bukowski et al. 2020). Η συνδυαστική δράση των παραπάνω μηχανισμών και η χαμηλή επιλεκτικότητα τους ως προς το είδος του υποστρώματος, προσφέρουν έναν μηχανισμό πολλαπλής ανθεκτικότητας στα καρκινικά κύτταρα, παρεμποδίζοντας την δράση διαφορετικών φαρμάκων. Τόσο οι αντλίες, όσο και τα μεταβολικά ένζυμα έχουν μελετηθεί ως πιθανοί υποψήφιοι φαρμακευτικοί στόχοι (Fletcher et al. 2010) (Newton et al. 2022) (Pecqueur et al. 2013)(Luengo and Gui 2018). Περαιτέρω μελέτη αυτών των βιολογικών διαδικασιών, θα μπορούσε να αποκαλύψει νέους φαρμακευτικούς στόχους, όπως και να διαλευκάνει τον μηχανισμό δράσης τους, ώστε να δρουν συνδυαστικά, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών.

Η ύπαρξη ετερογένειας αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα στον καρκίνο, ιδιαίτερα, στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Η ανάπτυξη

ενδογενούς ετερογένειας εντός του όγκου και η συνύπαρξη διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών, ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το μικροπεριβάλλον ή οι επιγενετικές αλλαγές και συνεισφέρουν στην ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας. Ο υποπληθυσμός των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, αποτελεί μικρό ποσοστό των κυττάρων του όγκου, αλλά λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του (ικανότητα αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και προώθηση της καρκινογένεσης), παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (ενότητα 1.5.8). Συχνά αναφέρεται ως βασικό στοιχείο του όγκου και παράγοντας ενίσχυσης της ανθεκτικότητας (Battle and Clevers 2017). Για τον λόγο αυτό, θελήσαμε να διερευνήσουμε τον υποπληθυσμό αυτό στις δύο σειρές και να εντοπίσουμε πιθανή συμμετοχή του στον χημειοανθεκτικό φαινότυπο. Όπως φάνηκε, το ποσοστό του πληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων παρουσιάζει αύξηση σχεδόν εννέα φορές στην ανθεκτική σειρά, συγκριτικά με την πατρική, στην 2D καλλιέργεια (εικόνα 3.11). Η παρατήρηση αυτή, ενισχύθηκε και από το μεταγραφικό προφίλ της ανθεκτικής σειράς. Βιολογικές διαδικασίες που συμμετέχουν στην οργάνωση του μικροπεριβάλλοντος (extracellular matrix organization), και την αλληλεπίδραση του με τα κύτταρα του όγκου (extracellular matrix organization, ECM-receptor interaction), φαίνεται να περιλαμβάνουν γονίδια, που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.14). Δεδομένα δείχνουν ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου ενισχύει σημαντικά τον υποπληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, προωθώντας με τον τρόπο αυτό την εξέλιξη του όγκου και τα χημειοανθεκτικά του χαρακτηριστικά (Nallasamy et al. 2022), (Zheng, Yu, and Xu 2021). Γνωρίζουμε ότι ο ρόλος της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και του συνολικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου (tumor microenvironment, TME), είτε μέσω κυτταρικών είτε μη κυτταρικών στοιχείων, είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τα κύτταρα του όγκου (Ji et al 2019). Ειδικά, για τον ιδιαίτερο υποπληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs), φαίνεται ότι τα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου ενισχύουν τα χαρακτηριστικά του, προωθώντας της εξέλιξη του όγκου (Nallasamy et al. 2022). Η έκκριση χημικών μορίων, όπως οι κυτοκίνες, από παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος και η αλληλεπίδραση κυτταρικών πληθυσμών, όπως οι ινοβλάστες και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενεργοποιούν βλαστικού τύπου μονοπάτια στα κύτταρα του όγκου, αυξάνοντας την ετερογένεια του και ενισχύοντας την χημειοανθεκτικότητα (Zheng et al. 2021). Επιπλέον, αλλαγές στην δομή και την σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας επηρεάζουν βιολογικές διαδικασίες στα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλοντας και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Deng et al. 2022). Η παρατηρούμενη αλλαγή στην μορφολογία της ανθεκτικής σειράς (εικόνα 3.1B), θα μπορούσε να οφείλεται εν μέρει στις αλλαγές που δημιουργήθηκαν σε παράγοντες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της αλληλεπίδρασης της με τα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον στοιχείο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, είναι η ενεργός παρουσία σηματοδοτικών μονοπατιών, χαρακτηριστικών των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.5.3, παράγοντες των μονοπατιών PI3K-Akt, Wnt και JAK-STAT φαίνεται να υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης τους. Τα μονοπάτια αυτά, συμβάλλουν στα βλαστικά χαρακτηριστικά και τις μεταστατικές ιδιότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, ενισχύοντας και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας

του όγκου έναντι της θεραπείας (Karami et al. 2022). Επιπλέον, για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, προέκυψαν και άλλα δύο μονοπάτια (KEGG pathways), το PI3K-Akt μονοπάτι και το μονοπάτι των MAP κινασών. Το PI3K-Akt εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η αυτοανανέωση και η διαφοροποίηση και αρκετά συχνά εντοπίζεται απορρυθμισμένο στον καρκίνο, όπου φαίνεται να συμμετέχει τόσο στην ανάπτυξη, όσο και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων του όγκου (Fresno Vara et al. 2004). Το μονοπάτι των MAP κινασών είναι υπεύθυνο για την μεταφορά μιτογόνων σημάτων από το εξωτερικό του κυττάρου στον πυρήνα, μέσω ελέγχου των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων. Ευθύνεται για τον έλεγχο διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η κυτταρική γήρανση (McCubrey et al. 2007). Αρκετοί παράγοντες του μονοπατιού αυτού εντοπίζονται συχνά απορρυθμισμένοι στον καρκίνο, έχοντας ως αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση του μονοπατιού (Santarpia, Lippman, and El-Naggar 2012).

Το μεταβολικό προφίλ των δύο κυτταρικών σειρών αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό κριτήριο για την μελέτη της χημειοανθεκτικότητας. Ο μεταβολισμός φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην δημιουργία του χημειοανθεκτικού φαινοτύπου. Τα καρκινικά κύτταρα εξυπηρετούν τις ενεργειακές τους ανάγκες, μέσω ενός ιδιαίτερου μεταβολικού συστήματος, ενώ αρκετές μεταβολικές πορείες λειτουργούν προς όφελος των χημειοανθεκτικών μηχανισμών των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, η έρευνα του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων αποκτά συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, για την μελέτη της χημειοανθεκτικότητας (Kordias et al. 2022) (Wang et al. 2019). Μεταβολικά ένζυμα, αλλά και πορείες μεταβολισμού διαφόρων μορίων, φάνηκε να μεταβάλλονται ήδη από το μεταγραφικό προφίλ της ανθεκτικής σειράς. Στα δεδομένα αυτά προστέθηκε η ανάλυση των μεταβολικών προφίλ και έδειξε πως υπάρχουν πράγματι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο σειρών (ενότητα 3.6). Επιπλέον, αναδείχθηκαν ενδοκυτταριοι μεταβολίτες, όπως η μυο-ινοσιτόλη και η λευκίνη, ως κομβικής σημασίας μόρια για τον διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ (εικόνα 3.21). Η μυο-ινοσιτόλη φαίνεται να εμφανίζει μειωμένα επίπεδα στην ανθεκτική σειρά. Απορρύθμιση του μεταβολισμού της μυο-ινοσιτόλης έχει συνδεθεί με διάφορες ασθένειες, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος. Ιδιαίτερα, στον καρκίνο, φαίνεται ότι η μυο-ινοσιτόλη αποτελεί βασικό παράγοντα της ρύθμισης διαφόρων σημαντικών μονοπατιών για το κύτταρο, όπως, η σηματοδότηση μέσω του PI3K μονοπατιού, αλλά και μονοπάτια βλαστικού τύπου, όπως τα Wnt και Notch (Bizzarri et al. 2016). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις πως ο μεταβολισμός της μυο-ινοσιτόλης ελέγχεται από το p53, το οποίο είναι γνωστό ότι λειτουργεί ογκοκατασταλτικά ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων γονιδίων-στόχων. Μεταξύ των στόχων του p53 είναι και το γονίδιο ISYNA1 (inositol 3-phosphate synthase), το οποίο κωδικοποιεί ένζυμο της βιοσυνθετικής πορείας της μυο-ινοσιτόλης (Koguchi et al. 2016). Μελέτες έχουν συνδέσει την μυο-ινοσιτόλη με παρεμπόδιση της επιθηλιακής-μεσεγγυματικής μετάβασης (Epithelial-Mesenchymal transition) στον καρκίνο του μαστού (Dinicola et al. 2016), ενώ μελέτη σε οκτώ διαφορετικούς καρκινικούς τύπους έδειξε σύνδεση των αλλαγών στις μεταβολικές πορείες της μυο-ινοσιτόλης με την πρόγνωση της νόσου (Tan et al. 2014). Τέλος, η μείωση των επιπέδων της μυο-ινοσιτόλης έχει

δειχθεί και σε άλλη κυτταρική σειρά τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, υποδεικνύοντας ότι η μυο-ινοσιτόλη είναι πιθανό να εμπλέκεται άμεσα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι της πακλιταξέλης σε αυτό τον υπότυπο (Kordias et al. 2022). Συνολικά, φαίνεται ότι η μυο-ινοσιτόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντικαρκινική δράση, μέσω της αλληλεπίδρασης της με διαφορετικά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Επομένως, περαιτέρω διερεύνηση του μεταβολισμού της μυο-ινοσιτόλης και των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτόν, θα μπορούσαν να αποκαλύψουν χρήσιμους παράγοντες για την στόχευση της χημειοανθεκτικότητας. Σε αντίθεση με την μυο-ινοσιτόλη, η λευκίνη εμφανίζεται αυξημένη στην ανθεκτική σειρά, συγκριτικά με την πατρική (εικόνα 3.21). Η λευκίνη είναι ένα αμινοξύ, το οποίο τα κύτταρα δεν μπορούν να συνθέσουν και προσλαμβάνουν αποκλειστικά από το περιβάλλον (Neinast and Murashige 2019). Ο μεταφορέας LAT1 (SLC7A5), αποτελεί τον βασικό μεταφορέα της λευκίνης στα κύτταρα (Neinast and Murashige 2019). Το γονίδιο του μεταφορέα αυτού φαίνεται να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και στο μαστού (Wei et al. 2021). Επιπλέον, διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του γονιδίου του μεταφορέα στα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζεται τον c-Myc (Yue et al. 2017), τον HIF2α (Elorza et al. 2012) και το σηματοδοτικό μονοπάτι NOTCH (Grzes et al. 2017). Στα αποτελέσματα μας αναδείχθηκε και μία σειρά από άλλα αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη και η αργινίνη ενώ σημαντικά εμπλουτισμένο φαίνεται να είναι και το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης (Εικόνα 3.22). Αρκετές μελέτες, έχουν συνδέσει τον μεταβολισμό των αμινοξέων με την εμφάνιση του καρκίνου. Τα αμινοξέα αποτελούν σημαντικές μονάδες του κυττάρου, συμμετέχοντας στην δομή πρωτεϊνών αλλά λειτουργώντας και ως πηγές δομικών μορίων και ενέργειας, στοιχεία απαραίτητα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη (Wei et al. 2021). Έχει δειχθεί ότι η έλλειψη σερίνης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου *in vitro* (Labuschagne et al. 2014) και της ανάπτυξης του όγκου *in vivo* (Maddocks et al. 2013). Τα κύτταρα φαίνεται να προσλαμβάνουν σερίνη από το περιβάλλον, κυρίως μέσω του μεταφορέα SLC38A1 ή του συστήματος ASC (El-Hattab 2016), αλλά είναι ικανά και να συνθέσουν μόρια σερίνης μέσω του αντίστοιχου μονοπατιού βιοσύνθεσης (serine synthesis pathway, SSP), το οποίο θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό για τα καρκινικά κύτταρα (Locasale 2013). Αρκετά ένζυμα της πορείας αυτής (PHGDH, PSAT, and PSPH) έχουν εντοπιστεί υπερεκφρασμένα σε διάφορους τύπους καρκίνου (Wei et al. 2021). Η αργινίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο συντίθεται *de novo* στα κύτταρα, αλλά μπορεί να προσληφθεί και από το περιβάλλον και χρησιμοποιείται, εκτός από την σύνθεση πρωτεϊνών, ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση άλλων αμινοξέων και πολυαμινών (Wei et al. 2021). Βασικοί μεταφορείς της αργινίνης είναι η οικογένεια μεταφορέων CAT και ιδιαίτερα ο CAT-1 (SLC7A1), ο οποίος έχει δειχθεί να υπερεκφράζεται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, μεταξύ αυτών και σε τριπλά αρνητικό καρκίνο (Abdelmagid et al. 2011). Απουσία έκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη βιωσιμότητα και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Abdelmagid et al. 2011).

Η συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων RNA-seq και του μεταβολικού προφίλ έδειξε ομάδες γονιδίων και μεταβολιτών που συμμετέχουν σε κοινά μονοπάτια και βιολογικές διαδικασίες (εικόνα 3.23). Η ανάλυση αυτή έδωσε το μονοπάτι «βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA», ως πιο σημαντικό για τα γονίδια που υπερεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά και το σύνολο των μεταβολιτών, ενώ σημαντική φαίνεται να είναι και η πορεία «γλυκόλυση και γλυκονεογένεση». Το μονοπάτι «βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA» προέκυψε ως πιο σημαντικό και για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά, γεγονός που δείχνει ότι τα γονίδια και οι αντίστοιχοι μεταβολίτες που συμμετέχουν σε αυτό, θα μπορούσαν να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της χημειοανθεκτικότητας. Επιπλέον, εντοπίστηκαν και εδώ μονοπάτια μεταβολισμού αμινοξέων, όπως, ενδεικτικά, η βιοσύνθεση αργινίνης και ο μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης για τα γονίδια που υπερεκφράζονται (εικόνα 3.23), και μεταβολισμός πυροσταφυλικού και βιοσύνθεση αργινίνης για τα γονίδια που υποεκφράζονται στην ανθεκτική σειρά (εικόνα 3.24).

Κάποια πρώτα στοιχεία της μεταβολικής ανάλυσης των δύο σειρών, έδειξαν ότι ο μεταβολισμός συμμετέχει ενεργά στη διαμόρφωση της χημειοανθεκτικής σειράς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να έχουν οι πορείες μεταβολισμού και βιοσύνθεσης διαφόρων αμινοξέων, οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διαμόρφωση του μεταβολικού προφίλ της ανθεκτικής σειράς. Τα επιμέρους ένζυμα που μετέχουν στις μεταβολικές πορείες των αμινοξέων, οι παράγοντες και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την έκφραση τους αλλά και οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς που διαμεσολαμβάνουν την πρόσληψη των αμινοξέων από τα κύτταρα φαίνεται να αποτελούν κομβικής σημασίας παράγοντες για την ανάπτυξη της χημειοανθεκτικότητας. Περαιτέρω μελέτη του μεταβολικού προφίλ και ανάλυση των μεταβολιτών που εντοπίζονται, όπως και ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αυτών με το μεταγραφικό προφίλ των δύο σειρών, θα μπορούσαν να αποκαλύψουν σημαντικά μόρια-στόχους για τον έλεγχο της χημειοανθεκτικότητας και την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου.

Συνοψίζοντας, βασιζόμενοι στην δημιουργία μιας χημειοανθεκτικής τριπλά αρνητικής σειράς καρκίνου του μαστού στην πακλιταξέλη, θελήσαμε αρχικά να μελετήσουμε τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες που προκύπτουν ως επακόλουθα της αναπτυσσόμενης χημειοανθεκτικότητας. Εν συνεχεία, με την βοήθεια του μεταγραφικού προφίλ (RNA-seq) της σειράς, καταφέραμε να εντοπίσουμε και να δώσουμε μία πιθανή εξήγηση για τους μηχανισμούς και τις βιολογικές διαδικασίες πίσω από αυτές τις ιδιότητες. Πρώτα δεδομένα από την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των κυττάρων, φάνηκε να αποκαλύπτονται επιπλέον πληροφορίες, που θα μπορούσαν, σε συνδυασμό με το μεταγραφικό προφίλ, να βοηθήσουν στον εντοπισμό συγκεκριμένων μορίων-στόχων με θεραπευτική αξία στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Chhikara, B. S. & Parang, K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem. Biol. Lett.* **10**, 1–16 (2023)
- ❖ Global Cancer Observatory, International Agency for Research in Cancer, WHO
- ❖ American Cancer Society. cancer facts & figures 2022. (2022)
- ❖ Dieci, M. V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P. & Guarneri, V. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *Oncologist* **19**, 805–813 (2014)
- ❖ Sims, A. H., Howell, A., Howell, S. J. & Clarke, R. B. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 516–525 (2007)
- ❖ Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011)
- ❖ Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, (2010)
- ❖ Dai, X., Xiang, L., Li, T. & Bai, Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J. Cancer* **7**, 1281–1294 (2016)
- ❖ Carey, L. A. *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *J. Am. Med. Assoc.* **295**, 2492–2502 (2006)
- ❖ Choo, J. R. & Nielsen, T. O. Biomarkers for basal-like breast cancer. *Cancers (Basel)*. **2**, 1040–1065 (2010).
- ❖ Rakha, E. A. *et al.* Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2302–2310 (2009).
- ❖ Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **321**, 288–300 (2019)
- ❖ Lumachi *et al.* Endocrine therapy of breast cancer. *Curr. Med. Chem.* **18**, 513–522 (2011).
- ❖ Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000)
- ❖ Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011)
- ❖ Gerdes, M. J. *et al.* Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Front. Oncol.* **4**, 1–12 (2014)
- ❖ F. Michor and K. Polyak. The Origins and Implications of Intratumor Heterogeneity. *Cancer Prev. Res.* **3**, 1361–1364 (2010)
- ❖ Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **533**, 747–752 (2000)
- ❖ Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R. & LLeonart, M. E. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **60**, 166–180 (2020)
- ❖ Wang *et al.* Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist.* **2**, 141–60 (2019)
- ❖ Bukowski, K., Kciuk, M. & Kontek, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020)

- ❖ Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* **26**, 199–212 (2019)
- ❖ Weinhold, B. Epigenetics: the science of change. *Environ. Health Perspect.* **114**, 160–167 (2006)
- ❖ Andrew P, F. & Bert, V. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983)
- ❖ Feinberg, A. P. Advantage At the Expense of the Host. **13**, 497–510 (2015)
- ❖ Bennett, R. L. & Licht, J. D. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **58**, 187–207 (2018)
- ❖ Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159 (2008)
- ❖ Mack, G. S. Epigenetic Inhibitors. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1443–1443 (2006)
- ❖ Chen, Q., Wei, C., Wang, Z. & Sun, M. Long non-coding RNAs in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* **8**, 1925–1936 (2016)
- ❖ Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* **141**, 69–80 (2010)
- ❖ Assaraf, Y. G. et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.* **46**, 100645 (2019).
- ❖ Assaraf, Y. G. & Schimke, R. T. Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7154–7158 (1987).
- ❖ Ramu et al. Doxorubicin resistance in P388 leukemia—evidence for reduced drug influx. *Int. J. Cancer* **44**, 539–547 (1989).
- ❖ Ji et al. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed. Pharmacother.* **114**, 108800 (2019).
- ❖ Peetla et al. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1686–1698 (2013)
- ❖ Bell, C. C. & Gilan, O. Principles and mechanisms of non-genetic resistance in cancer. *Br. J. Cancer* **122**, 465–472 (2020)
- ❖ De Angelis, P. M., Svendsrud, D. H., Kravik, K. L. & Stokke, T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol. Cancer* **5**, 1–25 (2006)
- ❖ Zahreddine, H. & Borden, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **4**, 1–8 (2013)
- ❖ Battle, E. & Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* **23**, 1124–1134 (2017)
- ❖ O. Warburg. On the Origin of Cancer Cells. *Science (80-.).* **123**, 309–314 (1956)
- ❖ Pecqueur, C., Oliver, L., Oizel, K., Lalier, L. & Vallette, F. M. Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *Int. J. Cell Biol.* **2013**, (2013)
- ❖ Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011)
- ❖ Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899 (2004)
- ❖ Wong, K.-K., Engelman, J. A. & Cantley, L. C. Targeting the PI3K pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* **8**, 627–644 (2009)
- ❖ Pathania, S., Bhatia, R., Baldi, A., Singh, R. & Rawal, R. K. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed. Pharmacother.* **105**, 53–65 (2018)
- ❖ Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in

- anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369–7375 (2003)
- ❖ Bardenheuer, W. *et al.* Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* **19**, 2281–2288 (2005)
 - ❖ Lytle, N. K., Barber, A. G. & Reya, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 669–680 (2018)
 - ❖ Ramos, P. & Bentires-Alj, M. Mechanism-based cancer therapy: Resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene* **34**, 3617–3626 (2015).
 - ❖ Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K. Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* **12**, 323–334 (2012)
 - ❖ Rich, J. N. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (Baltimore)*. **95**, (2016)
 - ❖ Bao, B., Ahmad, A., Azmi, A. S., Ali, S. & Sarkar, F. H. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: Implications for cancer therapy. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 1–18 (2013) doi:10.1002/0471141755.ph1425s61
 - ❖ Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997)
 - ❖ Korkaya, H., Liu, S. & Wicha, M. S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* **121**, 3804–3809 (2011)
 - ❖ Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003)
 - ❖ Balicki, D. Moving Forward in Human Mammary Stem Cell Biology and Breast Cancer Prognostication Using ALDH1. *Cell Stem Cell* **1**, 485–487 (2007)
 - ❖ Greaves, M. & Maley, C. C. CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature* **481**, 306–313 (2012)
 - ❖ Lathia, J. D. & Liu, H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Target. Oncol.* **12**, 387–399 (2017)
 - ❖ Azzariti, A. *et al.* Tyrosine kinase inhibitors and multidrug resistance proteins: Interactions and biological consequences. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**, 335–346 (2010)
 - ❖ Gonzalez-Angulo, A., Timms, K., Liu, S. & Al., E. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 - ❖ Wang, S., Meng, Q., Xie, Q. & Zhang, M. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **15**, 1179–1187 (2017).
 - ❖ Bianchini, G., Angelis, C. De, Licata, L. & Gianni, L. Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options , evolving needs. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 93–113 (2022).
 - ❖ Lee, Y. T., Tan, Y. J. & Oon, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 188–196 (2018)
 - ❖ Kaminskas, E., Farrell, A. T., Wang, Y.-C., Sridhara, R. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™) for Injectable Suspension. *Oncologist* **10**, 176–182 (2005).
 - ❖ Goey, A. K., Sissung, T. M., Peer, C. J. & Figg, W. D. Pharmacogenomics

- and histone deacetylase inhibitors. *Pharmacogenomics* **17**, 1807–1815 (2016)
- ❖ Osborne, M. J., Coutinho de Oliveira, L., Volpon, L., Zahreddine, H. A. & Borden, K. L. B. Overcoming Drug Resistance through the Development of Selective Inhibitors of UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes. *J. Mol. Biol.* **431**, 258–272 (2019)
 - ❖ Verigos J, Karakaidos P, Kordias D, et al. The Histone Demethylase LSD1/KDM1A Mediates Chemoresistance in Breast Cancer via Regulation of a Stem Cell Program. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–24 (2019)
 - ❖ www.technologynetworks.com
 - ❖ Januškevičienė, I. & Petrikaitė, V. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sci.* **239**, 117009 (2019)
 - ❖ Kritika Engle, Gautam Kumar, Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 239, 2022, 114542
 - ❖ Jóźwiak, P., Forma, E., Bryś, M. & Krześlak, A. O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, (2014)
 - ❖ oncohemakey.com
 - ❖ Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P. A. & Passegué, E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 16–29 (2011)
 - ❖ Nassar, D. & Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 47–76 (2016)
 - ❖ Hinohara, K. et al. KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* **34**, 939–953.e9 (2018)
 - ❖ Su, Y. et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 13679–13684 (2017)
 - ❖ www.illumina.com
 - ❖ Lehmann, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011)
 - ❖ Dent, R. et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4429–4434 (2007)
 - ❖ Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.* **7**, 339–348 (2017)
 - ❖ Housman, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. **6**, 1769–1792 (2014)
 - ❖ Chun, K. H. & Et.al. *Predicting and overcoming chemotherapeutic resistance in breast cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1026 (2017)
 - ❖ Junttila, M. R. & De Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346–354 (2013)
 - ❖ Gatenby, R. A., Gillies, R. J. & Brown, J. S. The evolutionary dynamics of cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 526–527 (2010)
 - ❖ Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018)
 - ❖ Parkin, B. et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in

- adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **121**, 369–377 (2013)
- ❖ Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W. & Yu, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* **22**, 1–13 (2020)
 - ❖ Echeverria, G. V. *et al.* Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019)
 - ❖ Echeverria, G. V. *et al.* Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019)
 - ❖ Li, W. *et al.* Identification of genes associated with matrix metalloproteinases in invasive lung adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **16**, 123–130 (2018)
 - ❖ Anderson, L. R., Owens, T. W. & Naylor, M. J. Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys. Rev.* **6**, 203–213 (2014)
 - ❖ Santarpia, L., Lippman, S. M. & El-Naggar, A. K. Targeting the MAPKRASRAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 103–119 (2012)
 - ❖ Ferraro, M. G. *et al.* Breast Cancer Chemotherapeutic Options: A General Overview on the Preclinical Validation of a Multi-Target Ruthenium(III) Complex Lodged in Nucleolipid Nanosystems. *Cells* **9**, 1–29 (2020)
 - ❖ Abdullah, L. & Chow, E. Chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**, 1–9 (2013)
 - ❖ Sheila K. Singh *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004)
 - ❖ Caglar, H. O. & Biray Avci, C. Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 3065–3076 (2020)
 - ❖ Dogan, S. M., Ercetin, A. P., Altun, Z., Dursun, D. & Aktas, S. Gene expression characteristics of breast cancer stem cells. *J. B.U.ON.* **20**, 1304–1313 (2015)
 - ❖ Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115 (2007)
 - ❖ Chuthapisith, S., Eremin, J., El-Sheemey, M. & Eremin, O. Breast cancer chemoresistance: Emerging importance of cancer stem cells. *Surg. Oncol.* **19**, 27–32 (2010)
 - ❖ Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14228–14233 (2004)
 - ❖ Creighton, C. J. *et al.* Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13820–13825 (2009)
 - ❖ Xu, W. *et al.* KDM5B demethylates H3K4 to recruit XRCC1 and promote chemoresistance. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1122–1132 (2018)
 - ❖ Yang, L. *et al.* *Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 (Springer US, 2020)
 - ❖ Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 147–156 (2010)
 - ❖ Awasthi, N., Liongue, C. & Ward, A. C. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non - canonical functions in immunity and cancer. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 1–17 (2021)

- ❖ Karami, M. *et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells. *Pathol. - Res. Pract.* **237**, (2022)
- ❖ Zheng, X., Yu, C. & Xu, M. Linking Tumor Microenvironment to Plasticity of Cancer Stem Cells: Mechanisms and Application in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* **11**, 1–8 (2021)
- ❖ Nallasamy, P. *et al.* Tumor microenvironment enriches the stemness features: the architectural event of therapy resistance and metastasis. *Mol. Cancer* **21**, 1–25 (2022)
- ❖ Li, M. H. *et al.* Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol.* **40**, 63–70 (2004)
- ❖ Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J. & Chen, W. S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* **13**, 1551–1569 (2008)
- ❖ Newman, E. M. & Santi, D. V. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorodeoxycytidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6419–6423 (1982)
- ❖ Jones, S. Head-to-head: docetaxel challenges paclitaxel. *Eur. J. Cancer, Suppl.* **4**, 4–8 (2006)
- ❖ Sun, Y., Liu, Y., Ma, X. & Hu, H. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–25 (2021)
- ❖ Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011)
- ❖ Kordias, D. *et al.* Omics Analysis of Chemoresistant Triple Negative Breast Cancer Cells Reveals Novel Metabolic Vulnerabilities. *Cells* **11**, 1–23 (2022)
- ❖ Eniafe, J. The functional roles of TCA cycle metabolites in cancer. *Oncogene* **40**, 3351–3363 (2021)
- ❖ Marquez, J. *et al.* Rescue of TCA Cycle Dysfunction for Cancer Therapy. *J. Clin. Med.* **8**, 1–18 (2019)
- ❖ Luengo, A. & Gui, D. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018)
- ❖ Cabral-Pacheco, G. A. *et al.* The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–53 (2020)
- ❖ Kapoor, C. *et al.* Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J. Cancer Res. Ther.* **12**, 28–35 (2016)
- ❖ Newton, E. E., Mueller, L. E., Treadwell, S. M., Morris, C. A. & Machado, H. L. Molecular Targets of Triple-Negative Breast Cancer: Where Do We Stand? *Cancers (Basel)*. **14**, 1–15 (2022)
- ❖ Paul DM, Garrett AM, Meshad M, DeVore RD, Porter LL, Johnson DH. Paclitaxel and 5-fluorouracil in metastatic breast cancer: the US experience. *Semin Oncol.* 1996 Feb;23(1 Suppl 1):48–52.
- ❖ Klaassen U, Harstrick A, Wilke H, Seeber S. Preclinical and clinical study results of the combination of paclitaxel and 5-fluorouracil/folinic acid in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 1996 Feb;23(1 Suppl 1):44–7
- ❖ Bizzarri, M., Dinicola, S., Bevilacqua, A. & Cucina, A. Broad Spectrum Anticancer Activity of Myo-Inositol and Inositol Hexakisphosphate. *Int. J. Endocrinol.* **2016**, (2016)
- ❖ Dinicola, S. *et al.* Inositol induces mesenchymal-epithelial reversion in breast cancer cells through cytoskeleton rearrangement. *Exp. Cell Res.* **345**, 37–50 (2016)
- ❖ Koguchi, T., Tanikawa, C., Mori, J., Kojima, Y. & Matsuda, K. Regulation of myo-inositol biosynthesis by p53-ISYNA1 pathway. *Int. J. Oncol.* **48**, 2415–

2424 (2016)

- ❖ Tan, J. *et al.* Genetic variants in the inositol phosphate metabolism pathway and risk of different types of cancer. *Sci. Rep.* **5**, 1–8 (2014)
- ❖ Abdelmagid, S. A., Rickard, J. A., McDonald, W. J., Thomas, L. N. & Too, C. K. L. CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of nitric oxide synthases for the survival of human breast cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.* **112**, 1084–1092 (2011).
- ❖ Grzes, K. M. *et al.* Control of amino acid transport coordinates metabolic reprogramming in T-cell malignancy. *Leukemia* **31**, 2771–2779 (2017)
- ❖ Yue, M., Jiang, J., Gao, P., Liu, H. & Qing, G. Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis. *Cell Rep.* **21**, 3819–3832 (2017)
- ❖ Elorza, A. *et al.* HIF2 α Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Mol. Cell* **48**, 681–691 (2012)
- ❖ Neinast, M. & Murashige, D. Branched Chain Amino Acids. *Annu. Rev. Physiol.* **81**, 139–164 (2019)
- ❖ Van Geldermalsen, M. *et al.* ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 3201–3208 (2016)
- ❖ El-Hattab, A. W. Serine biosynthesis and transport defects. *Mol. Genet. Metab.* **118**, 153–159 (2016)
- ❖ Locasale, J. W. Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 572–583 (2013)
- ❖ Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W. & Yi, P. Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2021)
- ❖ Lieu, E. L., Nguyen, T., Rhyne, S. & Kim, J. Amino acids in cancer. *Exp. Mol. Med.* **52**, 15–30 (2020)
- ❖ Maddocks, O. D. K. *et al.* Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* **493**, 542–546 (2013)
- ❖ Labuschagne, C. F., van den Broek, N. J. F., Mackay, G. M., Vousden, K. H. & Maddocks, O. D. K. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep.* **7**, 1248–1258 (2014)
- ❖ Rivera, E. & Gomez, H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer - the evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Res.* **12**, 1–12 (2010)
- ❖ Blum, B. J. L. *et al.* Multicenter Phase II Study of Capecitabine in Paclitaxel-Refractory Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **17**, 485–493 (1999)
- ❖ Hernandez-Aya, L. F. & Ma, C. X. Chemotherapy principles of managing stage IV breast cancer in the United States. *Chinese Clin. Oncol.* **5**, (2016)
- ❖ Papamichael, D. The Use of Thymidylate Synthase Inhibitors in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Current Status. *Oncologist* **4**, 478–487 (1999).