



Εθνικό και Καποδιστριακό
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΝΤΟΣ**

**ΝΕΟΙ ΛΑΚΤΑΜΙΚΟΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΑΛΚΥΛΙΩΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ
ΤΩΝ *PARP1/ PARP2* ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ**

**ΝΙΚΟΛΕΟΥΣΑΚΟΣ Π. ΝΙΚΟΛΑΟΣ
Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος, BSc**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2022

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2).

Στοιχεία διδακτορικής διατριβής

Θέμα: Νέοι λακταμικοί στεροειδείς αλκυλιωτές αναστολείς των PARP-1 και PARP-2 για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.

- Ημερομηνία υποβολής αίτησης: 01/07/2013
- Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 06/02/2014
- Ημερομηνία ορισμού θέματος της διδακτορικής διατριβής: 02/05/2014
- Ημερομηνία αίτησης για αντικατάσταση μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής (λόγω θανάτου του Καθηγητή Ν. Σιταρά): 02/11/2016

Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. **Δημήτριος Τραφαλής**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Επιβλέπον Μέλος ΔΕΠ
2. **Αντώνιος Τσαρμπόπουλος**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
3. **Ιορδάνης Μουρούζης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 01/02/2022

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γκρινιάτσος Ιωάννης, Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Τσαρμπόπουλος Αντώνιος, Καθηγητής Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Τραφαλής Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Μουρούζης Ιορδάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Δάλλα Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Αρμακόλας Αθανάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

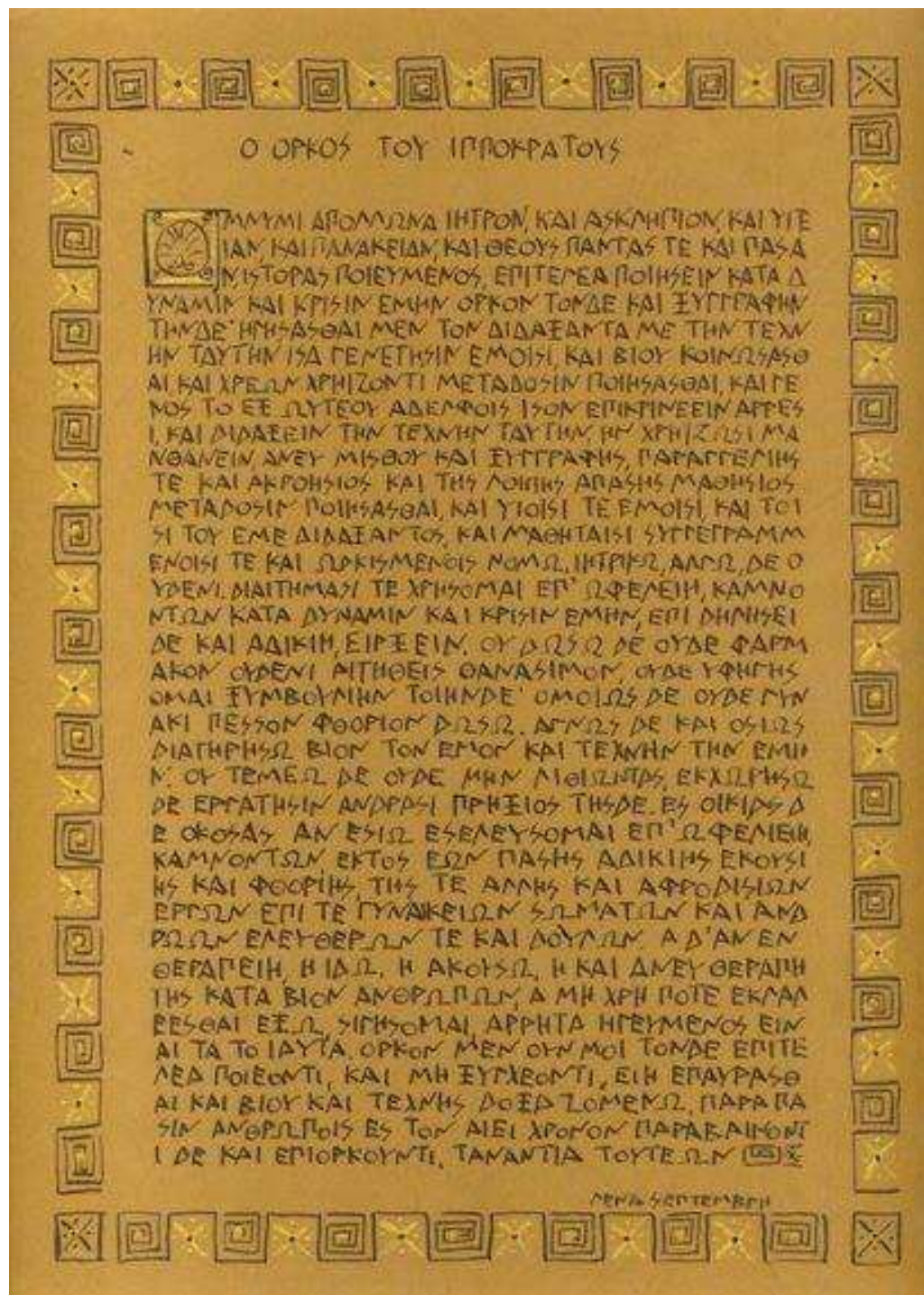
Βαθμός αποδοχής της διατριβής:

ΑΡΙΣΤΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών: Καθηγητής Γεράσιμος Σιάσος

Στις θυσίες και στην μνήμη της μητέρας μου Μαρίας,
στη στήριξη και στην άνευ όρων αγάπη του πατέρα μου Πέτρου

Ὁρκος του Ιπποκράτη



Βιογραφικό Σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο: Νικόλαος Π. Νικολεουσάκος

Ημερομηνία Γέννησης: 21-02-1989

Ιδιότητα: Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ/ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2006: Αποφοίτηση Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης από Ελληνογαλλική Σχολή "Jeanne D'Arc"

2006 - 2013 : Αποφοίτηση από Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας (Α.Ε.Ι) - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (βαθμός 6,51 "ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ")

- 2009, Ιούλιος- Αύγουστος: Δίμηνη πρακτική στην κλινική "Παναγία η Οδηγήτρια", Πειραιάς
- 2010- 2011: Οκτάμηνη πτυχιακή εργασία στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Ε.Ι.Ε./ Τμήμα Δομικής Χημείας), Αθήνα

Θέμα: "ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΦΑΡΜΑΚΑ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ"

- 2012: Δημοσίευση με θέμα: "The σ-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b."

2011- 2012: Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας (401 Γ.Σ.Ν.Α.)

2013-2014: Απόφοιτος σπουδών Ι.Ι.Ε.Κ. ΞΥΝΗ, Τμήμα Τεχνικών Υπολογιστών και Δικτύων, Βεβαίωση Επαγγελματικής Κατάρτισης (1263 ώρες σεμιναριακής παρακολούθησης)

2014 – σήμερα: ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ ΔΙΔΑΚΤΩΡ τμήματος Ιατρικής Ε.Κ.Π.Α., Εργαστήριο Φαρμακολογίας, με θέμα της διδακτορικής διατριβής «Νέοι λακταμικοί στεροειδείς αλκυλιωτές αναστολείς των *PARP-1* και *PARP-2* για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

2014-σήμερα: Διευθύνων/ Ιδιοκτήτης της εταιρείας βιοτεχνολογικών ερευνών ΜΕΤΑΦΑΣΙΣ ΘΕΡΑΤΕΚ ΜΟΝΟΠΡΟΣΩΠΗ Ι.Κ.Ε.

2020-σήμερα: Διευθύνων/ Ιδιοκτήτης Κέντρου Ειδικής Αγωγής και Διαπαιδαγώγησης

ΣΥΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Nikoleousakos N, Dalezis P, Polonifi A, Geromichalou EG, Sagredou S, Alifieris CE, Deligiorgi MV, Sarli V, Trafalis DT. Cytocidal Antitumor Effects against Human Ovarian Cancer Cells Induced by B-Lactam Steroid Alkylators with Targeted Activity against Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Enzymes in a Cell-Free Assay. *Biomedicines*. 2021 Aug 17;9(8):1028. doi: 10.3390/biomedicines9081028. PMID: 34440232; PMCID: PMC8394033.
2. Trafalis DT, Sagredou S, Dalezis P, Voura M, Fountoulaki S, Nikoleousakos N, Almpantakis K, Deligiorgi MV, Sarli V. Anticancer Activity of Triazolo-Thiadiazole Derivatives and Inhibition of AKT1 and AKT2 Activation. *Pharmaceutics*. 2021 Apr 5;13(4):493. doi: 10.3390/pharmaceutics13040493. PMID: 33916378; PMCID: PMC8066331.
3. Sagredou S, Dalezis P, Nikoleousakos N, Nikolaou M, Voura M, Almpantakis K, Panayiotidis MI, Sarli V, Trafalis DT. 3,6-Disubstituted 1,2,4-Triazolo[3,4-*b*]Thiadiazoles with Anticancer Activity Targeting Topoisomerase II Alpha. *Onco Targets Ther*. 2020 Jul 28;13:7369-7386. doi: 10.2147/OTT.S254856. PMID: 32801761; PMCID: PMC7395825.
4. Dalezis P, Geromichalou E, Polonifi A, Sagredou S, Nikoleousakos N, Nikolaou M, Sarli V, Panayiotidis MI, Trafalis DT. Azasteroid Alkylators as Dual Inhibitors of AKT and ERK Signaling for the Treatment of Ovarian Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020 May 16;12(5):1263. doi: 10.3390/cancers12051263. PMID: 32429466; PMCID: PMC7281072.
5. Trafalis DT, Polonifi A, Dalezis P, Nikoleousakos N, Katsamakas S, Sarli V. Targeting on poly(ADP-ribose) polymerase activity with DNA-damaging hybrid lactam-steroid alkylators in wild-type and *BRCA1*-mutated ovarian cancer cells. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Nov;90(5):854-866. doi: 10.1111/cbdd.13006. Epub 2017 May 26. PMID: 28432813.
6. Trafalis D, Geromichalou E, Dalezis P, Nikoleousakos N, Sarli V. Synthesis and evaluation of new steroidal lactam conjugates with aniline mustards as potential antileukemic therapeutics. *Steroids*. 2016 Nov;115:1-8. doi: 10.1016/j.steroids.2016.07.009. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27473822.
7. Kantsadi AL, Hayes JM, Manta S, Skamnaki VT, Kiritsis C, Psarra AM, Koutsogiannis Z, Dimopoulou A, Theofanous S, Nikoleousakos N, Zoumpoulakis P, Kontou M, Papadopoulos G, Zographos SE, Komiotis D, Leonidas DD. The σ -hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b. *ChemMedChem*. 2012 Apr;7(4):722-32. doi: 10.1002/cmdc.201100533. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22267166.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	14
ABSTRACT	15
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	17
1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	17
1.1.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	17
1.1.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ	18
1.1.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	19
1.1.3.A ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	19
1.1.3.B. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ	20
1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ – ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΓΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	21
1.3 ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	24
1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	26
1.4.1 <i>BRCA1</i> ΚΑΙ <i>BRCA2</i>	26
1.4.1.A <i>BRCA1</i> ΚΑΙ <i>BRCA2</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	29
1.4.1.B ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΩΝ <i>BRCA1</i> ΚΑΙ <i>BRCA2</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	29
1.4.2 ΣΠΟΡΑΔΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	32
1.4.3 ΆΛΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	34
1.4.3.A ΚΥΚΛΙΝΕΣ, <i>P16</i>	34
1.4.3.B ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFRS)	35
1.4.3.Γ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	36
2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA DAMAGE RESPONSE, DDR)	37

2.1 ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ ΔΙΠΛΗΣ ΕΛΙΚΑΣ ΤΟΥ DNA (DOUBLE STRAND BREAK, DSB).....	38
2.1.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ.....	43
2.1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>BRCA1</i> ΚΑΙ <i>BRCA2</i> ΣΤΟΝ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	43
2.2 ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ ΜΟΝΗΣ ΕΛΙΚΑΣ ΤΟΥ DNA (SINGLE STRAND BREAK, SSB) ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ.....	46
2.2.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>PARP</i> ΣΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΜΟΝΗΣ ΕΛΙΚΑΣ (SSB) ΤΟΥ DNA.....	48
2.3 ΑΛΚΥΛΙΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΒΛΑΒΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.	49
3. Η ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥ (ADP-RIBOΖΗΣ) 1 (<i>PARP-1</i>).....	51
3.1 ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ PARPS.....	51
3.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>PARP-1</i>	53
3.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ <i>PARP-1</i>	57
3.3.1 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ – ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ DNA.....	58
3.3.1.A Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ <i>PARP-1</i> ΩΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΕΓΚΟΠΩΝ	62
3.3.1.B ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	63
3.3.1.Γ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΡΥΘΜΙΣΕΙΣ- ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....	66
3.3.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	68
3.3.2.A ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	68
3.3.2.B ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ – PARΘΑΝΑΤΟΣ.....	68
3.3.2.Γ ΑΠΟΠΤΩΣΗ – ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΚΡΩΣΗ (ΝΕΚΡΟΠΤΩΣΗ).....	74
3.3.2.Δ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....	76
3.3.2.Ε <i>PARP-1</i> ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	78
3.3.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	79
3.3.3.A ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PAR ΑΠΟ ΤΗΝ PARG	80
3.3.3.B ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ <i>PARP-1</i>	81
3.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ <i>PARP-1</i>	82
3.4.1 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	83
3.4.1.A ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ <i>PARP-1</i> ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	85

3.4.2. ΦΛΕΓΜΟΝΗ	86
3.4.3. ΝΕΥΡΩΝΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	87
3.4.4 ΓΗΡΑΝΣΗ.....	88
4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ <i>PARP-1</i> ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΘΗΚΩΝ	89
4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (SYNTHETIC LETHALITY)	89
4.2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ <i>PARP-1</i>	90
5. <i>IN SILICO</i> ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ - ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	96
5.1 ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (RATIONAL DRUG DESIGN) ΣΤΙΣ <i>in silico</i> ΜΕΛΕΤΕΣ	97
5.1.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ (MOLECULAR DOCKING)	98
5.1.2 ADME(T) ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	98
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
6. ΣΚΟΠΟΣ	104
7. ΥΛΙΚΑ	105
7.1 ΕΝΩΣΕΙΣ	105
7.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	114
8. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	117
8.1 <i>IN SILICO</i> ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ	117
8.1.1 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	117
8.1.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ <i>IN SILICO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ <i>PARP-1</i> ΚΑΙ <i>PARP-2</i>	120
8.1.2.Α ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	120
8.1.2.Β ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (<i>IN SILICO</i> ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ).....	121
8.1.2.Γ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ – ΣΤΟΧΟΥ	121
8.1.2.Δ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΟΡΙΩΝ- ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ	122
8.1.2.Ε ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΜΕ ΤΟ GLIDE	123
8.1.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	128

8.2 <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ	136
8.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	136
8.2.2 ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (MTT)	138
8.2.3 ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ <i>PARP-1</i> / <i>PARP-2</i>	139
8.2.4 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ: <i>PARP-1</i> ΚΑΙ <i>PARP-2</i>	141
8.2.4.A ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	141
8.2.4.B ΣΥΝΘΕΣΗ CDNA	142
8.2.4.Γ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ QRT-PCR	142
8.2.4.Δ PCR ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (QRT-PCR)	143
8.2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	146
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	147
9.1 ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ ΑΛΚΥΛΙΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	147
9.1.1 <i>IN SILICO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ ΑΛΚΥΛΙΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	147
9.1.2 <i>IN SILICO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ ΑΛΚΥΛΙΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	151
9.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ <i>IN VITRO</i> ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ	160
9.2.1 <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗΣ- ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ A, B, C, D, E	161
9.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ <i>PARP</i> ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ	167
9.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>PARP-1</i> ΚΑΙ <i>PARP-2</i>	172
9.3.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>PARP-1</i> ΚΑΙ <i>PARP-2</i> ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	172
9.3.2 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ <i>PARP-1</i> ΚΑΙ <i>PARP-2</i> ΜΕ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	175
9.3.2.A ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	183
10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	186

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Βασικών Ιατρικών Επιστημών, της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη και την συνεχή καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, κ. Τραφαλή Δημητρίου. Βασική επιδίωξη αποτέλεσε εξ αρχής για τον συγγραφέα, η παρούσα μελέτη να τοποθετήσει, όπως συχνά λέμε, ένα ακόμα «λιθαράκι», μικρό ή μεγαλύτερο, στη μακροσκελή, επίπονη και μακροχρόνια ερευνητική προσπάθεια για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τον καρκίνο, μια νόσο τόσο πολυπαραγοντική και πολύπλευρη, που είναι δύσκολο τελικά να χαρακτηριστεί πράγματι ως μία και μόνο νόσος.

Με την ευκαιρία που μου δίνεται, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά και απερίφραστα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Τραφαλή Δημήτριο, περισσότερο από όλα για την αδιάκοπη προσπάθειά του να μου εμφυσήσει το διερευνητικό πνεύμα που τον διακατέχει, την εξέχουσα επιστημονική του κατάρτιση που άνοιξε νέους ορίζοντες σκέψης για εμένα, αλλά και την απεριόριστη υπομονή του και τη θέληση να διαθέσει τον απαραίτητο χρόνο σε εξηγήσεις και συζητήσεις επί μακρόν, μέχρι και την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Ακόμα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής μου, τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Αντώνιο Τσαρμπόπουλο και τον αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Ιορδάνη Μουρούζη, για την εμπιστοσύνη, τη συνέπεια και την επιστημονική τους αρωγή προς το έργο μου, όπως βέβαια και στον Διευθυντή του Εργαστηρίου της Φαρμακολογίας, Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πάντο, που υπό τη «στέγη» του, υποστηρίζει πάντα τη διάχυση της επιστημονικής γνώσης και τη διεύρυνση των γνώσεων των βιοϊατρικών μας δεδομένων.

Ένα ιδιαίτερα ξεχωριστό «ευχαριστώ» εκφράζω από τα βάθη της καρδιάς μου, προς τον βιολόγο Δρ. Παναγιώτη Δαλέζη, έναν μέντορα για μένα, πλέον συνάδελφο και φίλο, ο οποίος απλόχερα μου χάρισε όλο το εύρος της τεχνογνωσίας και της εμπειρίας του, που ο ίδιος απέκτησε με μακρόχρονη και σκληρή προσπάθεια στην επαγγελματική του σταδιοδρομία. Η αμέριστη βοήθειά του, εξασφάλισε τη δυνατότητα ολοκλήρωσής της διατριβής αυτής.

Τέλος, στις ευχαριστίες μου είναι αδύνατον να μην αναφέρω τον εκλιπόντα Καθηγητή Νικόλαο Σιταρά, έναν σπουδαίο άνθρωπο από κάθε άποψη, ο οποίος όταν ξεκίνησα τη διατριβή μου, στάθηκε δίπλα μου σε προσωπικό και ακαδημαϊκό επίπεδο, ως ένας «μεγάλος» διδάσκαλος, αλλά πάντα απλός και έτοιμος να βοηθήσει με κάθε δυνατό μέσο.

Στο σημείο αυτό είθιστε να ευχαριστεί κανείς την οικογένεια ή τους φίλους του. Εγώ θα προτιμήσω να μην καταχραστώ τον χώρο γι' αυτό. Άλλωστε, οι ίδιοι γνωρίζουν πολύ καλά και εμπράκτως. Γιατί οι πράξεις είναι που μένουν και ως μετρήσιμο στοιχείο. Θα πω μόνο για όσους δεν είναι πια κοντά μας, αν μη τι άλλο σαν καταγραφή, ότι τους ευχαριστώ για όλα όσα μου προσέφεραν και ότι θα προσπαθώ στη ζωή μου να κάνω ό,τι καλύτερο μπορώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ερευνάται η αντικαρκινική δράση νεοσυντιθέμενων ομο-αζα-στεροειδικών παραγώγων έναντι καρκινικών κυττάρων ωοθηκών.

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο για το γυναικείο πληθυσμό. Επί του παρόντος, η συνηθέστερη θεραπεία περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση και συνδυαστική χημειοθεραπεία πλατίνας / ταξανών. Ωστόσο, η θεραπεία αποδεικνύεται αναποτελεσματική για ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών λόγω της εμφάνισης ανθεκτικότητας στα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Κατά συνέπεια, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων ικανών να παρακάμπτουν τη χημειο-ανθεκτικότητα και παράλληλα να βελτιστοποιούν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, ελαττώνοντας ταυτόχρονα τις τοξικές δράσεις των φαρμάκων. Κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού και της δίκλωνης επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού.

Οι PARPs, με έμφαση στην *PARP-1* και *PARP-2* που κυριαρχούν (80% περίπου όλων των λειτουργιών), αποτελούν πρωτεϊνικά μόρια που εμφανίζονται σε ποικιλία από βιοχημικές διαδικασίες και μοριακά μονοπάτια. Ένα από αυτά, είναι ένας δεύτερος βασικός μηχανισμός επιδιόρθωσης, η επιδιόρθωση μονού κλώνου του DNA, που αναλαμβάνει σε κύτταρα με έλλειψη *BRCA* λειτουργικότητας και αφορά την ενεργότητα των ενζύμων *PARP-1/2*. Καρκινικά κύτταρα με τέτοια δυσλειτουργικότητα, αποτελούν εξαιρετικό στόχο για φαρμακευτική χρήση αναστολέων των ενζύμων *PARP*, αφού παρακάμπτεται η επιδιόρθωση και επέρχεται κυτταρικός θάνατος.

Η μεθοδολογία της παρούσας ερευνητικής διατριβής περιλαμβάνει δύο πειραματικές προσεγγίσεις: Η πρώτη αφορά τον *in silico* σχεδιασμό, την αξιολόγηση των ADMET ιδιοτήτων και της ανασταλτικής προς τις *PARP* λειτουργίας μέσω μοντελικής μοριακής πρόσδεσης (molecular docking), αλλά και τη σύνθεση όσων νέων αζωτούχων στεροειδών μορίων προκριθούν από τις παραπάνω διαδικασίες, ενώ η δεύτερη επικεντρώνεται στην αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας τους *in vitro* και μοριακά, μέσω μεθόδων MTT, χρωματομετρίας ELISA και PCR ως προς την κυτταροτοξικότητα, την αναστολή της *PARP* και τις μεταγραφικές τους επιδράσεις αντίστοιχα.

Τα νέα μελετούμενα μόρια έχουν δομή υβριδικών- λακταμικών στεροειδών παραγώγων, συζευγμένα με αλκυλιωτές, δηλαδή τοξικά μόρια που προκαλούν βλάβη στο DNA. Από τα αποτελέσματα της μελέτης, αποδεικνύεται ότι αποτελούν αντικαρκινικούς παράγοντες με εξειδικευμένη κυτταροτοξική δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, ενώ παράλληλα εμφανίζουν μειωμένη τοξικότητα και σημαντική ανασταλτική δράση προς τις πρωτεΐνες *PARP-1* και *PARP-2*.

ABSTRACT

The purpose of this dissertation is to investigate the antitumor potential of some innovative and newly synthesized homo-aza-steroid derivatives against ovarian cancer cells.

Ovarian cancer is one of the most common causes of death in the female population. Currently, the usual treatment includes surgery and a combination of platinum/ taxane chemotherapy. However, the treatment proves ineffective for a high percentage of patients, due to the emergence of drug resistance in many chemotherapeutic procedures. Therefore, it is critical to develop new therapeutic approaches, capable of bypassing any chemo-resistance, and at the same time optimizing the effectiveness of the treatment, while reducing the drug toxic effects. Inherited mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes have been associated with an increased risk of ovarian cancer. These genes are involved in DNA repair, through homologous recombination and double-stranded repair of the genetic material (DNA).

PARPs, with an emphasis on the predominant *PARP-1* and *PARP-2* (approximately 80% of all the functionality), are protein molecules that participate in a variety of biochemical processes and molecular pathways. One of them is a second key repair mechanism, the single-strand DNA repair, which takes place mainly in BRCA-deficient cells, involving the activity of PARP-1/2 enzymes. Cancer cells with such a dysfunction, are an excellent target for pharmaceutical use of PARP enzyme inhibitors, as repair is bypassed and cell death occurs.

The methodology of the present research dissertation includes two experimental approaches: The first one concerns the *in silico* design, the evaluation of the ADMET properties and of the PARP inhibitory potential of the tested compounds, through molecular docking, but also the chemical synthesis of the new compounds found efficient/ competent through the above procedures. The second approach is focused on the evaluation of the compounds' biological activity *in vitro* and on a molecular level, through MTT, ELISA and PCR, in terms of cytotoxicity, inhibition of PARP and their transcriptional effects respectively.

The novel studied molecules take a structure of a hybrid-lactam steroid derivative, conjugated to an alkylator, i.e. toxic molecule that cause DNA damage. The results of this study indicate that they are indeed anti-cancer agents, with specific cytotoxic activity, mostly against cancer cells. They present both reduced toxicity and significant inhibitory effect on PARP-1 and PARP-2 proteins, at the same time.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

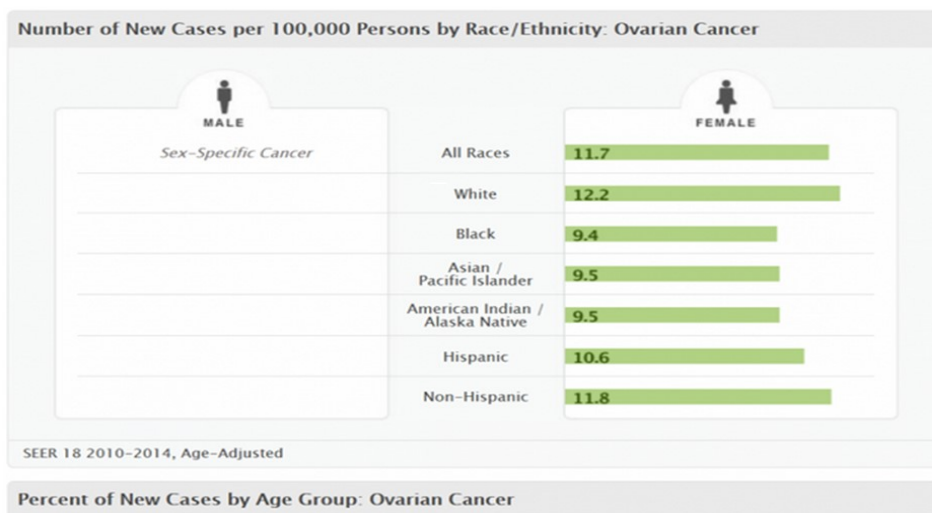
1.1 Επιδημιολογία του Καρκίνου των ωοθηκών

1.1.1 Στατιστικά στοιχεία

Ο καρκίνος των ωοθηκών, είναι μια ομάδα νεοπλασιών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, που εδράζεται στις ωοθήκες, τους γεννητικούς αδένες της γυναίκας. Τα όργανα αυτά βρίσκονται στην πύελο, δεξιά και αριστερά από τη μήτρα και παράγουν τα ωάρια (κατά την αναπαραγωγική ηλικία) και τις θηλυκές ορμόνες, οιστρογόνα και προγεστερόνη.

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η πέμπτη κύρια αιτία θανάτου συνδεόμενη με τον καρκίνο στις γυναίκες και είναι ο πιο θανατηφόρος από τους γυναικολογικούς καρκίνους [1]. Τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου είναι ελαφρώς υψηλότερα για τις γυναίκες της Καυκάσιας φυλής από ό,τι για της Αφρικής και της Αμερικής [2, 3] (Εικόνα 1.1).

Με βάση πρόσφατα στοιχεία του Προγράμματος επιτήρησης και επιδημιολογίας (SEER) του Εθνικού Αμερικάνικου Ινστιτούτου Καρκίνου ο καρκίνος των ωοθηκών αντιπροσωπεύει το 2,5% των καρκίνων στις γυναίκες [2, 3]. Τα ποσοστά θνησιμότητας για τον καρκίνο των ωοθηκών παραμένουν υψηλά και έχουν μειωθεί ελάχιστα στα σαράντα χρόνια από την «κήρυξη του πολέμου στον καρκίνο» [4, 5]. Ωστόσο, άλλοι καρκίνοι έχουν δείξει πολύ μεγαλύτερη μείωση της θνησιμότητας, λόγω ποικίλων παραγόντων.



[SEER Cancer Statistics Factsheets: Ovary Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD](#)

Εικόνα 1.1. Ποσοστιαία εμφάνιση νόσου σε γυναίκες με βάση τη φυλή και την εθνότητα- NATIONAL CANCER INSTITUTE

1.1.2 Αιτιολογία

Ενώ οι αιτίες του καρκίνου των ωοθηκών είναι ακόμα άγνωστες, οι επιστήμονες αποδίδουν τα αίτια σε:

- γενετικά σφάλματα που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της ζωής τους, γνωστά ως επίκτητες μεταλλάξεις γονιδίων (σωματικές)
- κληρονομικές μεταλλάξεις γονιδίων που είναι γνωστές ως γενετικές μεταλλάξεις
- συσχέτισμό με την ωορρηξία
- συσχέτισμό με ανδρογόνα, που αν και βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα στις γυναίκες μπορεί να παίζουν ρόλο στον καρκίνο των ωοθηκών
- εξωτερικές ουσίες που μπορούν να εισέλθουν στο σώμα μέσω του κόλπου και να περάσουν μέσα από τη μήτρα και τις σάλπιγγες στις ωοθήκες, όπου δύνανται να προκαλέσουν καρκίνο.

Επιπρόσθετα, με βάση ερευνητικές μελέτες, πιστεύεται ότι πολλοί, αν όχι όλοι οι κακοήθεις όγκοι των ωοθηκών (ο πιο συνηθισμένος τύπος όγκων) που προηγουμένως θεωρούνταν ότι

προέρχονται από τις ωοθήκες, προέρχονται από πρόδρομες βλάβες που αρχίζουν από τις σάλπιγγες. Το πρωτογενές περιτοναϊκό καρκίνωμα (PPC) πιστεύεται ότι αναπτύσσεται από κύτταρα στην «επένδυση» της κοιλίας και της λεκάνης, που ονομάζεται περιτόναιο. Αυτά τα κύτταρα είναι παρόμοια με τα κύτταρα στην επιφάνεια των ωοθηκών. Άλλοι υπότυποι μοιράζονται μοριακές ομοιότητες με άλλα καρκινώματα που προέρχονται από τη σάλπιγγα ή αλλού, με τους περισσότερους επιθηλιακούς καρκίνους, οπότε αντιμετωπίζονται με παρόμοιες προσεγγίσεις. Ανεξάρτητα από την περιοχή προέλευσης, το σήμα κατατεθέν αυτών των καρκίνων είναι η πρώιμη περιτοναϊκή τους διάδοση ή μεταστάσεις [2, 3, 5–8].

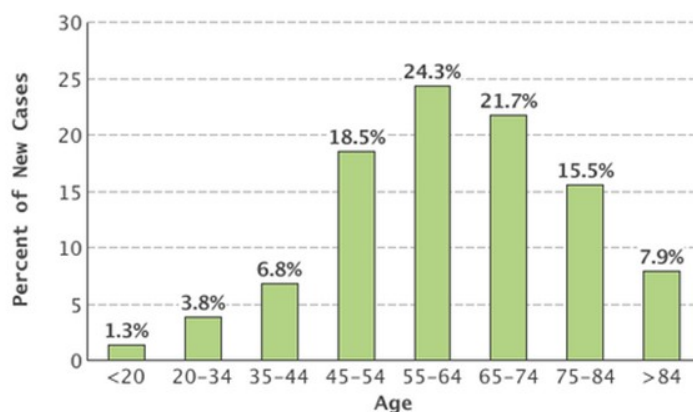
1.1.3 Συχνότητα και Παράγοντες κινδύνου

Σπάνιοι όγκοι. Η πιθανότητα να αναπτύξει μία γυναίκα καρκίνο των ωοθηκών μέχρι την ηλικία των 85 ετών είναι 1,6% (ενώ η πιθανότητα να αναπτύξει καρκίνο του μαστού είναι σχεδόν δεκαπλάσια 11,1%). Ο κίνδυνος μιας γυναίκας να αναπτύξει διηθητικό καρκίνο των ωοθηκών είναι 1 στις 79, ενώ να πεθάνει από επιθετικό καρκίνο των ωοθηκών είναι 1 στις 109 [2–4].

Παράγοντες που μειώνουν τον αριθμό ωορρηξιών σε όλη τη ζωή ενός ατόμου έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών χαπιών, το θηλασμό και την ωοθηκεκτομή [9, 10]. Παρομοίως, υπάρχουν παράγοντες που έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένης της γήρανσης, της πρώιμης εμμηνόρροιας, της όψιμης εμμηνόπαυσης, της υψηλής διατροφικής πρόσληψης λίπους και της χρήσης της θεραπείας αντικατάστασης οιστρογόνων [5]. Ωστόσο, οι δύο πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι η ηλικία διάγνωσης και το οικογενειακό ιστορικό [11].

1.1.3.α Ηλικία διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών

Τα ποσοστά καρκίνου των ωοθηκών είναι υψηλότερα στις γυναίκες ηλικίας 55-64 ετών. Η διάμεση ηλικία στην οποία διαγιγνώσκονται οι γυναίκες είναι τα 63 έτη, πράγμα που σημαίνει ότι περίπου οι μισές γυναίκες είναι νεότερες από 63 ετών όταν διαγιγνώσκονται με καρκίνο των ωοθηκών και οι μισές μεγαλύτερες [1–4]



[SEER Cancer Statistics Factsheets: Ovary Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD](#)

Εικόνα 1.2. Ποσοστά νοσηρότητας με βάση την ηλικία- NATIONAL CANCER INSTITUTE

Η μέση ηλικία θανάτου από καρκίνο των ωοθηκών είναι τα 70 έτη (Εικόνα 1.2). Τα ποσοστά επιβίωσης του καρκίνου των ωοθηκών είναι πολύ χαμηλότερα από ό,τι άλλων τύπων καρκίνου που επηρεάζουν τις γυναίκες. Για τη σύγκριση διαφόρων μορφών καρκίνου χρησιμοποιούνται συνήθως τα ποσοστά επιβίωσης πενταετίας. Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης πέντε ετών για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι 46,5%. Τα ποσοστά επιβίωσης ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της διάγνωσης [2–4]. Οι γυναίκες που έχουν διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο - πριν εξαπλωθεί ο καρκίνος - έχουν πολύ υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης πενταετίας από εκείνες που διαγνώστηκαν σε μεταγενέστερο στάδιο. Περίπου 15% των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών διαγιγνώσκονται νωρίς με ασθένεια αρχικού σταδίου.

1.1.3.β Κληρονομικότητα

Στην πραγματικότητα, εκτιμάται ότι ο οικογενειακός καρκίνος των ωοθηκών αντιπροσωπεύει το 5-15% των συνολικών κρουσμάτων καρκίνου των ωοθηκών [11]. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών είναι 1,6% των γυναικών στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, εάν μια γυναίκα έχει έναν ή δύο συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο των ωοθηκών, ο κίνδυνος αυξάνεται σε 4% και 7% αντίστοιχα [12]. Συγκεκριμένα, η ηλικία έναρξης για ασθενείς με οικογενειακό καρκίνο των ωοθηκών είναι μικρότερη από εκείνες που δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό [13].

Τρία κύρια κληρονομικά σύνδρομα προδιαθέτουν για τον καρκίνο των ωοθηκών, συμπεριλαμβάνοντας τον κληρονομικό καρκίνο των ωοθηκών, το κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών (HBOCS), όπου και τα δύο οφείλονται σε μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*, και του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC, σύνδρομο Lynch), που οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις γονιδίων επιδιόρθωσης DNA όπως τα *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* και *PMS2* [14, 15]. Μια άλλη ομάδα μικρών οικογενειακών συνδρόμων που προδιαθέτει κάποια άτομα προς καρκίνο των ωοθηκών, αντιπροσωπεύοντας <1% των συνολικών περιπτώσεων, συμπεριλαμβάνει το σύνδρομο Gorlin, την οστεοχονδρομάτωση ή σύνδρομο Ollier και το σύνδρομο Peutz-Jeghers [14, 16–18].

Μέχρι στιγμής, τα δύο πιο καλά μελετημένα γονίδια που βρέθηκαν να συνδέονται με υψηλή διεισδυτικότητα για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι τα *BRCA1* και *BRCA2*, με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης [12, 19]. Η σημασία αυτών των δύο γονιδίων στον καρκίνο των ωοθηκών θα συζητηθεί περαιτέρω σε αυτό το κεφάλαιο.

1.2 Ιστολογικά στοιχεία – Κατηγορίες όγκων ωοθηκών

Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου των ωοθηκών (Πίνακας 1), που ενώ ονομάζονται όλοι ωοθηκικές νόσοι, είναι μοναδικοί όσον αφορά την προέλευσή τους, τη θεραπεία και την πρόγνωση. Τρεις κύριοι κυτταρικοί τύποι επιφέρουν τους όγκους των ωοθηκών: τα επιθηλιακά κύτταρα (65%), τα γεννητικά κύτταρα (15%), και τα κύτταρα του στρώματος (10%) (ενώ ενίοτε υπάρχουν και μεταστάσεις κατά 5% από άλλους πρωτοπαθείς καρκίνους). Κάθε τύπος κυττάρου μπορεί να εξελιχθεί σε διαφορετικό τύπο όγκου [20–22]. Οι επιφανειακοί επιθηλιακοί όγκοι ταξινομούνται περαιτέρω βάση κυτταρικής προέλευσης (ορός, βλεννώδεις, ενδομητριοειδείς κτλ.) και τύπου/ σταδίου (καλοήθης, οριακός -άτυπου πολλαπλασιασμού, κακοήθης, κακοήθης που μπορεί να είναι επεμβατικός ή μη επεμβατικός). Οι περισσότεροι κακοήθεις όγκοι είναι επιθηλιακοί και επιφανειακοί (90%).

Οι όγκοι των ωοθηκών διακρίνονται σε καλοήθεις (μη καρκινικοί), κακοήθεις (καρκινικοί) ή ακόμη και οριακής (ενδιάμεσης) κακοήθειας.

Επιπλέον, οι κύστες ωοθηκών είναι διαφορετικές από τους όγκους των ωοθηκών και μπορεί να είναι αρκετά συχνές. Οι ωοθηκικές κύστες είναι ρευστού περιεχομένου, ενώ οι

όγκοι των ωοθηκών είναι στερεές μάζες. Οι περισσότερες κύστες των ωοθηκών δεν είναι επιβλαβείς, δεν προκαλούν συμπτώματα και δεν είναι ενδεικτικές κινδύνου για μελλοντικό καρκίνο των ωοθηκών.

Οι καλοήθεις όγκοι των ωοθηκών

Στις ωοθήκες μπορούν να αναπτυχθούν πολλών ειδών κυστικοί και συμπαγείς όγκοι.

Οι κακοήθεις όγκοι των ωοθηκών

Είναι πολλών διαφορετικών τύπων και έχουν ιδιαίτερη, ο καθένας, εμφάνιση και συμπεριφορά. Ο συχνότερος τύπος είναι ο επιθηλιακός καρκίνος, που προέρχεται από μετατροπή (εξαλλαγή) των φυσιολογικών κυττάρων του επιθηλίου (μεμβράνης) που περιβάλλει την ωοθήκη σε καρκινικά (και σ' αυτόν θα αναφερθούμε στην παρούσα μελέτη). Ο καρκίνος αυτός εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες άνω των 50 ετών, κατά την εμμηνόπαυση.

Ο καρκίνος των γεννητικών κυττάρων προέρχεται από τα αναπαραγωγικά κύτταρα των ωοθηκών και είναι σπάνιος.

Ο καρκίνος των ωοθηκών από κύτταρα του στρώματος (Stromal), ο οποίος προκύπτει από κύτταρα συνδετικού ιστού, είναι πολύ σπάνιος.

Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα των ωοθηκών (SCCO) είναι εξαιρετικά σπάνιο και δεν είναι βέβαιο εάν τα κύτταρα προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκών, από στρωματικά ή από γεννητικά κύτταρα.

Όγκοι οριακής κακοήθειας (borderline) και συμπεριφοράς

Είναι μία τρίτη κατηγορία επιθηλιακών όγκων που εμφανίζονται σε όλες τις ηλικίες και συνήθως έχουν καλή πρόγνωση [23–25].

1. Surface epithelial - stromal tumors
a. Serous tumors:
i. Benign (cystadenoma)
ii. Borderline tumors (serous borderline tumor)
iii. Malignant (serous adenocarcinoma)

b. Mucinous tumors, endocervical-like and intestinal type:
i. Benign (cystadenoma)
ii. Borderline tumors (mucinous borderline tumor)
iii. Malignant (mucinous adenocarcinoma)
c. Endometrioid tumors:
i. Benign (cystadenoma)
ii. Borderline tumors (endometrioid borderline tumor)
iii. Malignant (endometrioid adenocarcinoma)
d. Clear cell tumors:
i. Benign
ii. Borderline tumors
iii. Malignant (clear cell adenocarcinoma)
e. Transitional cell tumors:
i. Brenner tumor
ii. Brenner tumor of borderline malignancy
iii. Malignant Brenner tumor
iv. Transitional cell carcinoma (non-Brenner type)
f. Epithelial-stromal:
i. Adenosarcoma
ii. Carcinosarcoma (formerly mixed Müllerian tumors)
2. Sex cord - stromal tumors
a. Granulosa tumors:
i. Fibromas
ii. Fibrothecomas
iii. Thecomas
b. Sertoli cell tumors:
i. Leydig cell tumors
c. Sex cord tumor with annular tubules
d. Gynandroblastoma
e. Steroid (lipid) cell tumors
3. Germ cell tumors
a. Teratoma:
i. Immature
ii. Mature
iii. Solid

iv. Cystic (dermoid cyst)
b. Monodermal (e.g., struma ovarii, carcinoid)
c. Dysgerminoma
d. Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor)
e. Mixed germ cell tumors
4. Malignant, not otherwise specified
a. Metastatic cancer from non ovarian primary:
i. Colonic, appendiceal
ii. Gastric
iii. Breast

Πίνακας 1. Ταξινόμηση όγκων των ωοθηκών κατά WHO.

1.3 Ποσοστά επιβίωσης και Θεραπεία

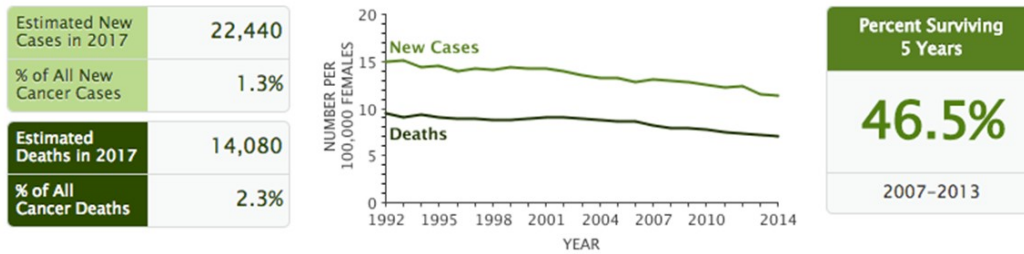
Για όλους τους τύπους καρκίνου των ωοθηκών, περίπου 3 στις 4 γυναίκες ζουν για τουλάχιστον 1 χρόνο μετά τη διάγνωση. Σχεδόν το ήμισυ (46,5%) των γυναικών με καρκίνο των ωοθηκών είναι εν ζωή τουλάχιστον 5 χρόνια μετά τη διάγνωση (Εικόνες 1.3, 1.4 και 1.5) με τους περισσότερους ασθενείς να υποτροπιάζουν και να υποκύπτουν τελικά στην ασθένεια [2, 4, 21, 26].

Η θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών αποτελείται από χειρουργική επέμβαση και μπορεί να ακολουθήσει:

1) συνδυασμένη χημειοθεραπεία με πλατίνα (platinum-based chemotherapy with the addition of bevacizumab) με ή χωρίς ακτινοθεραπεία

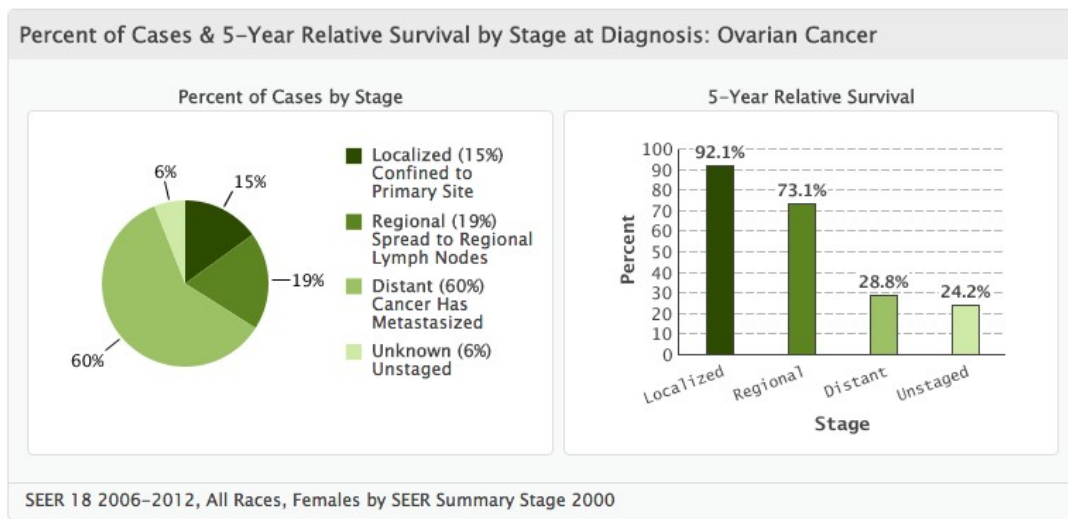
ή

2) χημειοθεραπεία συνδυασμού [2, 23, 24, 27]



[SEER Cancer Statistics Factsheets: Ovary Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD](#)

Εικόνα 1.3. Αύξηση της νοσηρότητας και ελάχιστη μείωση της θνησιμότητας. Περίπου το 50% (46,5%) των γυναικών που νοσούν έχουν πιθανότητα επιβίωσης πέραν των πέντε ετών- NATIONAL CANCER INSTITUTE



Εικόνα 1.4. Ποσοστά επιβίωσης πέραν των πέντε ετών με βάση το στάδιο της νόσου κατά την διάγνωση.

	BREAST	ENDOMETRIAL	CERVICAL	OVARIAN
5-YEAR SURVIVAL	87%	79%	67%	46%

Εικόνα 1.5. Ποσοστά επιβίωσης πέραν των πέντε ετών για τους βασικότερους γυναικολογικούς καρκίνους κατά WHO. <https://worldovariancancercoalition.org/wp-content/uploads/2018/10/THE-WORLD-OVARIAN-CANCER-COALITION-ATLAS-2018.pdf>

Παράγοντες υπεύθυνοι για το υψηλό αυτό ποσοστό θνησιμότητας είναι κυρίως η έλλειψη προφανών συμπτωμάτων που θα εξέθεταν τη νόσο σε πρώιμο στάδιο. Στην πραγματικότητα, περίπου το 70% των ασθενών διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο, μετά την μετάσταση του καρκίνου πέρα από τις ωοθήκες [19, 20]. Επιπλέον, η έλλειψη αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης συμβάλλει επίσης στην καθυστερημένη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Η μέτρηση του καρκίνικου αντιγόνου 125 του ορού (CA-125) είναι η μέθοδος πρωτογενούς εξέτασης που χρησιμοποιείται. Ωστόσο, η συγκέντρωση CA-125 δεν έχει την ευαισθησία ούτε την ειδικότητα που απαιτείται, καθώς τα επίπεδά έκφρασης του είναι τυπικά χαμηλά στα πρώιμα στάδια του καρκίνου των ωοθηκών και είναι δυνατόν επίσης να αυξηθούν και σε άλλες γυναικολογικές παθήσεις (ενδομητρίωση, αδενομύωση και σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών) [6]. Για να αυξηθεί η ακρίβεια της ανίχνευσης, χρησιμοποιείται συχνά η κοιλιακή υπερηχογραφία (TVS). Ωστόσο, η εξειδίκευση που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό αυτών των δύο μεθόδων παραμένει υποβέλτιστη [7].

Στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και των χαρακτηριστικών του καρκίνου των ωοθηκών (OC) οδήγησαν στην ταυτοποίηση άλλων παραγόντων που μπορούν να τροποποιήσουν την απόκριση της θεραπείας, επιτρέποντας έτσι την ταξινόμηση των κακοηθειών σε ευαίσθητους ή ανθεκτικούς καρκίνους στην πλατίνη [28]. Από αυτή την άποψη, τα καρκινικά αντιγόνα σχετιζόμενα με το μαστό (Breast Related Cancer Antigens) (*BRCA*) και η δυσλειτουργίες στο μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination Deficiency) (HRD) μπορεί να θεωρηθούν νέοι προγνωστικοί βιοδείκτες απόκρισης στη χημειοθεραπεία, και να χρησιμοποιηθούν στην επαναστοχοθέτηση της θεραπευτικής προσέγγισης με εν δυνάμει φάρμακα, όπως οι αναστολείς της πολυμεράσης της πολυ-ADP-ριβόζης (PARPi), για τους οποίους θα αναφερθούμε εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο [29–31].

1.4 Μοριακή Γενετική του καρκίνου των ωοθηκών

1.4.1 *BRCA1* και *BRCA2*

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι Hall *et al.* ανέδειξαν τη σύνδεση μεταξύ γενετικού τύπου στο χρωμόσωμα 17q με τον καρκίνο του μαστού που εμφανίζεται σε νεαρές

γυναίκες και σε ορισμένες οικογένειες επιρρεπείς στην εμφάνιση καρκίνου, σε ασυνήθιστα μεγάλα ποσοστά σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [32].

Λίγο αργότερα, οι Narod *et al.* έδειξαν ότι ο ίδιος γενετικός τύπος συνδέθηκε με το σύνδρομο κληρονομικού καρκίνου μαστού-ωοθηκών (HBOCS)[33]. Στη συνέχεια το γονίδιο *BRCA1* κλωνοποιήθηκε από τους Miki *et al.* το 1994 [34], ενώ ακολούθησε η αναγνώριση ενός άλλου γονιδίου συσχετιζόμενο με ευαισθησία στους καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών, ονομαζόμενο *BRCA2* από τους Wooster *et al.* [35].

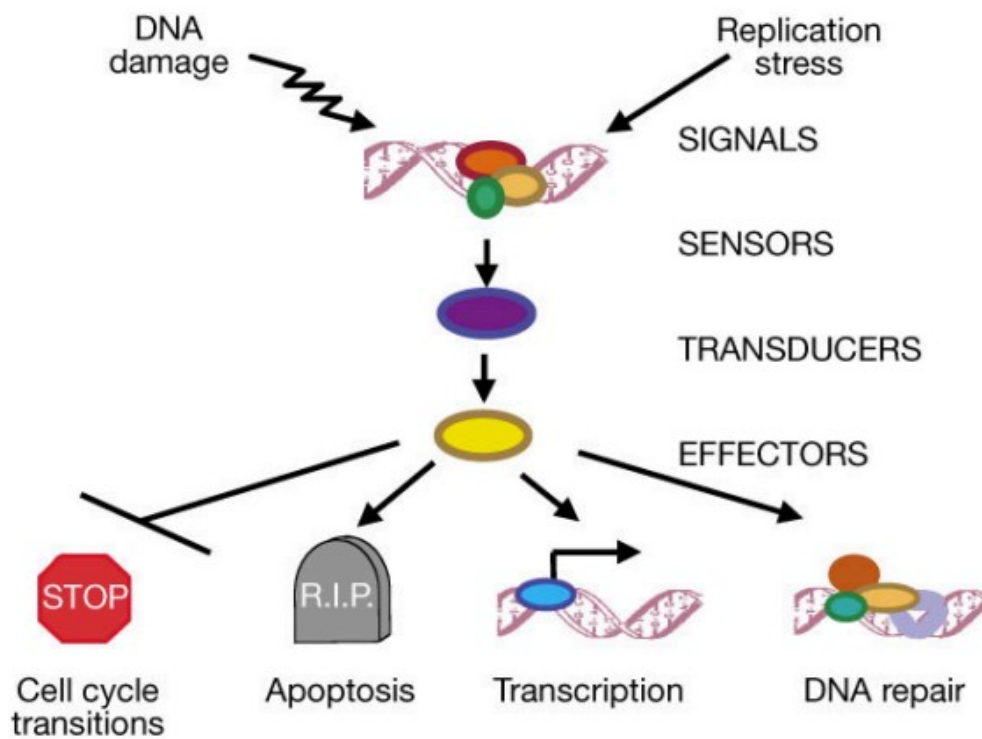
Τόσο το *BRCA1* όσο και το *BRCA2* εκφράζονται σε μια ποικιλία ιστών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των φάσεων S και G2 του κυτταρικού κύκλου [36]. Διαδραματίζουν δε, σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς απόκρισης βλάβης του DNA (Damage DNA Response, DDR) (Εικόνα 1.6) και επιδιόρθωσης του, συμμετέχοντας στον ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous recombination - HR) θραυσμάτων της διπλής έλικας DNA (double strand breaks), την επιδιόρθωση σε συνδυασμό με τη μεταγραφή κατά τη διάρκεια οξειδωτικής βλάβης και πιθανώς σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό άκρου (NHJR) [36]. Επιπλέον, εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (ως σημεία ελέγχου), της ουβικιτινίωσης των πρωτεϊνών και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [37].

Το *BRCA1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21 και περιλαμβάνει 24 εξώνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 1863 αμινοξέων [34]. Το *BRCA1* περιέχει ένα εξαιρετικά διατηρημένο N-τελικό RING τομέα και μια αλληλουχία δύο πεδίων BRCT (*BRCA1* C Terminus) στο καρβοξυλικό του άκρο, τα οποία είναι σημαντικά για την πρωτεϊνική ουβικιτιλίωση και τη πρόσδεση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης [38, 39]. Οι συγκεκριμένοι πρωτεϊνικοί τομείς έχουν αυξημένη βαρύτητα, αφού συχνά αποτελούν στόχο κλινικά σημαντικών μεταλλάξεων [38].

Το *BRCA2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12-13 και αποτελείται από 27 εξώνια κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη των 3418 αμινοξέων [19]. Το *BRCA2* περιέχει οκτώ επαναλήψεις BRC που εμπλέκονται στην πρόσδεση της ανασυνδυάσης (recombinase) RAD51, για την επιδιόρθωση βλαβών δίκλωνου DNA [40].

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα δύο κύρια γονίδια ευαισθησίας στον καρκίνο του μαστού, *BRCA1* και *BRCA2*, λειτουργούν σε μια κοινή οδό προστασίας του

γονιδιώματος. Ωστόσο, οι δύο πρωτεΐνες λειτουργούν σε διαφορετικά στάδια στην απόκριση βλάβης του DNA (DDR) και στην επιδιόρθωσή του. Η *BRCA1* είναι μια πλειοτροπική πρωτεΐνη DDR που λειτουργεί τόσο στην ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου όσο και στην επιδιόρθωση του DNA, ενώ η *BRCA2* είναι ένας μεσολαβητής που δρα στον πυρήνα του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι δεσμοί μεταξύ των δύο πρωτεϊνών δεν είναι καλά κατανοητοί, αλλά πρέπει να υπάρχουν για να εξηγήσουν την ευαισθησία του καρκίνου στον άνθρωπο, που προκύπτει από μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* στα βλαστικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες δουλεύουν συνεργατικά για να προστατεύσουν το γονιδίωμα από βλάβες στη διπλή έλικα του DNA κατά την αναπαραγωγή του (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Πιθανά αποτελέσματα απόκρισης βλάβης DNA. Βλάβες στο DNA ή το «αναπαραγωγικό» στρες προκαλούν καταρράκτη σήματος με πολλαπλά δυνητικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένων της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, των μεταγραφικών μεταβολών και της επιδιόρθωσης του DNA [41]

1.4.1.α *BRCA1* και *BRCA2* στον καρκίνο των ωοθηκών

Περίπου το 90% όλων των περιπτώσεων κληρονομικού καρκίνου των ωοθηκών οφείλεται σε μεταλλάξεις εντός των γονιδίων *BRCA1* ή *BRCA2* [21]. Πράγματι, για όσους έχουν κληρονομήσει μεταλλάξεις εντός του *BRCA1* ή του *BRCA2* γονιδίου, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της ζωής τους είναι 20-40% και 15-25%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον κίνδυνο 1,6% στο γενικό πληθυσμό [12, 42].

Ενώ κι ένα μόνο ελαττωματικό αντίγραφο *BRCA1* ή *BRCA2* στα αρχέγονα κύτταρα είναι αρκετό για την αύξηση της προδιάθεσης του καρκίνου σε ένα άτομο, παρατηρείται συχνά ότι το δεύτερο αλληλόμορφο επίσης χάνεται σε καρκινικά κύτταρα που απομονώνονται από ασθενείς με προδιάθεση [43]. Αυτό το ονομαζόμενο ως "δεύτερο χτύπημα", συμβαίνει συχνά μέσω του μηχανισμού «απώλειας ετεροζυγοτείας» (loss of Heterozygosity) (LOH). Στην πραγματικότητα, τα *BRCA1* και *BRCA2* έχουν συχνότητες LOH 80% και 70%, αντίστοιχα, σε φορείς της μετάλλαξης τόσο σε όγκους του μαστού όσο και των ωοθηκών [44, 45]. Ενώ η υπερμεθυλίωση του υποκινητή *BRCA* εμφανίζεται σποραδικά στον καρκίνο των ωοθηκών και του μαστού, αποτελεί σπάνιο γεγονός σε φορείς της μετάλλαξης [46, 47]. Εκτός από την LOH και την μεθυλίωση του υποκινητή, κι άλλοι παράγοντες επιγενετικοί ή μεταγραφικής σίγασης/ αποσιώπησης (silencing) των *BRCA1* και *BRCA2* όπως η καταστολή της χρωματίνης, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση των *BRCA* σε γονιδιακό επίπεδο.

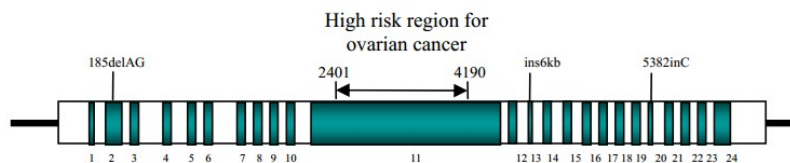
1.4.1.β Μεταλλάξεις των *BRCA1* και *BRCA2* στον καρκίνο των ωοθηκών

Ο τύπος των μεταλλάξεων εντός των *BRCA1* και *BRCA2* ποικίλλει, με την πλειονότητα να είναι μικρές παρεμβολές (insertions) ή διαγραφές (base deletions) που έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, όπως και μεταλλάξεις κωδικονίου λήξης (STOP-CODON) ή αλλοιώσεις της θέσης συρραφής των μεταγράφων, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν περικοπή/ καταστολή (τρισδιάστατης δομής και της λειτουργικότητας) της πρωτεΐνης [19]. Έχουν αναφερθεί επίσης μεταλλάξεις αλλαγής κωδικονίου, μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν μη συνώνυμες αλλαγές κωδικοποίησης ή και διαγραφές εντός πλαισίου ανάγνωσης με αποτέλεσμα δυσλειτουργικές πρωτεΐνες [19]. Τα τελευταία χρόνια, με την εισαγωγή τεχνικών υψηλής απόδοσης DNA, έχει επίσης

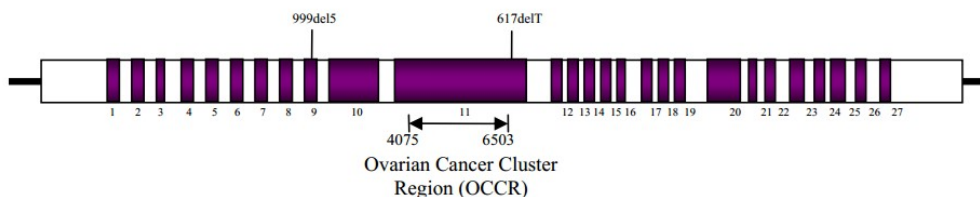
ανακαλυφθεί ότι μπορεί να εμφανιστούν μεγάλες γενομικές διαγραφές και αναδιατάξεις. Ωστόσο, μεγάλες γονιδιακές αλλοιώσεις είναι πολύ λιγότερο συχνές στο *BRCA2* συγκριτικά με το *BRCA1* [48–51].

Έχει αναφερθεί ότι έως και το 75% των οικογενών κληρονομικών τύπων καρκίνου των ωοθηκών έχει ένα μεταλλαγμένο *BRCA1* [52], ενώ οι μεταλλάξεις *BRCA2* βρίσκονται εντός του 35% των κληρονομικών καρκίνων του μαστού, και επιφέρουν μικρότερο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών, αντιπροσωπεύοντας το 10-20% [42]. Παρά την υψηλή συχνότητα των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRCA* στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, δεν υπάρχουν συγκεκριμένα σημεία μετάλλαξης (hotspots), αλλά οι μεταλλάξεις κατανέμονται σε ολόκληρο το γονίδιο [12]. Υπάρχει ωστόσο συσχετισμός μεταξύ θέσεων μετάλλαξης και του κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών. Στο *BRCA1*, μεταλλάξεις εντός των νουκλεοτιδίων 2401 και 4190 (που ονομάζεται "περιοχή υψηλού κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών") αποδεικνύεται ότι οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, μειώνοντας ταυτόχρονα τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού [19] (Εικόνα 1.7). Παρομοίως, μεταλλάξεις μεταξύ των νουκλεοτιδίων 4075 και 6503 του *BRCA2*, που ονομάζεται "Περιοχή συμπλέγματος καρκίνου των ωοθηκών (OCCR)", συμβάλλει επίσης στην αύξηση των πιθανοτήτων για καρκίνο των ωοθηκών [53–55] (Εικόνα 1.7).

BRCA1

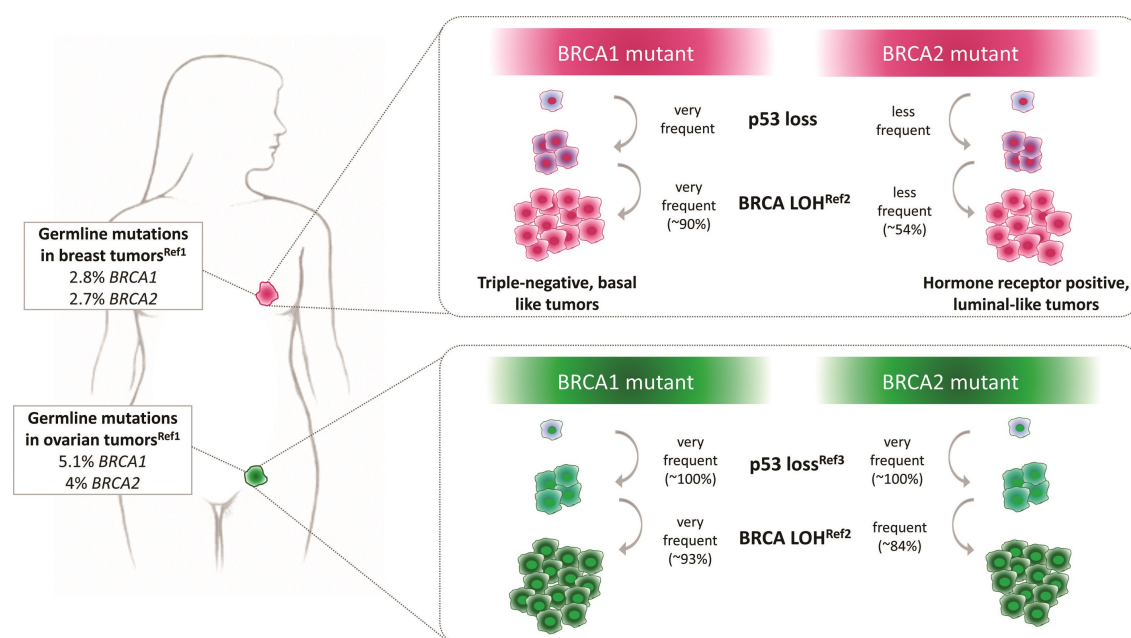


BRCA2

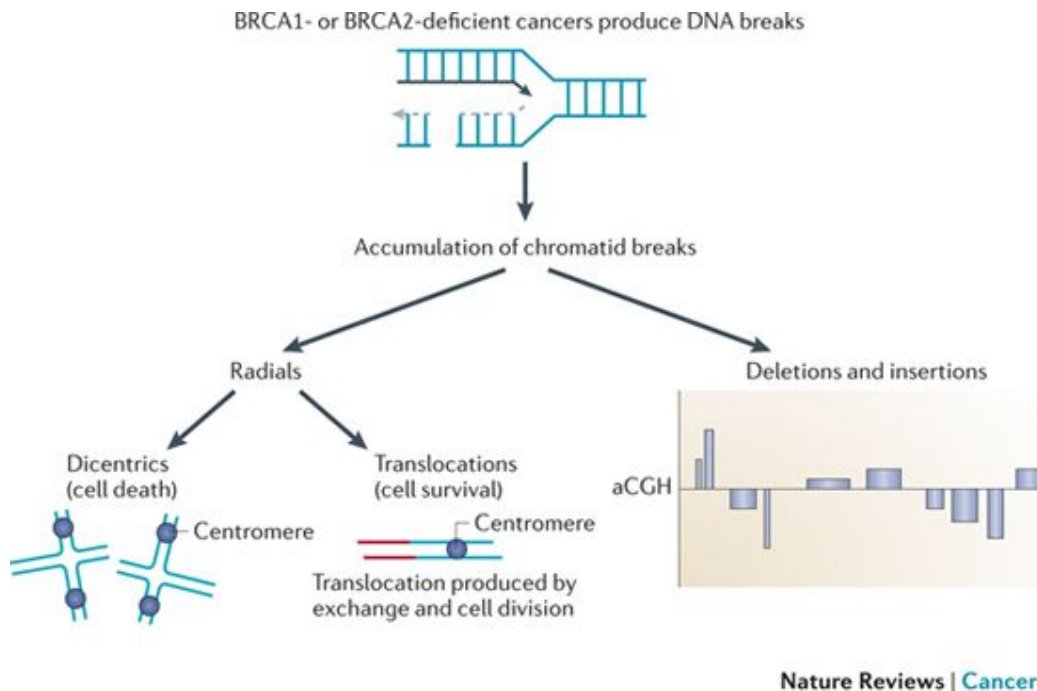


Εικόνα 1.7. Δομή των *BRCA1* και *BRCA2* γονιδίων. Τα έγχρωμα τμήματα αντιπροσωπεύουν εξώνια με τον αντίστοιχο αριθμό εξωνίου κάτω από κάθε τμήμα. Επισημάνονται οι κοινές μεταλλάξεις καθώς και περιοχές που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών [12]

Ένας κατάλογος μεταλλάξεων των *BRCA1* και *BRCA2* για τον καρκίνο του μαστού μπορεί να βρεθεί στη βάση δεδομένων (BIC) (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), μια διεθνή συνεργασία που φιλοξένησε το Εθνικό Ινστιτούτο Ερευνών Ανθρώπινου Γονιδιώματος του NIH (Εθνικό Ίδρυμα Υγείας των ΗΠΑ). Από το 2009, βρέθηκαν και καταγράφηκαν περίπου 12.000 φορές με μετάλλαξη στο *BRCA1* και περίπου 11.000 φορές στο *BRCA2* [19] (Εικόνα 1.8). Μεταλλάξεις στα *BRCA1* και *BRCA2* έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα ομόλογου ανασυνδυασμού (HR), πιθανώς επιτρέποντας σε τυχόν «σπασίματα» (θραύσματα) της διπλής έλικας του DNA (Double strand Break, DSB) που εμφανίζονται να παραμένουν ή το DNA να επιδιορθώνεται με περισσότερα σφάλματα (Ανάλύεται παρακάτω, απόκριση βλάβης του DNA) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.8. Συχνές επιπρόσθετες μεταλλάξεις, εμφανιζόμενες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών με μεταλλάξεις των *BRCA1* και *BRCA2* [56].



Εικόνα 1.9. Καρκινικά κύτταρα με έλλειψη των *BRCA1* ή *BRCA2* συσσωρεύουν περισσότερα θραύσματα διπλής έλικας του DNA και ανταλλαγές χρωματιδικών τμημάτων, που επιδιορθώνονται εμφανίζοντας γενωμικές μετατοπίσεις, αφαίρεση ή προσθήκη βάσεων [57].

1.4.2 Σποραδικές μεταλλάξεις

Η πλειοψηφία των ασθενών που διαγνώστηκαν με καρκίνο των ωοθηκών θεωρείται ότι έχουν μια «σποραδική» μορφή της κακοήθειας [58, 59], χωρίς να υπάρχει δηλαδή γνωστή οικογενής συσχέτιση από το ιστορικό τους.

Η γενετική του καρκίνου αυτής της ομάδας ασθενών είναι πολύ διαφορετική και περιλαμβάνει πολλαπλές κυτταρικές οδούς σήμανσης [60]. Οι Kurman και Shih [24, 61] έθεσαν ένα δυαδικό πρότυπο για την παθογένεση του καρκίνου των ωοθηκών, με βάση την ιστολογία, τους τύπους πρόδρομων κυττάρων, τις γενετικές μεταλλάξεις, τη συμπεριφορά των όγκων και την πρόγνωση των ασθενών [62]. Έτσι, διαχωρίζουν τον σποραδικό καρκίνο των ωοθηκών σε δύο κύριες ομάδες: όγκους τύπου 1 και 2 (Πίνακας 2). Οι όγκοι τύπου 1 είναι όγκοι χαμηλού βαθμού/ χαμηλού σταδίου που αναπτύσσονται από σαφώς καθορισμένους πρόδρομους παράγοντες, όπως η ενδομητρίωση και οι οριακοί όγκοι, καθώς και από το επιφανειακό επιθήλιο των ωοθηκών [62]. Οι όγκοι αυτοί είναι γενετικά σταθεροί και αναπτύσσονται βαθμιαία, όπως τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου.

Περιλαμβάνουν τους ιστολογικούς τύπους: ορός, κύτταρα ενδομητριοειδούς, διαυγή κύτταρα και κύτταρα βλεννογόνου, και γενικά παράγουν χαμηλή θνησιμότητα [61]

Οι σωματικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τους όγκους τύπου 1 περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *CTNNB1* και *PTEN*. Οι μεταλλάξεις *KRAS*, *BRAF* και *ERBB2* επηρεάζουν την οδό κινασών που ενεργοποιείται από μια πρωτεϊνική κινάση MAPK και διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση και ογκογένεση [36]. Μεταλλάξεις των *PIK3CA* και *PTEN* επηρεάζουν την οδό της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3-κινάσης/ Akt (PI3K / mTOR / Akt) που έχει ενεργό ρόλο στη σύνθεση των πρωτεϊνών, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [58]. Μεταλλάξεις και απορρύθμιση της οδού σηματοδότησης PI3K συμβαίνουν τόσο στον όγκους τύπου 1 όσο και στους όγκους τύπου 2 (βλ. παρακάτω). Το *ARID1A* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BAF250 που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στη ρύθμιση του μηχανισμού απόκρισης στις βλάβες του DNA, στη κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό [58, 63]. Οι μεταλλάξεις στην β-κατενίνη που κωδικοποιούνται από το *CTNNB1* γονίδιο, μέσω της οδού WNT επηρεάζουν την κυτοκίνηση, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη, καθώς και τη διακυτταρική σηματοδότηση και την κυτταρική προσκόλληση (Πίνακας 2) [63].

Type 1 tumours		Type 2 tumours	
Histology	Associated genetic mutations	Histology	Associated genetic mutations
Low-grade serous	<i>KRAS</i>	High-grade serous	<i>TP53</i>
Low-grade endometrioid	<i>BRAF</i>	High-grade endometrioid	Inactivation of <i>BRCA1/2</i>
Clear cell	<i>ERBB2</i>	Choriocarcinomas	
Mucinous	<i>PIK3CA</i>	Undifferentiated	
	<i>ARID1A</i>		
	<i>CTNNB1</i>		
	<i>PTEN</i>		

Summary of the histology and associated genetic mutations of type 1 and type 2 tumours.

Πίνακας 2. Δυαδικό πρότυπο παθογένεσης του καρκίνου των ωοθηκών κατά Kurman και Shih συνδέοντας ιστολογικά χαρακτηριστικά και γενετικές μεταλλάξεις [61, 64].

Οι όγκοι τύπου 2 αντιθέτως, είναι συνήθως επιθετικοί καρκίνοι με κακή πρόγνωση. Περιλαμβάνονται αδιαφοροποίητες κακοήθειες και όγκοι υψηλού σταδίου (ορού, ενδομητριοειδούς) και υφίστανται οικογενώς, αλλά και σποραδικά. Η μετάλλαξη στο *TP53* είναι η συχνότερη και έπεται η απενεργοποίηση των *BRCA1/ BRCA2* [60, 61]. Οι μεταλλάξεις του *TP53* βρίσκονται σε περισσότερα από το 95% των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του ορού [64, 65]. Το *TP53* κωδικοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής p53-α, που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση [63]. Τα *BRCA1/ BRCA2* γονίδια απενεργοποιούνται στο 40-50% των σποραδικών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού. Δεν έχει βρεθεί καμία άλλη μετάλλαξη σε αυτόν τον τύπο σποραδικού καρκίνου. Η προαναφερόμενη απενεργοποίηση είναι σύνηθες αποτέλεσμα υπερμεθυλίωσης και κάποιες φορές απότοκη σωματικών μεταλλάξεων στα ίδια τα γονίδια. Εν γένει, υπολογίζεται ότι οι όγκοι τύπου 2 αντιπροσωπεύουν το 90% των θανάτων από καρκίνο των ωοθηκών, καθώς οι μεταλλάξεις στα *TP53* και *BRCA1/ 2* γονίδια δημιουργούν όγκους που είναι χρωμοσωμικά ετερογενείς, ως και χαοτικοί, μιας τα γονίδια αυτά διαδραματίζουν σημαντικότερους ρόλους ως προς τη γενετική σταθερότητα [24, 61]

1.4.3 Άλλες μεταλλάξεις

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο καρκίνος των ωοθηκών είναι μια ετερογενής ασθένεια με διάφορους τύπους γενετικών αλλαγών. Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα γονίδια των γενετικών παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με τον καρκίνο των ωοθηκών είναι προφανώς τα *BRCA1* και *BRCA2* και οι παραπάνω αναφερθείσες γενετικές λειτουργίες. Πρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθολογία του καρκίνου των ωοθηκών.

1.4.3.α ΚΥΚΛΙΝΕΣ, p16

Ο σωστός έλεγχος του κυτταρικού κύκλου αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς συνδέεται με την κυτταρική απόκριση σε βλάβες του DNA και με τον κυτταρικό θάνατο, μηχανισμοί που θα αναφερθούν εκτενέστερα παρακάτω. Η σωστή έκφραση διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών είναι καίριας σημασίας, και εδώ συμπεριλαμβάνεται και η ομάδα των κυκλινών και των εξαρτώμενων από αυτές κινασών (cyclin dependant kinases, CDK). Οι κυκλίνες λειτουργούν κατά την ενεργοποίηση

των CDKs, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες-κλειδιά για να επιτρέψουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο *CCND1*, που κωδικοποιεί την κυκλίνη D1, εκφράζεται συχνά [66] σε ανθρώπινους καρκίνους. Η κυκλίνη D1 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τις CDK4/6, που δύναται έπειτα να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη του αμφιβληστροειδούς (retinoblastoma, RB), οδηγώντας στην απελευθέρωση του E2F, και προωθώντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο προς τη G1 φάση [67]. Στον καρκίνο των ωοθηκών σπάνια ανευρίσκεται αύξηση έκφρασης του *CCND1*, παρόλαυτα, διαπιστώνεται ότι υπερεκφράση του σε μια υποομάδα όγκων των ωοθηκών, σχετίζεται με μείωση της επιβίωσης των ασθενών [68, 69]. Επίσης σπάνια είναι και η υπερέκφραση του *CDK4* (περίπου 15% των καρκίνων των ωοθηκών) αλλά εμφανίζει συσχέτιση με αυξημένη έκφραση του *CCND1* [70].

Το *p16* δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αναστέλοντας τη δραστηριότητα της κινάσης του συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του mRNA του *p16* παρατηρείται στον καρκίνο των ωοθηκών, όμως έχει δειχθεί ότι αυτό μπορεί να οφείλεται σε υπερμεθυλίωση στο 5'-CpG, αφού μετάλλαξη ή διαγραφή αυτού του γονιδίου είναι ασυνήθιστες [71]. Είναι χρήσιμο να σημειωθεί ότι η μείωση της έκφρασης του *p16* εμφανίζεται συχνότερα σε όγκους των ωοθηκών χωρίς μεταλλάξεις στο *p53*, επομένως είναι πιθανό να μην είναι τόσο σημαντική η απενεργοποίηση του *p53* για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών με ένα άλλο ρυθμιστικό γονίδιο του κυτταρικού κύκλου ήδη αδρανοποιημένο [70].

1.4.3.β Υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs)

Οι υποδοχείς της οικογένειας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs) με παρουσία προσδέτη, μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή προκαλώντας την έναρξη μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης που οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη όγκων [72]. Ο EGFR/ ERBB1 είναι μέλος της οικογένειας HER, της οικογένειας του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης τύπου 1 (δηλ. ERBB) και εκφράζεται φυσιολογικά στο επιθήλιο των ωοθηκών. Στον καρκίνο των ωοθηκών, αν και το γονίδιο αυτό σπάνια εμφανίζει μεταλλάξεις (35-70% όλων των περιπτώσεων), υπερεκφράζεται και μάλιστα σχετίζεται με κακή πρόγνωση, λόγω παραγόμενης ανθεκτικότητας στα φάρμακα [73]. Ένα διαφορετικό μέλος της οικογένειας HER, το *HER2* (c-ERBB2), υπερέκφράζεται στο

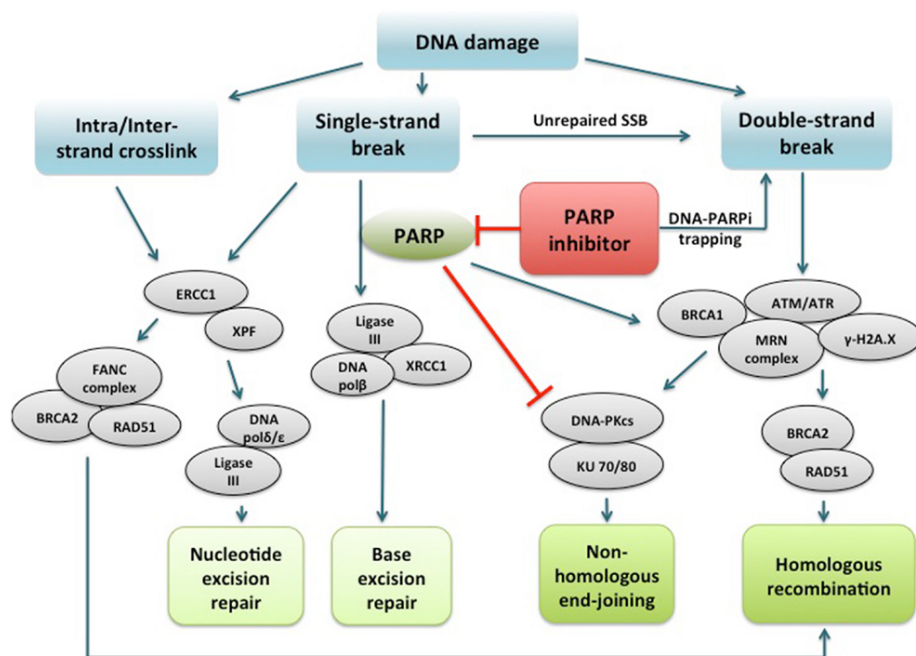
20-30% των καρκίνων των ωοθηκών και σχετίζεται επίσης με κακή πρόγνωση [74]. Η υπερ-έκφραση του *HER2* μπορεί να προκαλέσει το διμερισμό του, ακόμη και χωρίς την παρουσία ενός προδότη, που οδηγεί σε αυτο-ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης [75, 76]. Διαπιστώθηκε επίσης ότι το *HER2* υπερεκφράζεται περίπου στο 40% των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών που έχουν κάποιο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών, αποδεικνύοντας την κρισιμότητά του [15].

1.4.3.γ Υποδοχείς οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα εμπλέκονται σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Μπορούν εν τούτοις να συμμετάσχουν και στην ανάπτυξη ορμονο-εξαρτώμενων καρκίνων, όπως ο καρκίνος των ωοθηκών [77]. Ο οιστρογονικός υποδοχέας άλφα (ER-α) αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων που μεταδίδουν σήματα ορμονών. Λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιούμενος από προσδότη και επηρεάζει τα φυσιολογικά ή τα καρκινικά κύτταρα κατά την διέγερση με οιστρογόνα [78]. Στον καρκίνο των ωοθηκών, εξαιρετικά σπάνια παρουσιάζεται ενίσχυση του γονιδίου *ESR1* (μόνο το 2,1% των περιπτώσεων), όμως αναλόγως τη μελέτη, έχει βρεθεί και υπερεκφρασμένο στο 25-86% των περιπτώσεων του καρκίνου των ωοθηκών [79]. Ο υποδοχέας οιστρογόνου βήτα (ER-β), από την άλλη πλευρά, υποεκφράζεται σε ένα συγκεκριμένο υποσύνολο τύπων καρκίνου των ωοθηκών [80]. Αυτή η αντίθετη έκφραση των ER-α και ER-β που παρατηρείται σε καρκίνους των ωοθηκών μπορεί να συσχετιστεί με τους ρόλους τους στη ρύθμιση της κυκλίνης D1, δεδομένου ότι το ER-α διεγείρει την γονιδιακή έκφραση της κυκλίνης D1, ενώ η ER-β καταστέλλει την έκφρασή της [81].

2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA Damage Response, DDR)

Οι γενετικές πληροφορίες που εκδηλώνονται ως DNA σε κάθε κύτταρο είναι καθοριστικής σημασίας για την κυτταρική λειτουργία και την αναπαραγωγή. Ως εκ τούτου, το κύτταρο αποκρίνεται με πολλαπλούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (Εικόνα 2.1). Η ακεραιότητα του DNA ευαισθητοποιείται από συχνές επίθεσεις πληθώρας παραγόντων, είτε του κυτταρικού μεταβολισμού, είτε περιβαλλοντικών. Οι δυσπλασίες στο DNA επάγονται από ακατάλληλη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων DNA (dNTPs) κατά την αντιγραφή, την απαμίνωση και την αλκυλίωση του DNA, καθώς και από την έκθεση σε ενεργές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Η περιβαλλοντική βλάβη είναι επικρατέστερη καθώς το κύτταρο υπόκειται σε επιδράσεις εξωτερικών παραγόντων όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) και το υπεριώδες φως [82].



Εικόνα 2.1. Μηχανισμοί απόκρισης βλάβης του DNA [83].

Τα θραύσματα σε έναν κλώνο (μόνοκλωνες ρήξεις/ θραύσεις) του DNA (Single strand break, SSB) ή στους δύο κλώνους (δικλωνικές ρήξεις/ θραύσεις - Double Strand Break, DSBs) συναντώνται τακτικά στα κύτταρα. Πολυάριθμες κυτταρικές οδοί είναι αφιερωμένες στην επιδιόρθωση τέτοιων βλαβών DNA (Εικόνα 2.1). Αυτά τα συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών DNA διαφέρουν στον τρόπο που αναγνωρίζεται η βλάβη, η οποία εξαρτάται από τη

σοβαρότητα της καταστροφής του DNA [84]. Οι οδοί επιδιόρθωσης που ασχολούνται με τα SSB περιλαμβάνουν την αποκατάσταση αναντιστοιχίας ή επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (MMR), η οποία διορθώνει λάθη νουκλεοτιδικά - μη σωστά ενσωματωμένα ζεύγη βάσεων, και την επιδιόρθωση εκτομής βάσης (BER), η οποία στοχεύει χημικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια (κατεστραμμένες βάσεις) [85]. Η επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτίδων (NER), η οποία αναγνωρίζει και αφαιρεί περιοχές που παρουσιάζουν εκτεταμένες ζημιές, ενεργεί για ενδιάμεσα προϊόντων των DSB. Οι βλάβες με τη μορφή των DSB επιδιορθώνονται μέσω του μηχανισμού σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (NHEJ) και του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) [85]. Οι πολυπλοκότητες της επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA περαιτέρω αυξάνονται από το φάσμα των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κάθε οδό. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 130 ένζυμα επιδιόρθωσης DNA που εξασφαλίζουν την γονιδωματική ακεραιότητα [84, 86, 87]. Μόλις επιδιορθωθεί η βλάβη και αποκατασταθεί η χρωματίνη, τα κύτταρα μπορούν να προχωρήσουν τον κυτταρικό κύκλο. Η αυστηρή ρύθμιση των οδών επιδιόρθωσης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της κυτταρικής λειτουργικότητας. Προκειμένου να προληφθεί ο πολλαπλασιασμός των βλαβών του DNA, διατηρείται μια στενή σχέση μεταξύ της επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA και της κυτταρικής ενεργειακής εξασθένισης [82, 87, 88]. Αυτή η σχέση εξασφαλίζει την απομάκρυνση τυχόν κυττάρων που εμφανίζουν εκτεταμένη βλάβη DNA ή ελαττωματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών PIKK (ATM, ATR και DNA-PK) και της οικογένειας PARP είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των θέσεων βλάβης στο DNA και της σηματοδότησης είτε των οδών αποκατάστασης είτε της κυτταρικής απόπτωσης μέσω διαμεσολαβητών όπως η πρωτεΐνη p53 [82, 87–90].

2.1 Θραύσματα διπλής έλικας (δίκλωνικές ρήξεις) του DNA (Double strand Break, DSB)

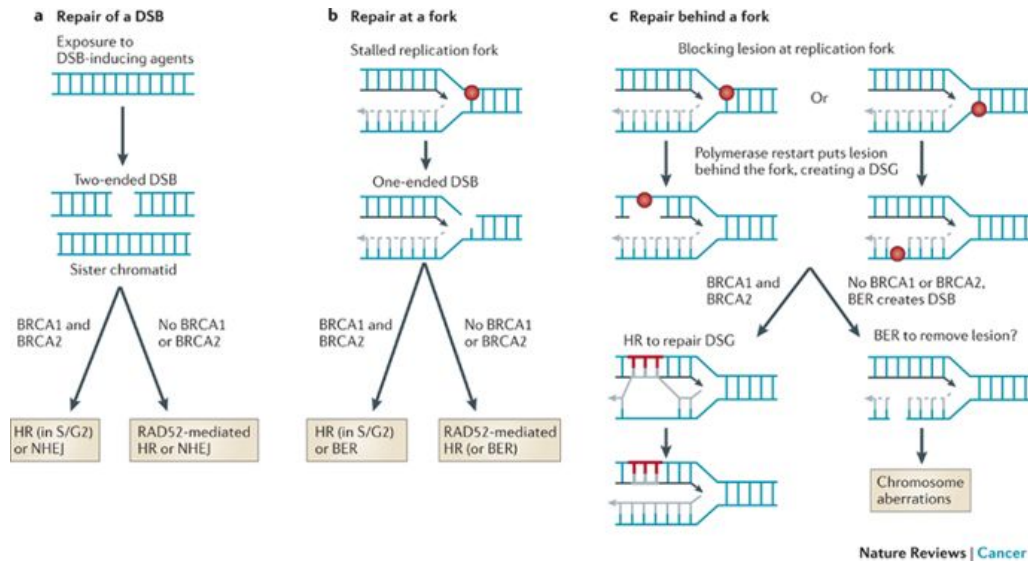
Τα DSB είναι μια μορφή βλάβης του DNA που προκαλεί σοβαρή γενομική αστάθεια. Τα μη διορθώσιμα θραύσματα μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο [91]. Τα DSB είναι ιδιαίτερα επιβλαβή επειδή αυξάνουν την πιθανότητα γενετικών αναδιατάξεων μεγάλης κλίμακας όπως τις χρωμόσωμικές μετατοπίσεις, τις διαγραφές ή τις παρεμβολές. Όταν η επιδιόρθωση του DNA δεν γίνει σωστά, τα σπασίματα (θραύσματα) μπορεί να οδηγήσουν

σε μια μετάλλαξη που αδρανοποιεί ένα όγκοκατασταλτικό γονίδιο ή ενεργοποιεί ένα ογκογονίδιο που ενδεχομένως να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Απαιτείται λοιπόν ακριβής και γρήγορη επιδιόρθωση. Οι κύριες διαδικασίες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση των DSB είναι ο **ομόλογος ανασυνδυασμός (HR)** και η **σύνδεση μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ)** όπου είναι πιο επιρρεπής σε λάθη [92]. Εντούτοις, πριν από την έναρξη οποιωνδήποτε οδών επιδιόρθωσης, το κύτταρο πρέπει να αναγνωρίσει την παρουσία ενός DSB εντός του DNA.

Τα DSB προκαλούνται από μια ποικιλία πηγών, συμπεριλαμβανομένης της ιονίζουσας ακτινοβολίας, ορισμένων γονιδιοτοξικών χημικών ουσιών, ενδογενώς παραγόμενων ROS και ως αποτέλεσμα της αντιγραφής μονοκλωνικών θραυσμάτων DNA [84, 90]. Ο ανασυνδυασμός V(D)J επίσης δημιουργεί DSBs κατά τη διάρκεια της αναδιάταξης γονιδίων που κωδικοποιούν ανοσοσφαιρίνες B κυττάρων και υποδοχείς T κυττάρων. Τα DSB διαφέρουν από τους περισσότερους τύπους αλλοιώσεων του DNA κατά το ότι επηρεάζουν αμφότερους τους δύο κλώνους του DNA και κατά συνέπεια εμποδίζουν τη χρήση του συμπληρωματικού κλώνου ως πρότυπο για την επιδιόρθωση, όπως γίνεται για παράδειγμα στο NER. Τα DSBs επιδιορθώνονται με 2 κύριους μηχανισμούς: HR και (NHEJ). Η επιλογή ποιας οδού θα αξιοποιηθεί φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου κατά τη στιγμή της δημιουργίας της βλάβης [93, 94]. Η οδός NHEJ απλά επιδιορθώνει τα DSB επανασυνδέοντας τα δύο άκρα τους, αλλά μπορούν να προστεθούν ή να χαθούν βάσεις, θέτοντάς την ως μια ανακριβή διαδικασία. Τα κύτταρα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιούν NHEJ εξαιτίας της έλλειψης αδελφής χρωματίδας.

Εντούτοις, ο HR πιστεύεται ότι είναι απαλλαγμένος από σφάλματα και ως εκ τούτου είναι η "προτιμώμενη" μέθοδος από τα κύτταρα στα τέλη της φάσης S έως την G2, όταν είναι διαθέσιμη μια αδελφή χρωματίδα. Το HR ενεργεί με την έναρξη μίας σειράς σύνθετων «ανταλλαγών» DNA μεταξύ των όμοιων αδελφών χρωματίδων ώστε να ευθυγραμμιστούν σωστά τα διακεκομμένα άκρα, με την εισαγωγή πληροφοριών που λείπουν. Περιλαμβάνεται εισβολή των αλυσίδων σε ομόλογες αλληλουχίες της αδελφής χρωματίδας με τη μεσολάβηση του *BRCA2* γονιδίου και ο σχηματισμός δομών D βρόγχου (Displacement loop, D loop), χρησιμοποιώντας έτσι τον ακέραιο κλώνο ως πρότυπο για την επιδιόρθωση της ακολουθίας του κατεστραμμένου χρωμοσωμικού κλώνου.

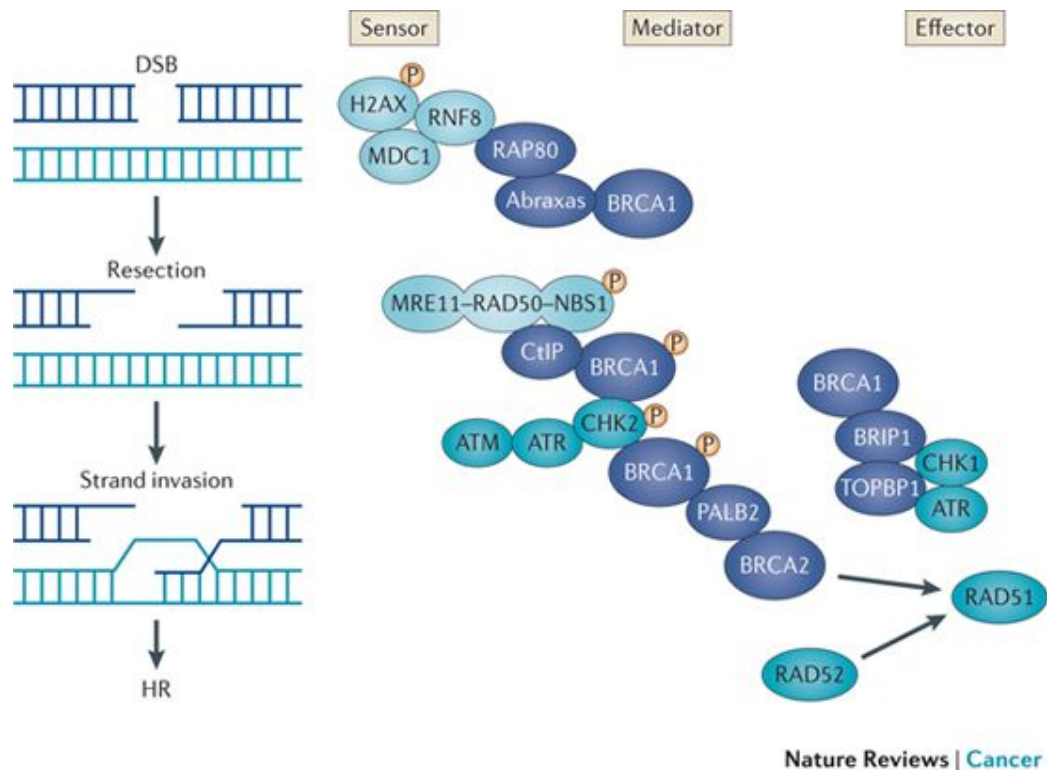
Εάν το πρότυπο DNA που χρησιμοποιείται για την επιδιόρθωση δεν είναι ταυτόσημο με την αρχική αλληλουχία DNA που υπάρχει στο DSB, το HR μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις ή πιο σοβαρές αναδιατάξεις γονιδιώματος [95] (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Όμοιος ανασυνδυασμός σε διαφορετικούς τύπους βλάβης του DNA [96].

Οι εξωγενείς παράγοντες δημιουργούν «θραύσεις/ ρήξεις» διπλής έλικας DNA (DSBs) με δύο άκρα (α), ενώ κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, οι βλάβες μπορούν να παράγουν είτε DSBs (b) με ένα άκρο είτε κενά θυγατρικών κλώνων (DSGs)(daughter-strand gaps) (c) αμφότερα τα οποία επιδιορθώνονται κατά προτίμηση στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου με την οδό ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) και με τη μεσολάβηση BRCA1-BRCA2. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής, οι αλυσίδες των προτύπων κλώνων DNA μπορούν να επιδιορθωθούν είτε πίσω από τη διχάλα αντιγραφής, είτε στη διχάλα. Τα κενά που σχετίζονται με αλλοιώσεις στον γονικό κλώνο πίσω από τη διχάλα δεν μπορούν να απομακρυνθούν με επιδιόρθωση εκτομής βάσης (BER), επειδή απαιτείται επιδιόρθωση από μη κατεστραμμένο πρότυπο. Ως εκ τούτου, το HR είναι το μόνο διαθέσιμο μονοπάτι για την επιδιόρθωση των DSG. Τα κύτταρα που στερούνται λειτουργικού BRCA1 ή BRCA2 γονιδίου, εμφανίζουν αφθονία θραυσμάτων χρωματίδων, πράγμα που υποδηλώνει εναλλακτική επιδιόρθωση DSGs απουσία λειτουργικής οδού HR με τη μεσολάβηση του BRCA. Τα DSBs που παραμένουν πίσω από τη διχάλα αντιγραφής μπορούν επίσης να προκαλέσουν γονιδιακές ελλείψεις ή παρεκκλίνουσες διασταυρώσεις ή ανταλλαγές. Επομένως, τα BRCA1 - BRCA2 έχουν κρίσιμους ρόλους στην αποκατάσταση των σχετιζόμενων με την αντιγραφή NHEJ αλλοιώσεων, μη ομόλογων ελεύθερων άκρων.

Η κύρια μέθοδος ανίχνευσης DSB είναι μέσω του συμπλόκου MRN, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες MRE11, RAD50 και NBS1 (MRN) (Εικόνα 2.3). Το σύμπλεγμα MRN είναι υπεύθυνο για την αρχική αναγνώριση της παρουσίας ενός DSB στο DNA και στη συνέχεια συνδέεται με το σύμπλεγμα του *BRCA1*, μεσολαβώντας για την πρόσληψη της ATM κινάσης που φωσφορυλιώνει αρκετές βασικές πρωτεΐνες απόκρισης βλάβης του DNA, που πυροδοτούν τα σημεία ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο [97]. Τα 5' άκρα του DSB εκτομώνται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό 3' μονόκλωνων άκρων που επικαλύπτονται με την πρωτεΐνη αντιγραφής A (RPA). Η RPA αναγνωρίζεται από το *BRCA2*, το οποίο ξεκινά τον HR, καθώς και από την κινάση ATR (σύμπλοκο ATR/ATRIP) που προσλαμβάνει την ATM καθώς και την πρωτεΐνη Rad3 (ATR). Η ενεργοποιημένη φωσφορυλιωμένη ATR σηματοδοτεί την Chk1 προκαλώντας έναν σηματοδοτικό καταρράκτη που οδηγεί στον τερματισμό του κυτταρικού κύκλου [98]. Είναι πρωταρχικής σημασίας ο τερματισμός του κυτταρικού κύκλου όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, καθώς επιτρέπει στο κύτταρο να αποκαταστήσει τη βλάβη του DNA και αν η ζημιά είναι εκτεταμένη, υφίσταται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση. Όταν τα σημεία ελέγχου DDR (μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ανιχνεύει τη βλάβη του DNA και το αντιγραφικό stress, ενεργοποιώντας την απόκριση για να περιορίσει την απειλή) του κυτταρικού κύκλου δυσλειτουργούν, η βλάβη στο DNA επιμένει, και μπορεί να γίνει επιζήμια για το κύτταρο και τον οργανισμό [99]. Πέραν του ρόλου του στο μηχανισμό DSB, το MRN διαδραματίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην πρόσληψη, σταθεροποίηση και διέγερση του συμπλόκου της λιγάσης [100].



Εικόνα 2.3. Μοριακοί μηχανισμοί της απόκρισης βλάβης του DNA [96].

Σε απόκριση θραύσεων διπλής έλικας DNA (DSBs) ή κατάρρευσης της διχάλας αντιγραφής (δεν φαίνεται), οι αισθητήρες (ανοικτό μπλε) ανιχνεύουν τη βλάβη και οι μεσολαβητές σηματοδότησης συλλέγουν ή ενεργοποιούν τελεστές (effectors) που επιδιορθώνουν τη βλάβη και ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα μακρο-σύμπλοκα που περιέχουν το BRCA1 (σκούρο μπλε) είναι κρίσιμοι μεσολαβητές της απόκρισης βλάβης του DNA. Το σύμπλεγμα BRCA1-abraxas-RAP80 συνδέεται με ουβικιτιλιωμένες ιστόνες κοντά στις θέσεις βλάβης του DNA. Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX (γ H2AX), το μεσολαβητή της πρωτεΐνης 1 σημείου ελέγχου της βλάβης του DNA (MDC1) και την πρωτεΐνη RING Finger 8 (RNF8). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με το BRCA1-CtBP (CtIP) συσχετίζεται με το σύμπλεγμα MRN (το οποίο αποτελείται από τα MRE11, RAD50 και NBS1), το οποίο «αντιλαμβάνεται» τα DSBs και είναι υπεύθυνο για την εκτομή τους. Η BRCA1-εταίρος και ο εντοπιστής του BRCA2, (PALB2)-BRCA2 συμπλόκου, είναι σημαντική στη διαμεσολάβηση του RAD51-εξαρτώμενου ομόλογου ανασυνδυασμού (HR). Η εξαρτώμενη από την κινάση CHK2 φωσφορυλίωση του S988 στη BRCA1 φαίνεται ότι απαιτείται για το σύμπλεγμα τελεστή BRCA1-PALB2-BRCA2, το οποίο είναι σημαντικό στο HR51 με τη μεσολάβηση του RAD51. Το σύμπλοκο αλληλεπίδρασης BRCA1-BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1)-topoisomerase 2-binding protein 1 (TOPBP1) συνδέεται με την επιδιόρθωση του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και μπορεί να συμβάλει στη σηματοδότηση

μέσω των ATM και Rad3 (ATR) -CHK1, αλλά η ακριβής λειτουργία του είναι άγνωστη. Η βλάβη του DNA αναγνωρίζεται επίσης από τις ATM και ATR κινάσες, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις BRCA1, BRCA1-συνδεόμενες πρωτεΐνες και την p53 και σηματοδοτούν το σχηματισμό μακρο-σύμπλοκων που ενεργοποιούν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

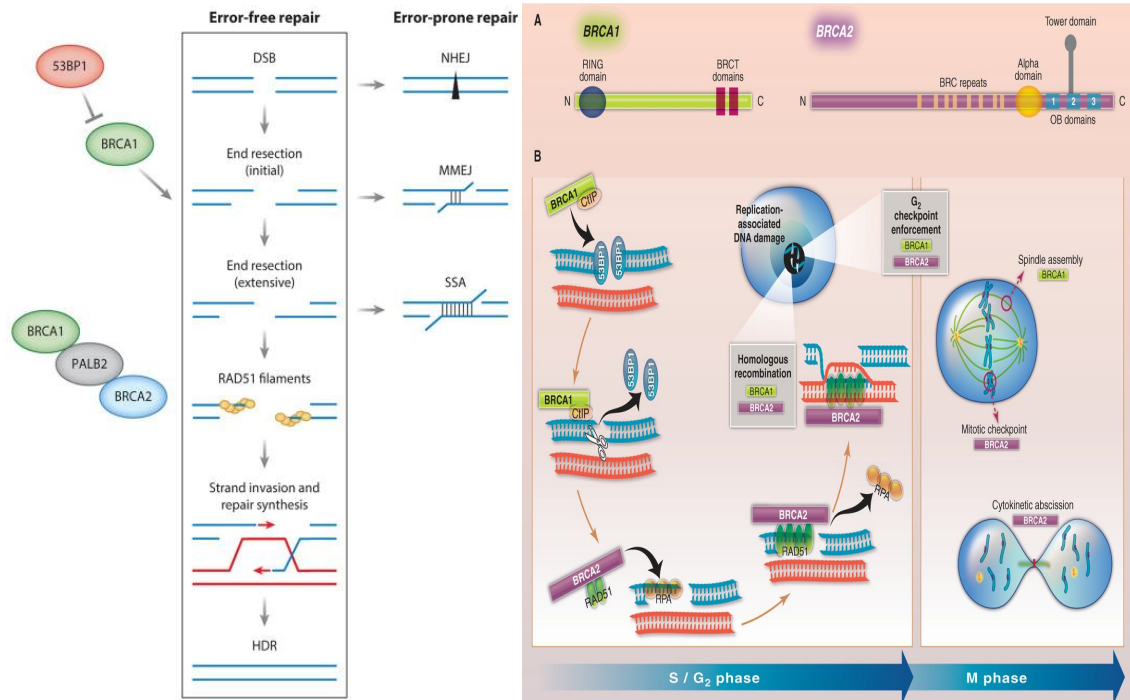
2.1.1 Σύνθεση μεταφοράς

Εάν η βλάβη του DNA εξακολουθεί να υφίσταται παρά τις προαναφερθείσες διεργασίες επιδιόρθωσης μπορεί να προκύψει εμπλοκή αντιγραφής. Ένας τρόπος παράκαμψης είναι η "αποφυγή βλάβης", χρησιμοποιώντας μηχανισμούς ανασυνδυασμού για να αντιγραφούν γενετικές πληροφορίες από τη μη κατεστραμμένη αδελφή χρωματίδα. Η εναλλακτική λύση είναι να ενσωματωθούν τα νουκλεοτίδια απέναντι από τη βλάβη, μια διαδικασία γνωστή ως σύνθεση (μεταφοράς) πάνω από τη βλάβη (TLS). Το TLS χρησιμοποιεί ειδικές DNA πολυμεράσες οι οποίες είναι ικανές να παρακάμψουν συγκεκριμένους τύπους βλάβης του DNA προκειμένου να αποφευχθεί η παρεμπόδιση του αναδιπλασιασμού. Έχουν ταυτοποιηθεί οι πολυμεράσες TLS, με υποκατηγορίες τις: Rev1 (πολυμεράσες οικογένειας Υ) καθώς και πολυμεράσες της οικογένειας Β και της οικογένειας Α, με τις δικές τους ιδιαιτερότητες η κάθε μία. Αυτές οι πολυμεράσες αναλαμβάνουν τη σύνθεση για να παρακάμψουν την βλάβη του DNA [101].

2.1.2 Ρόλος των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* στον ομόλογο ανασυνδυασμό και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου

Ο HR, ομόλογος ανασυνδυασμός, είναι μια κύρια οδός για την επιδιόρθωση των DSB χωρίς σφάλματα, η οποία συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια των S / G2 φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η επιλογή της οδού επιδιόρθωσης DSB προσδιορίζεται από την τελική εκτομή του DNA - την επεξεργασία των άκρων DNA για την παραγωγή μονών κλώνων 3' άκρων. Το αν η τελική εκτομή συμβεί, ρυθμίζεται από το *BRCA1* σε ανταγωνισμό με την πρωτεΐνη 53BP1 και η τελική εκτομή μπορεί να λάβει χώρα σε δύο στάδια, μια αρχική φάση που οδηγεί σε βραχεία 3' άκρα (<100 ζεύγη βάσεων) και μια φάση πιο εκτεταμένων 3' άκρων (εκατοντάδες ζευγών βάσεων). Η *BRCA1* πρωτεΐνη επίσης προωθεί τα μεταγενέστερα στάδια του HR μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη PALB2, η οποία με τη σειρά της προσλαμβάνει την *BRCA2* (Εικόνα 2.4) [57]. Το καθοριστικό βήμα του HR, το οποίο

ελέγχεται από το *BRCA2*, είναι ο σχηματισμός νημάτων RAD51 στους μονούς κλώνους 3', ακολουθούμενο από την επιδιόρθωση του DNA στον ομόλογο κλώνο. Οι περισσότεροι HR ολοκληρώνονται με μια απλή μετατροπή/ ανταλλαγή γονιδίων, αν και άλλα αποτελέσματα είναι πιθανά [102].



Εικόνα 2.4. (α,β). Επιδιόρθωση του DNA κατευθυνόμενη με ομολογία (*homology directed repair- HDR*) ή ομόλογος ανασυνδυασμός, και άλλες οδοί για την επιδιόρθωση θραύσεων διπλής έλικας (*DSBs*) και η συνδεσή τους με τον κυτταρικό κύκλο [103].

Τα DSB μπορούν επίσης να επιδιορθωθούν μέσω μονοπατιών επιδιόρθωσης DNA που είναι επιρρεπή σε σφάλματα (Εικόνες 2.2, 2.4). Η ένωση μη ομόλογων άκρων (*Non Homologous End Joining - NHEJ*) μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε φάσης του κυτταρικού κύκλου και θεωρείται η δεύτερη κύρια πορεία αποκατάστασης των DSB. Στο NHEJ, τα άκρα του DNA προστατεύονται από την τελική εκτομή αλλά συχνά υφίστανται κάποια επεξεργασία πριν από την ένωση, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα μικρές διαγραφές ή εισαγωγές. Η αρχική και η εκτεταμένη τελική εκτομή παρέχει επίσης ενδιάμεσα δύο άλλες οδούς επιδιόρθωσης DSB, τον εναλλακτικό μηχανισμό NHEJ (*alt-NHEJ*) που περιλαμβάνει μικροομολογία, επίσης αποκαλούμενο ως επιδιόρθωση άκρων μεσολαβούμενη από μικροομολογία (*microhomology-mediated end-joining - MMEJ*), και τη

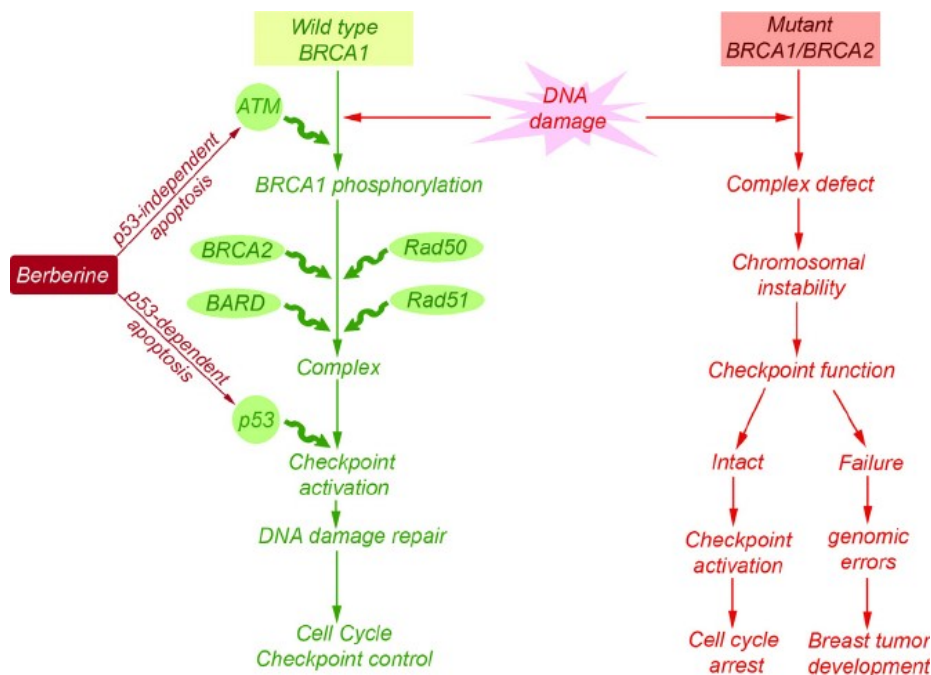
μονόκλωνη ανόπτηση ή υβριδισμό εκτεθειμένων μονόκλωνων άκρων (single-strand annealing - SSA), που περιλαμβάνει μακρύτερα τμήματα ομολογίας.

Συνοπτικά, ο ρόλος των *BRCA1*, *BRCA2* σύμφωνα με τη συμμετοχή τους σε διάφορα βήματα του HR είναι:

- το *BRCA1* προωθεί το HR και την SSA, ενώ το *BRCA2* προάγει το HR και καταστέλλει τη SSA.
- το *BRCA1* ρυθμίζει την επιδιόρθωση δίκλωνων άκρων στον HR ενώ η *BRCA2* προωθεί τη σύσταση και την σταθερότητα του *RAD51*
- τα *BRCA1* και *BRCA2* προστατεύουν τα πρότυπα στοιχεία (κλώνους) DNA από την αφαίρεση βάσεων και αποτρέπουν την αποδόμηση των νεοσυντιθέμενων κλώνων DNA από την νουκλεάση MRE11 [104–107]. Έτσι, οι πρωτεΐνες αυτές επιδιορθώνουν τόσο την βλάβη του DNA όσο και την προλαμβάνουν.

Οι λειτουργίες των *BRCA1* και *BRCA2* στη φάση απόκρισης των βλαβών του DNA (DDR), κατά τη διάρκεια της φάσης S και G2 με τη μεσολάβηση του HR, συμβάλλουν στη διατήρηση της πιστότητας της αντιγραφής. Η απώλεια της λειτουργίας *BRCA1* ή *BRCA2* σε φυσιολογικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα λάθη στην ανάπτυξη τα οποία σε συνδυασμό με την επακόλουθη απώλεια άλλων διαμεσολαβητών DDR, συμβάλλουν στην ανάπτυξη των όγκων. Η γενετική αστάθεια που προκύπτει οδηγεί σε πολλαπλά γενετικά λάθη, εισαγωγές και απώλειες βάσεων, αλλά και δευτερεύουσες μη ειδικές αλλαγές που αποτελούν μία από τις βασικές ερευνητικές προκλήσεις στην κατανόηση της αιτιολογίας των καρκίνων με απώλεια BRCA [107](Εικόνα 2.5). Παρατηρήσεις ότι η δυσλειτουργία του HR μπορεί να είναι επίκτητο χαρακτηριστικό αντί να κληρονομηθεί, υποστηρίζουν την άποψη ότι η γενετική αστάθεια παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού και των οωθηκών. Και οι δύο μηχανισμοί καταλήγουν σε γενετική αστάθεια, η οποία προκαλείται ίσως από το μεταβολικό οξειδωτικό στρες της αντιγραφής. Ως εκ τούτου, ο αριθμός των κακοήθων όγκων (καρκίνων) μαστού/οωθηκών με *BRCA1*⁺ και *BRCA2*⁺ και απώλεια HR μπορεί να είναι 4 έως 5 φορές μεγαλύτερος από ό, τι είχε αρχικά θεωρηθεί, καθιστώντας τον αριθμό των ασθενών που είναι δεκτικοί σε στρατηγικές

στοχευμένης επιδιόρθωσης του DNA πολύ υψηλότερο από ό,τι είχε εκτιμηθεί προηγουμένως.



Εικόνα 2.5. Ρόλος των BRCA1, BRCA2 και πρωτεϊνών που συνδέονται με την γενωμική ακεραιότητα και τον καρκίνο [107].

2.2 Θραύσματα μονής έλικας του DNA (Single strand Break, SSB) και επιδιόρθωση

Η **αποκατάσταση με αποκοπή θάσης (base excision repair - BER)** είναι ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μιας ευρείας ποικιλίας βλαβών νουκλεοτιδικής βάσης του DNA που περιλαμβάνουν οξειδωτικές βλάβες από απαμίνωση, οξείδωση, αλκυλίωση και μονονουκλεϊκά θραύσματα (προϊόντα λανθασμένων ή κατεστραμμένων βάσεων, π.χ. 8-οξογουανίνης, μεθυλοθυμίνης, κλπ) [108, 109]. Ο μηχανισμός BER διακρίνεται σε 2 δευτερεύουσες οδούς: την επιδιόρθωση βραχέων επιπέδων (short-patch) ή μικρής έκτασης BER, και των μακρών επιπέδων (long-patch) ή μεγάλης έκτασης BER. Ο BER μικρής έκτασης είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο αντικαθίσταται μόνο 1 νουκλεοτίδιο, ενώ στο

μηχανισμό BER μεγάλης έκτασης, αντικαθίστανται 2-13 νουκλεοτίδια. Έχουν ταυτοποιηθεί διάφορες γλυκοζυλάσες του DNA που συμμετέχουν στην εκτομή βάσεων από τη διπλή έλικα του DNA ως πρώτο βήμα του μηχανισμού, κάθε μία με ειδική συγγένεια για κάθε είδος θραύσματος.

Η απομάκρυνση της κατεστραμμένης βάσης, με τη μεσολάβηση (AP) ενδονουκλεάσης, οδηγεί σε μια αβασική θέση (θέση AP) [110], η οποία στη συνέχεια αναπληρώνεται με σύνθεση από μία DNA πολυμεράση pol. Τέλος, είτε το σύμπλεγμα XRCC1-DNA Ligase III είτε η DNA Ligase I επιτρέπει αποτελεσματική σύνδεση της βάσης μέσω λειτουργίας λιγάσης, αποκαθιστώντας την ακεραιότητα της έλικας [111].

Η επιδιόρθωση αναντιστοιχίας βάσεων/ αταίριαστων βάσεων (mismatch repair - MMR) είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη διόρθωση αναντιστοιχιών όπως αυτές που οφείλονται σε σφάλματα αντιγραφής. Τέτοιες αναντιστοιχίες βάσης-βάσης και βρόχοι εισαγωγής / διαγραφής προκύπτουν από λανθασμένη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων από τη DNA πολυμεράση κατά την ολίσθηση στο πρότυπο κλώνο [112]. Η αποτυχία επιδιόρθωσης των αναντιστοιχιών μέσω κυτταρικών οδών επιδιόρθωσης ή η εσφαλμένη επιδιόρθωση του κλώνου που περιέχει την αρχική και σωστή ακολουθία DNA, οδηγεί τελικά σε γενετικές μεταλλάξεις [113]. Το MMR αναγνωρίζει και διορθώνει όλες τις αναντιστοιχίες βάσης-βάσης και τις μικρές παρεμβολές/ προσθήκες, αυξάνοντας συνεπώς την πιστότητα της αντιγραφής του DNA έως και 1000 φορές. Τα κύτταρα με μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες MMR έχουν αυξημένη συχνότητα αυθόρμητων μεταλλάξεων και διαφαίνεται η σημασία αυτής της οδού επιδιόρθωσης [112].

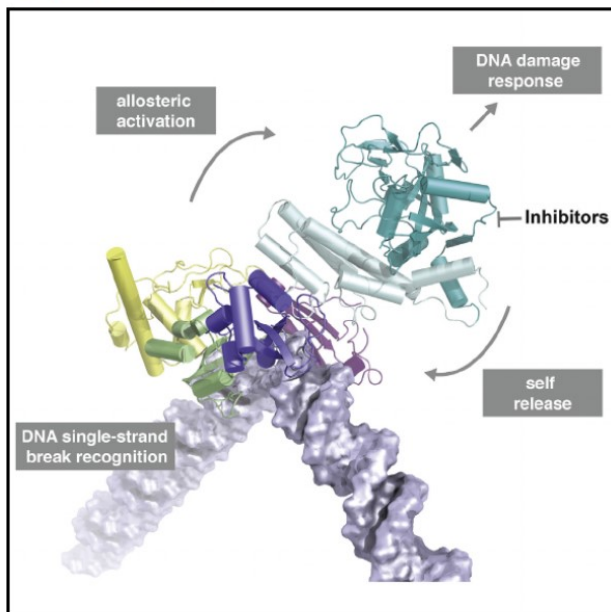
Η επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair - NER) είναι ένα από τα πιο ευέλικτα συστήματα επιδιόρθωσης DNA στον άνθρωπο. Η NER εξαλείφει ογκώδεις βλάβες που οδηγεί σε στρεβλώσεις της έλικας του DNA. Στην πραγματικότητα, αυτή η οδός επιδιόρθωσης είναι απαραίτητη για την βλάβες επαγόμενες από την υπεριώδη ακτινοβολία, όπως CPDs και 6-4PPs. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης NER είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που απαιτεί περίπου 30 διαφορετικές πρωτεΐνες και απομακρύνει το κατεστραμμένο DNA με διπλή τομή του κατεστραμμένου κλώνου. Διαιρείται σε δύο δευτερεύουσες οδούς που επιτρέπουν είτε την αποτελεσματική αφαίρεση των βλαβών που εμποδίζουν τη συνέχεια και πιστότητα της μεταγραφής, γνωστή ως επιδιόρθωση που

συνδέεται με την μεταγραφή (TCR/ TC-NER), είτε την αφαίρεση των βλαβών σε οποιαδήποτε άλλη θέση όλου του γονιδιώματος που είναι γνωστή ως επιδιόρθωση γενικού γονιδιώματος (GG-NER) [114].

2.2.1 Ο Ρόλος των γονιδίων PARP στην επιδιόρθωση θραυσμάτων μονής έλικας (SSB) του DNA

Οι PARPs (πολυμεράσες πολυαδενοδιφωσφορικής ριβόζης/ πολυ-ADP-ριβόζης) είναι ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA που προάγουν την επιδιόρθωση θραυσμάτων μονής έλικας (SSB) με δέσμευση στις θέσεις των SSB του DNA και πρόσληψη των μηχανισμών απόκρισης βλάβης. Στον άνθρωπο, η υπερικογένεια *PARP* αποτελείται από 17 μέλη, εκ των οποίων πέντε έχουν γνωστούς ρόλους στην επιδιόρθωση των SSB [115] (Εικόνα 2.6). Η *PARP-1*, το πιο καλά μελετημένο μέλος της οικογένειας, απαιτείται για την επιδιόρθωση της εκτομής βάσης και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνο για το 90% της δραστικότητας PARP, και θα αναλυθεί εκτενέστατα στο επόμενο κεφάλαιο.

GraphicalAbstract



Authors

SebastianEustermann,
Wing-FungWu,
Marie-FranceLangelier,...,
AmandaA.Riccio,JohnM.Pascal,
DavidNeuhaus

Correspondence

dn@mrc-lmb.cam.ac.uk

InBrief

Eustermannetal.revealthe structural basisforrecognitionofDNA single-strandbreaksbyhumanPARP-1andhow thisdrivesamulti-domainfolding cascadetooperatetheallosteric switch initiatingDNAdamagesignaling.The structuralmodelofPARP-1onaDNA breakhelpsrationalizeinhibitoraction.

Εικόνα 2.6. Δομική βάση αναγνώρισης των μονόκλωνων θραυσμάτων DNA από την PARP-1. Η αναγνώριση των SSB ενεργοποιεί αλλοστερικά την πρωτεΐνη και πυροδοτεί την οδό σήμανσης αποκρίσης βλάβης του DNA. Η χρήση αναστολέων της PARP-1 προκαλεί την αναστολή της απο τη δομική αναγνώριση των SSB [116].

2.3 Αλκυλιωτικοί Παράγοντες και βλάβη του γενετικού υλικού

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι εξαιρετικά χημικά δραστικά μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Σχηματίζουν χιαστούς συνδέσμους συνδέοντας ομοιοπολικά δύο υπολείμματα νουκλεοτιδίων, είτε με «Inter-Strand Crosslinks» (εξωκλωνικούς συνδέσμους, σύνδεση βάσεων που βρίσκονται στους δύο αντιπαράλληλους κλώνους του DNA) είτε με «Intra-Strand Crosslinks» (εσωκλωνικούς συνδέσμους, σύνδεση μεταξύ βάσεων στον ίδιο κλώνο του DNA) [117, 118].

Οι ενδοκλωνικές διασυνδέσεις μπορούν να αναιρεθούν [119]. Ωστόσο, οι εξωκλωνικές διασταυρούμενες συνδέσεις σταματούν μόνιμα τον διαχωρισμό των κλώνων του DNA, διακόπτοντας έτσι τις βασικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή, προκαλώντας κυτταρόσταση και κυτταροξικότητα. Αν και οι αλκυλιωτικοί παράγοντες θεωρούνται ως μη ειδικοί για τη φάση του κυτταρικού κύκλου, τα κύτταρα στις φάσεις G1 και S να είναι πιο ευαίσθητα. Χωρίς επιδιόρθωση του DNA, ειδικά στα διαιρούμενα κύτταρα, η προκαλούμενη καθυστέρηση στην αντιγραφή του γενετικού υλικού οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, κάτι το οποίο είναι ζητούμενο στη θεραπεία των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων. Τέτοιου είδους αντικαρκινικά φάρμακα είναι η μελφαλάνη και η σισπλατίνη, με την πρώτη κλινική εφαρμογή ενός αντίστοιχου φαρμάκου (Nitrogen mustard) να χρονολογείται από τη δεκαετία του 1940 [120].

Ο τρόπος δράσης των αλκυλιωτών είναι να προσφέρουν άμεσα ή έμμεσα αλκυλιωτικές ομάδες. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες υφίστανται δομική αναδιάταξη που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ασταθούς ενδιάμεσου, ενός ιόντος αιθυλενο-ιμμωνίου (ethylene immonium ion). Αυτό το ιόν είτε απευθείας, είτε μέσω ενός άλλου ενδιάμεσου, ενός ιόντος ανθρακικού (carbonium ion), μεταφέρει αλκυλομάδες σε νουκλεϊκά οξέα όπως η γουανίνη, ή σε άλλα κυτταρικά συστατικά, οδηγώντας στην ανώμαλη σύνδεση βάσεων, στην εκτομή τους, και τελικά σε θραύση του κλώνου.

Η σύνδεση μεταξύ της αλκυλίωσης του DNA και του θανάτου του καρκινικού κυττάρου δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως. Ωστόσο, ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς είναι η βλάβη στο DNA που επαρκεί για να ενεργοποιήσει προαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η p53, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο.

Το κύτταρο εν τούτοις διαθέτει μηχανισμούς αντίστασης, η επιδιόρθωση του DNA που προαναφέρθηκε, η μειωμένη είσοδος φαρμάκου στο κύτταρο και η απενεργοποίηση του αλκυλιωτικού μορίου (π.χ. από γλουταθειόνη)

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η μεταξύ των πολυάριθμων κατηγοριών αλκυλιωτικών παραγόντων δημιουργείται διασταυρούμενη αντοχή από τα κύτταρα. Εξαίρεση αποτελούν πολύ συγκεκριμένες υποκατηγορίες, όπως οι νιτροζουρίες που διαθέτουν επιπλέον μηχανισμό δράσης με την αντίδραση της καρβαμοϋλίωσης. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης αναφέρεται ως καρβαμοϋλιωμένη πρωτεΐνη και αυτή η διαδικασία φαίνεται να περιορίζει την ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να επιδιορθώνει το DNA. Αυτός ο μοναδικός μηχανισμός δράσης περιορίζει τη διασταυρούμενη αντίσταση μεταξύ των νιτροζουριών και άλλων μελών αυτής της κατηγορίας [121].

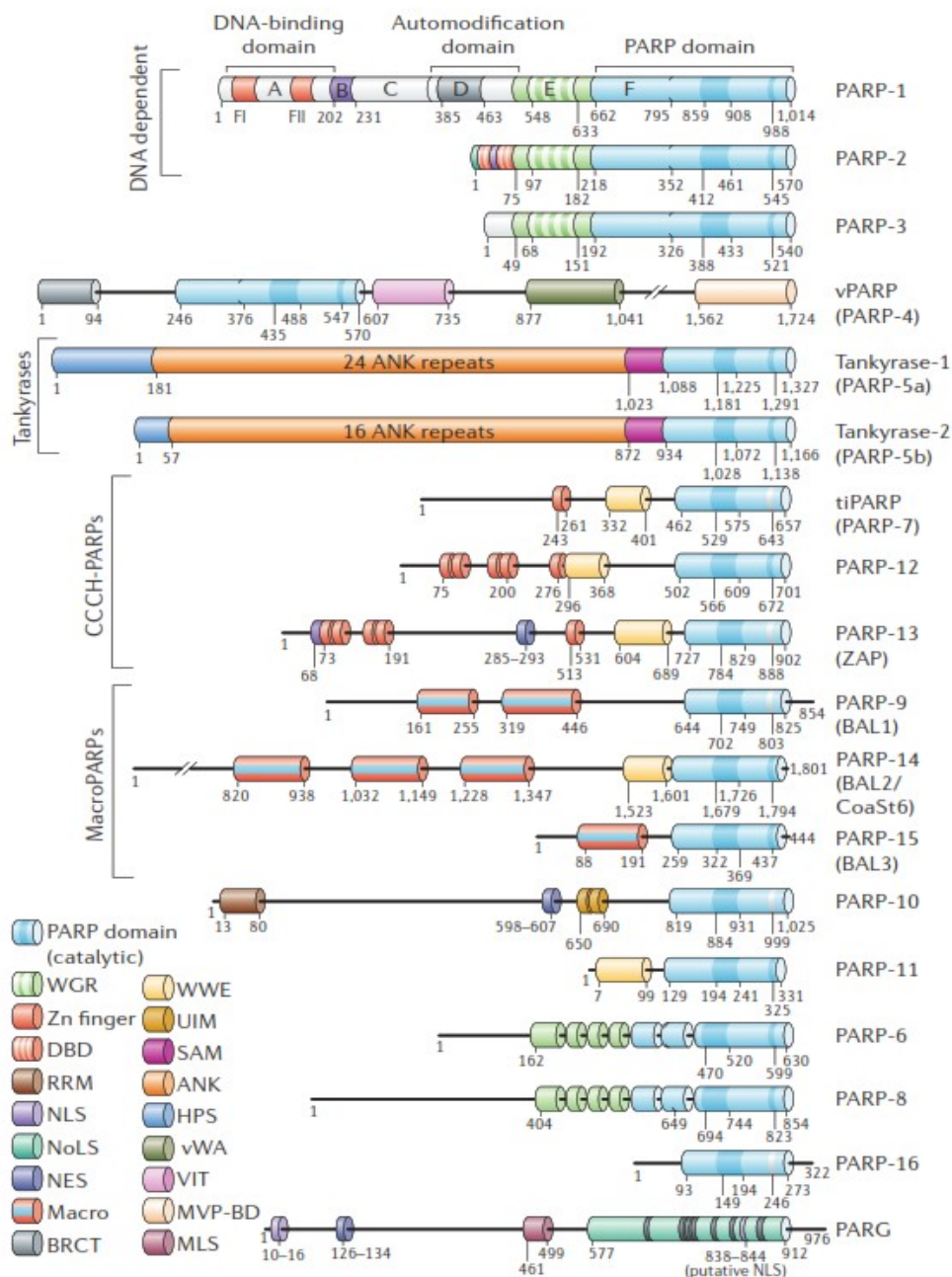
3. Η ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥ (ADP-ΡΙΒΟΖΗΣ) 1 (*PARP-1*)

Η πολυμεράση της πολυ-(ADP-ριβόζης) 1 (*PARP*) ή ADP ριβοζυλοτρανσφεράση δρα σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών με την τοποθέτηση επαναλαμβανόμενων διμερών μορίων ADP-ριβόζης σε κυτταρικούς στόχους, δημιουργώντας πολυμερή ADP-ριβόζης [115]. Προσφάτως έχουν ανακλυφθεί 17 μέλη της οικογένειας της πολυμεράσης της πολυ-ADP-ριβόζης (*PARP*), με την *PARP-1* ως την πρώτη που αναγνωρίστηκε καθώς και την πιο μελετημένη όλων στην οικογένεια των *PARP* πρωτεϊνών. Η *PARP-1* βρίσκεται στον πυρήνα και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση και τον μεταβολισμό του DNA [122]. Επιπλέον, οι ανακαλύψεις των νέων μελών της οικογένειας *PARP*, έδωσαν δεδομένα τόσο για τη συμμετοχή τους στην άμυνα πρώτης γραμμής έναντι των γονοτοξικών ουσιών, όσο και στη ρύθμιση διαφόρων διεργασιών του κυττάρου, όπως η δομική διατήρηση, η οργάνωση και η ακεραιότητα του γονιδιώματος, η επιδιόρθωση του DNA, η ρύθμιση και η έκφραση άλλων πυρηνικών πρωτεϊνών σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, ο κυτταρικός θάνατος μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής διαφοροποίησης, η ρύθμιση της δραστηριότητας των τελομερασών καθώς και η καταστροφή των πρωτεϊνών μέσω ουβικουιτίνωσης [115, 123].

3.1 Υπεροικογένεια των *PARPs*

Αντιδράσεις πολύ-ADP-ριβοζυλίωσης και γονίδια όμοιας λειτουργίας με αυτά των *PARP* έχουν περιγραφεί σε πληθώρα πολυκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών, από μύκητες ως και θηλαστικά, αλλά και σε προκαρυωτικά ευβακτήρια και αρχαιοβακτήρια, καθώς και σε ιούς με διπλή έλικα DNA [124]. Στα θηλαστικά, η παραγωγή της *PARP-1* υπερβαίνει κατά πολύ των άλλων. Στον άνθρωπο, έχουν βρεθεί 17 πρωτεΐνες με ομολογίες προς τον καταλυτικό τομέα της *PARP-1* [87]. Η ονοματολογία που έχει προταθεί από τους Hottiger et al. χωρίζει τα μέλη της υπεροικογένειας σε 3 ομάδες, ανάλογα με τα ενεργά τους κέντρα: (1) *PARPs* 1- 4, 5α και 5β, που αποτελούν τις «γνήσιες» *PARPs* κι έχουν μια διατηρημένη θέση γλουταμικού (Glu 988) το οποίο καθορίζει και την καταλυτική δραστηριότητα, (2) *PARPs* 6-8, 10-12 και 14-16 των οποίων η δράση χαρακτηρίζεται ως μόνο-ADP-ριβόζυλο τρανσφεράση (mono ADP-ribosyl transferases; mARTs) -είτε επιβεβαιωμένη είτε θεωρητική δράση- και (3) *PARPs* 9 και 13 οι οποίες δεν διαθέτουν κατάλοιπο σύνδεσης του NAD⁺ και πιθανότατα λειτουργούν ως τρανσφεράσες ή συνθετάσες [125, 126]. Η πρώτη συμμετέχει

στην δημιουργία συμπλόκου με σκοπό την ουβικουιτίνωση (ή ουβικουιτυλίωση ή ουβικουιτίνωση) κάποιου θραύσματος της αλυσίδας του DNA και υπερεκφράζεται σε περιπτώσεις Διάχυτου από μεγάλα Β-κύτταρα Λεμφώματος (Diffuse Large B-Cell Lymphoma; DLBCL), ενώ ο ρόλος της δεύτερης θεωρείται αντιϊικός, καθώς σε περίπτωση ιϊκής προσβολής του οργανισμού, επιστρατεύει τους κυτταρικούς RNA μηχανισμούς αποσύνθεσης του ιικού mRNA. Οι PARPs εντοπίζονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων. Οι PARPs 1-3, 5α, 5β εντοπίζονται αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ οι PARPs 4, 6, 8, 9, 13-15 εντοπίζονται και στον πυρήνα αλλά όχι αποκλειστικά. Οι PARPs 7, 10-12 και 16 δεν έχουν εντοπιστεί. Η *PARP-1* είναι η καλύτερα κι εκτενέστερα μελετημένη πρωτεΐνη της υπεροικογένειας (Εικόνα 3.1).

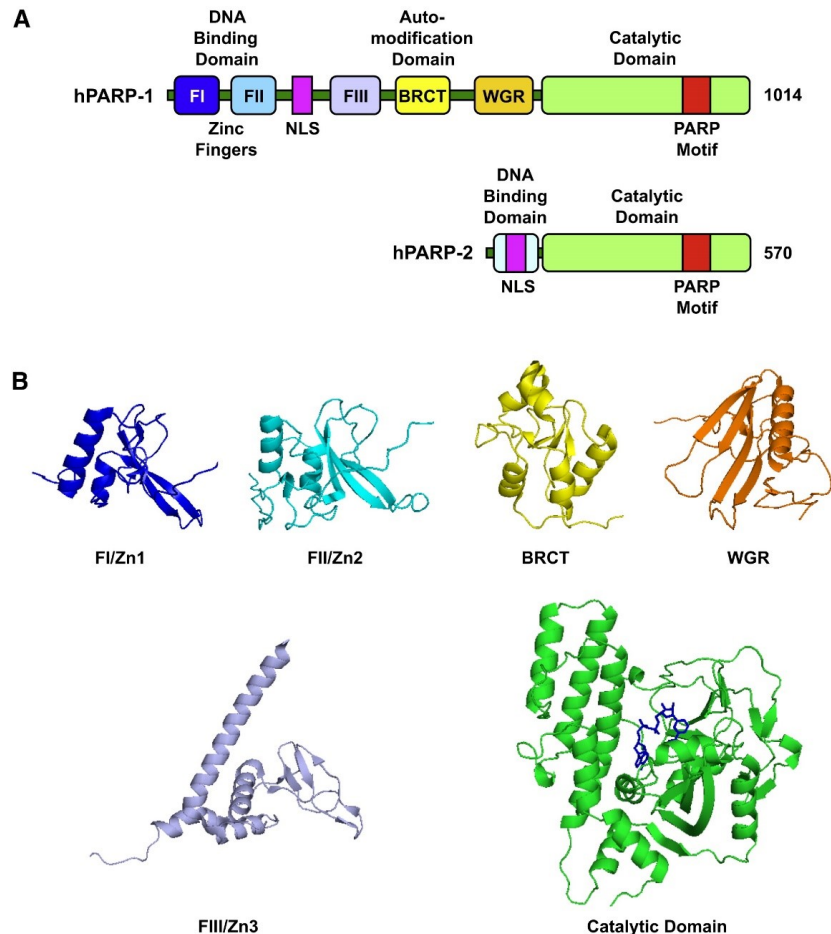


Εικόνα 3.1. Η Υπεροικογένεια των PARPs [115].

3.2 Δομή και καταλυτική δράση της *PARP-1*

Η *PARP-1* είναι ένα ένζυμο μεγέθους περίπου 116 kDa με υψηλή έκφραση στον πυρήνα των θηλαστικών και με λειτουργίες πολύ-ADP-ριβόζυλο τρασνφεράσης και πολύ-ADP-ριβόζυλο συνθετάσης. Η εξαιρετικά συντηρημένη δομή της περιλαμβάνει 4 οργανωμένους λειτουργικούς τομείς (domains): (1) Τομέας σύνδεσης DNA με τρεις δακτύλους

ψευδαργύρου (F1-3) [127] στο N-τελικό άκρο (N-terminal double zinc finger DNA-binding domain; DBD) και 2 μοτίβα μικρού μεγέθους που σχετίζονται με τον πυρηνικό εντοπισμό (Nuclear Localization Signals; NLSs), (2) Τομέας αυτοτροποποίησης που περιλαμβάνει ένα μοτίβο BRCT (*BRCA1* C terminus), συσχετιζόμενο με τον έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και έχει βρεθεί σε μια ποικιλία πρωτεϊνών που δρουν ως απόκριση σε βλάβες του DNA, καθώς και μια αλληλουχία 14-28 καταλοίπων γλουταμινικού οξέος που είναι δέκτες πολύ(ADP)ριβοζυλίωσης, (3) Μία υψηλά συντηρημένη α -έλικα η οποία χωρίς σαφήνεια, φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της *PARP-1* [128] και (4) Καταλυτικός τομέας που προσδένεται στο υπόστρωμα, δηλαδή το μόριο NAD^+ , με μια αλληλουχία 50 αμινοξικών καταλοίπων που είναι υψηλά συντηρημένη και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως «PARP signature» (PS) (Εικόνα 3.2).

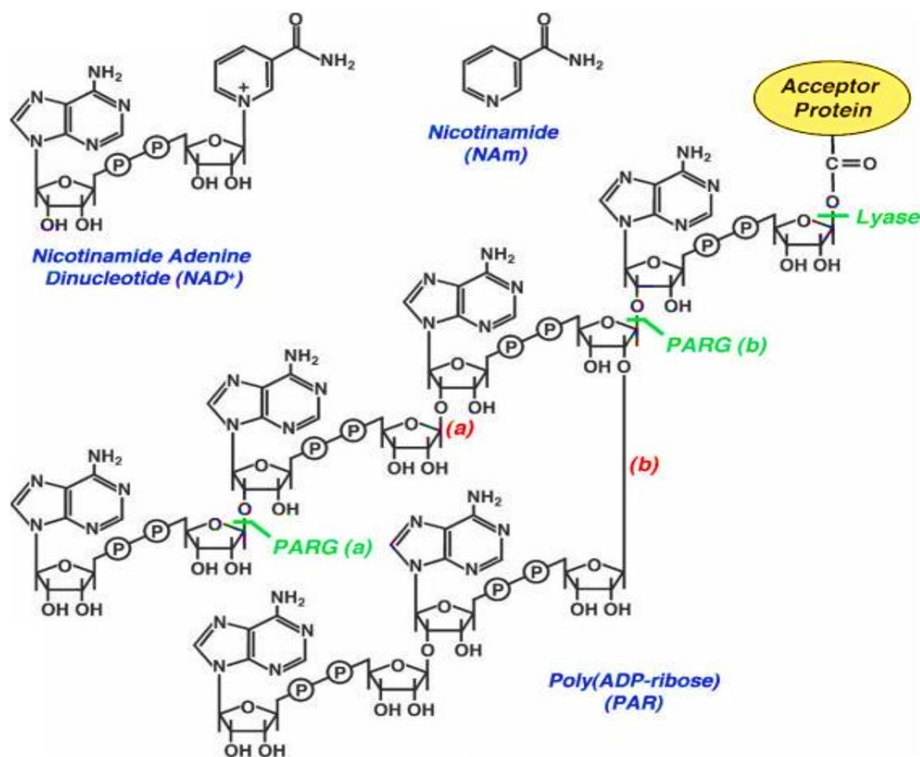


Εικόνα 3.2. Οι δομικοί τομείς της *PARP-1*. (Α) Σχηματική αναπαράσταση ανθρώπινης *PARP-1* και *PARP-2* με τους λειτουργικούς τομείς. (Β) Δομές των έξι δομικών και λειτουργικών τομέων στην ανθρώπινη *PARP-1*. [129]

Τα δάκτυλα ψευδαργύρου στον τομέα σύνδεσης του DNA χρησιμεύουν για τη διαδικασία αυτή, τη σύνδεση πρωτεΐνης-DNA. Τα δάκτυλα F1,2 αναγνωρίζουν θραύσεις μονής αλυσού (κλώνου) και διαθέτουν χαρακτηριστικό μοτίβο προσδέτη Cys-Cys-His-Cys. Ο έλεγχος και η δημιουργία διμερών *PARP-1*, δομή που αποτελεί ως επί το πλείστον την ενεργό μορφή του μορίου, έγκεινται κυρίως στον τομέα αυτοτροποποίησης, ενώ η πολύ-ADP-ριβοζυλίωση προκαλεί τον αποδιμερισμό της ίδιας της πρωτεΐνης και την απώλεια λειτουργικότητάς της [130].

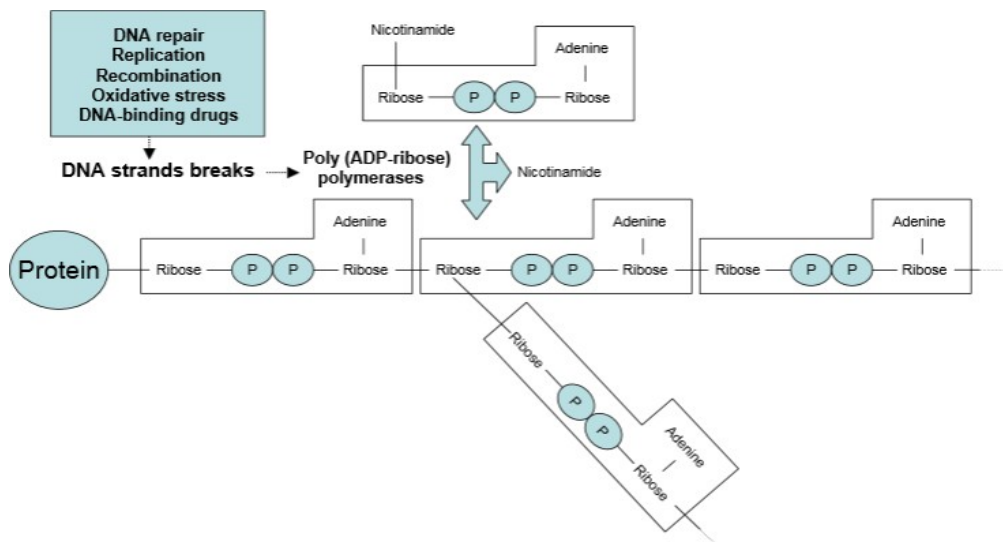
Οι τομείς (3) και (4) αναφέρονται κάποιες φορές ως ενιαίο τμήμα, λόγω της υψηλής συντήρησής τους, συγκροτώντας το C-τελικό καταλυτικό θραύσμα (τμήμα) της PARP (C-terminal catalytic PARP fragment; PARP-CF). Το PARP-CF έχει μέγεθος 40kDa και διατηρεί μόνο του την καταλυτική δραστηριότητα του μορίου ακόμα κι αν αυτό διασπαστεί. Η α-έλικα διαθέτει ένα μοτίβο ελίκων up-up-down-up-down-down. Το C-τελικό άκρο του σχηματίζεται από 5 αντιπαράλληλα και 4 μη κανονικά οργανωμένα β-πτυχωτά φύλλα που σχηματίζουν 2 β-πτυχωτές επιφάνειες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ένα μοναδικό δεσμό υδρογόνου. Αυτές φαίνεται να σχετίζονται με την πρόσδεση του NAD^+ .

Η βασική καταλυτική δράση της *PARP-1* ευρίσκεται στην επαναλαμβανόμενη σύνδεση διμερών ADP-ριβόζης (ADP-ribose; ADPr) σε συγκεκριμένα μόρια-στόχους, προκαλώντας τον σχηματισμό μικρότερων ή μεγαλύτερων αλυσίδων PAR (Εικόνα 3.3). Η *PARP-1* δρα με τρεις διαφορετικές ικανότητες πολυμεράσης, δηλαδή κατά την έναρξη, την επιμήκυνση και την διακλάδωση των μορίων στόχων με ADPr. Ως αντίδραση του ενζύμου περιγράφεται η εξής: $\text{NAD}^+ + \text{X} \rightarrow \text{X-1'-ribose-5'-ADP} + \text{nicotinamide}$, η οποία έχει προϊόν γραμμικά ή διακλαδισμένα πολυμερή της ADPr πάνω στον δέκτη X. Κάθε κατάλοιπο ADPr, περιέχει ένα μόριο ριβόζης για τη σύνδεση ριβόζης-ριβόζης, ένα μόριο αδενίνης με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δύο ομάδες φωσφορικού που του προσδίδουν αρνητικό φορτίο (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Σχηματικά η αντίδραση της PARP-1. Οι μονάδες ADPr συνδέονται μεταξύ τους με $1' \rightarrow 2'$ γλυκοσιδικούς δεσμούς ριβόζης-ριβόζης. Ο δέκτης X μπορεί να είναι είτε ένα γλουταμικό σε μια πρωτεΐνη που πρόκειται να τροποποιηθεί (έναρξη), είτε το 2'-υδροξύλιο της αδενινικής ριβόζης (επιμήκυνση) είτε η νικοτινάμιδο-ριβόζη (διακλάδωση). Ο λόγος διακλάδωση/ επιμήκυνση είναι περίπου 2%, ενώ ο αριθμός των μονομερών ποικίλει και φτάνει έως τα 200 μόρια ADPr τα οποία χαρακτηρίζονται από πολύ αρνητικό φορτίο [131].

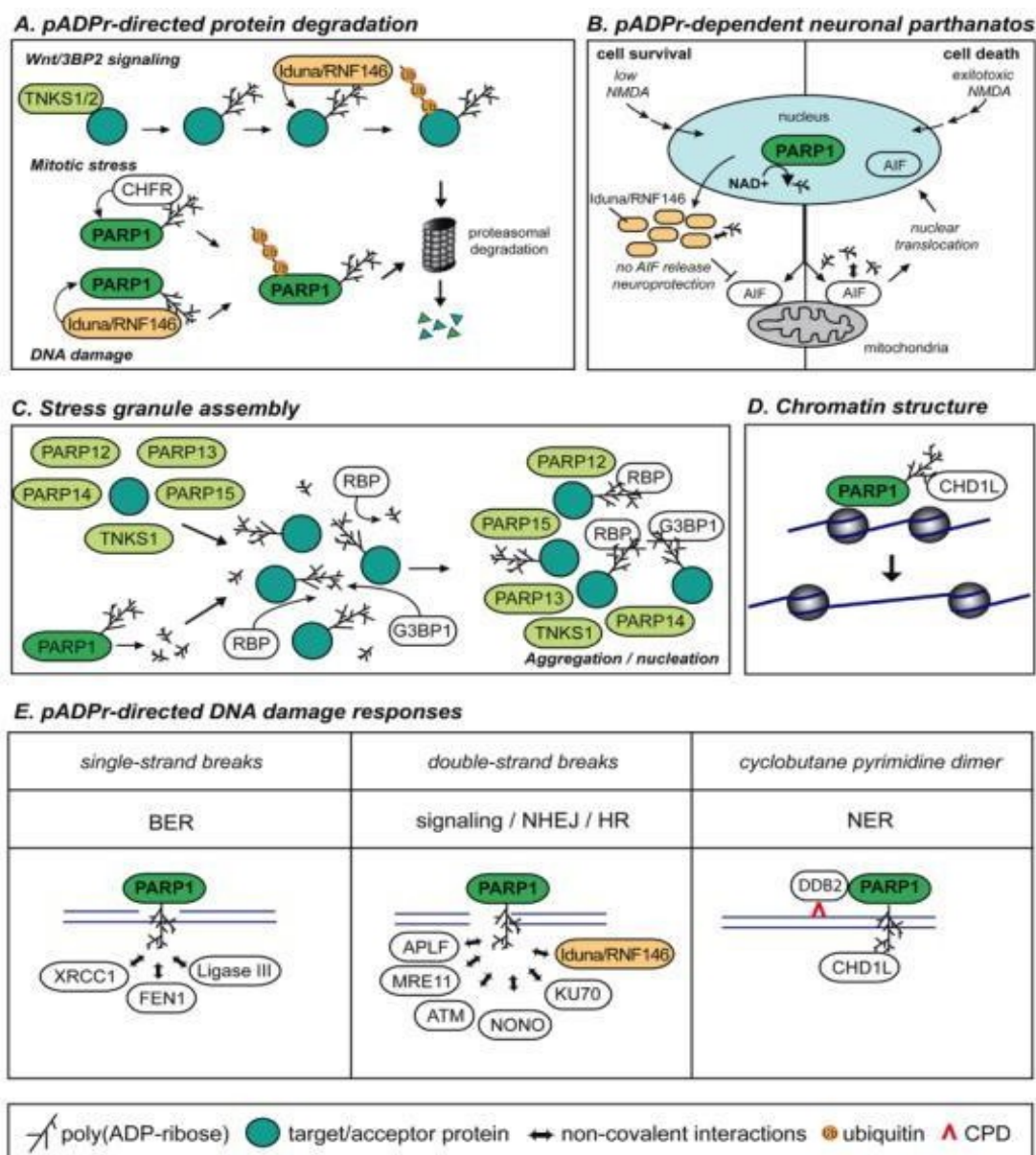
Κατ' αυτόν τον περιγεγραμμένο τρόπο, η PAR μπορεί και δημιουργεί σταθερές δομές με δυνατότητες αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια, λειτουργώντας με τοπο-ειδική ομοιοπολική τροποποιήτική δράση, ως μήτρα πρόσδεσης πρωτεϊνών ή ως αλλοστερικός ρυθμιστής, και επιδρώντας σημαντικά στην ενεργότητα και στη λειτουργικότητα πρωτεϊνών (Εικόνα 3.4). Έτσι, η πολύ ADP-ριβόζη (PAR) ονομάζεται και «τρίτος τύπος νουκλεϊκού οξέος» λόγω της χημικής σύστασής της [130].



Εικόνα 3.4. Η καταλυτική δραστηριότητα των PARP.

3.3 Μοριακές, βιοχημικές και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις της *PARP-1*

Η *PARP-1*, είναι ένα πολυδύναμο μόριο σε αφθονία στο κύτταρο. Σχετίζεται με μια ποικιλία λειτουργιών του κυττάρου, προσδένεται σε διαφορετικά υποστρώματα, όπως πολλές διαφορετικές μορφές DNA (θραύσματα μίας ή δύο αλυσίδων, επιχιασμούς, υπερέλικες, συγκεκριμένες δομές διπλής έλικας) αλλά και σε πρωτεΐνες, πυρηνικές ιστόνες, τη συνδετική ιστόνη H1 και μεταγραφικούς παράγοντες. Η ενζυμική ενεργότητα της αναπτύσσεται άμεσα παρουσία υποστρωμάτων και ρυθμίζεται τόσο από ενδογενείς παράγοντες (*PARP-1*, κινάσες, πολυαμίνες, πουρίνες) όσο και από εξωγενείς (ορμόνες, βιταμίνη D, μεταβολίτες καφεΐνης). Η πολύ-λειτουργικότητά της είναι αποτέλεσμα συνδυασμού των παραπάνω υποστρωμάτων, ρυθμιστών και ενεργότητας του μορίου ως προς το κάθε υπόστρωμα (Εικόνα 3.5).

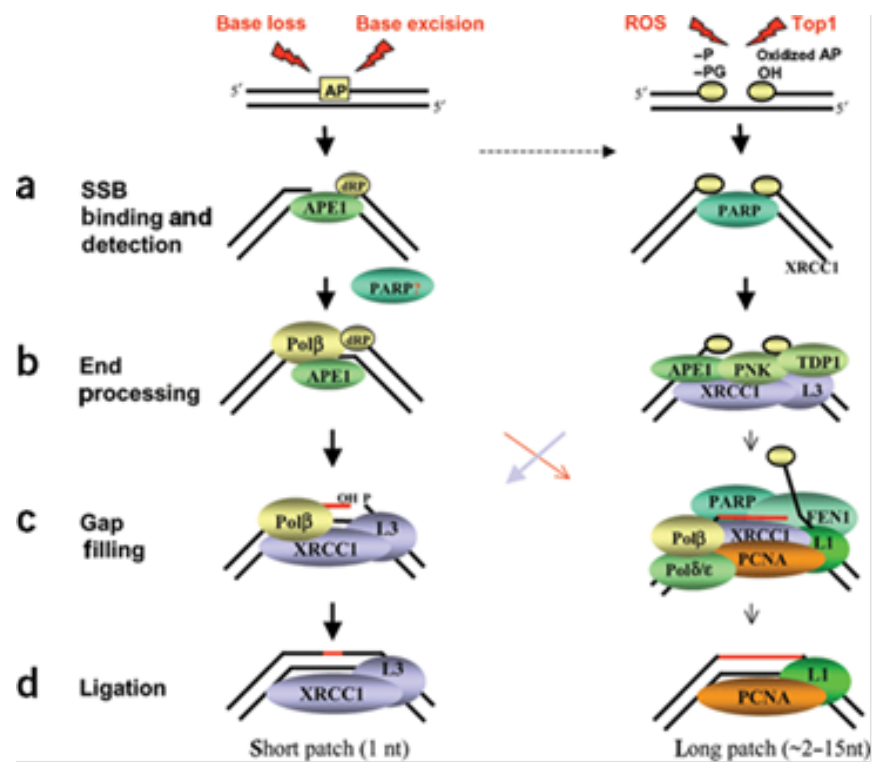


Εικόνα 3.5. Λειτουργίες της PARP-1 (A) Αποσύνθεση και σταθεροποίηση των πρωτεϊνών, (B) PARθάνατος, (C) Υποβοηθητική δράση στην κατασκευή κυστιδίων, (D) Δομή της χρωματίνης, (E) Απόκριση σε βλάβες του DNA.

3.3.1 Μοριακές λειτουργίες – Επιδιόρθωση DNA

Η PARP-1 περιγράφεται ως μια από τις πρώτες κυτταρικές απαντήσεις στη βλάβη του DNA και συσχετίζεται με τρία επιδιορθωτικά μονοπάτια: στην επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (Base Excision Repair; BER), στην επιδιόρθωση μονόκλωνου θραύσματος – θραύσεων μίας αλυσίδας DNA- (Single Strand Break Repair; SSBR) και στην επιδιόρθωση δίκλωνων

θραυσμάτων - θραύσεων διπλής αλυσίδας, δηλ, και των δύο κλώνων του DNA- (Double Strand Breaks; DSB) [132] (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Συμμετοχή της PARP-1 στα δύο μονοπάτια της BER επιδιόρθωσης. Παρατηρούμε στο μονοπάτι επιδιόρθωσης μεγάλης έκτασης τη δράση της PARP-1 ως πρωτεΐνη σήμανσης και ως συμμετέχουσα στο σύμπλοκο επιδιόρθωσης.

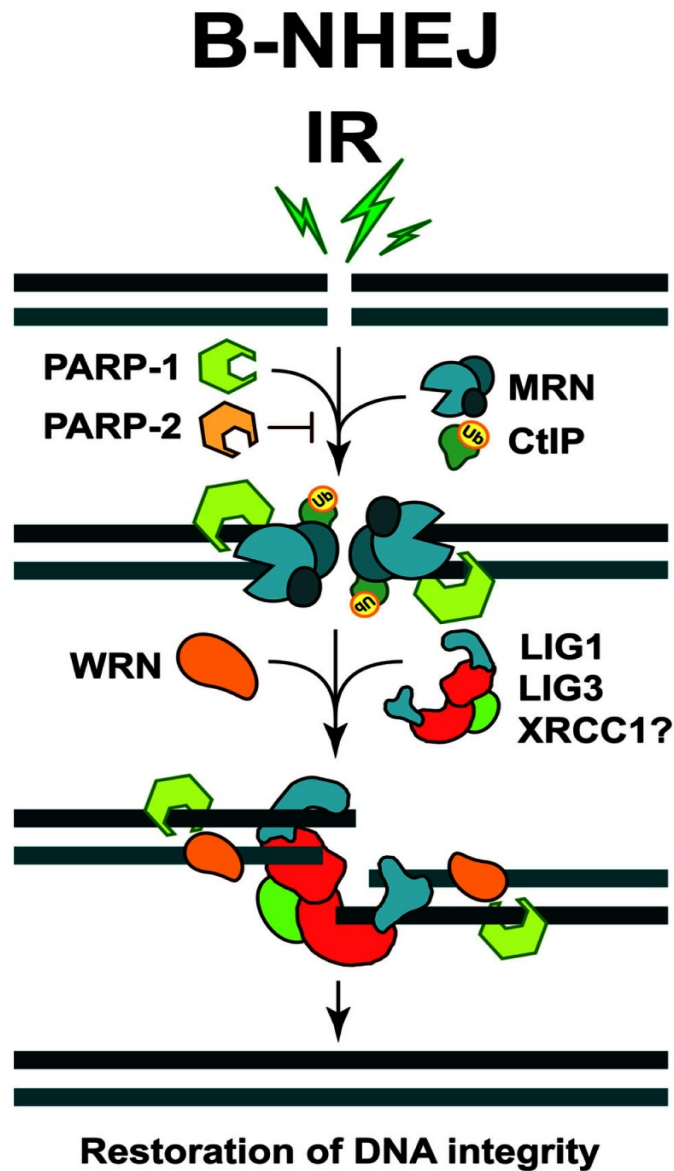
Πρόσφατες μελέτες διαπιστώνουν την λειτουργία της PARP-1 ως ρυθμιστή της ικανότητας του κυττάρου να επιδιορθώνει τις μονόκλωνες θραύσεις κατά την ύπαρξη αυξημένης βλάβης του DNA. Η PARP-1 προσδένεται στα SSB και έχει διπλό ρόλο. Αφενός, προστατεύει τον κλώνο του DNA από καταστροφές που προκαλούνται από το κυτταρικό περιβάλλον και, αφετέρου, προσελκύει πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις διαδικασίες επιδιόρθωσης, όπως οι XRCC1, pol β, DNA λιγάση III και FEN -1, μέσω των μοτίβων τους που βοηθούν την πρόσδεση PARs (PAR-binding motifs; PBMs), ενώ αποσυνδέεται μετά τη δημιουργία του πρωτεϊνικού συμπλόκου. Αυτοί οι ρόλοι είναι επιπλέον αλληλοσυνδεόμενοι, με τις αλληλεπιδράσεις των XRCC1/DNA-SSB που σταθεροποιούνται από την XRCC1 να ρυθμίζουν αρνητικά τη δραστηριότητα της PARP-1 και έτσι να προστατεύονται τα άκρα του DNA από την PARP-1 σε περιπτώσεις ανεπιθύμητου ανασυνδυασμού. Σε φυσιολογικές συνθήκες η

PARP-1 δεν είναι απαραίτητη, εφόσον ποντίκια στα οποία το γονίδιο της έχει απενεργοποιηθεί, και παρόλο που παρουσιάζουν γενετική αστάθεια, είναι υγιή. Όταν όμως η καταστροφή του DNA είναι πιο εκτεταταμένη από αυτή των ενδογενών επιπέδων, ξεπερνώντας τα επίπεδα στα οποία λειτουργούν διαφορετικά ένζυμα επιδιόρθωσης, η *PARP-1* αποκτά ιδιαίτερη σημασία για την ανταπόκριση του οργανισμού [133].

Επιπλέον, ο πρόσφατος χαρακτηρισμός της λειτουργίας της *PARP-2*, προσφέρει κάποια στοιχεία ως προς τη συνέργεια των ενζύμων. Η *PARP-2* ομοδιμερίζεται και ετεροδιμερίζεται με την *PARP-1* ενώ αλληλεπιδρά εξίσου καλά με τις XRCC1, $\rho\text{ol } \beta$ και τη DNA λιγάση III. Ακόμα, η *PARP-2* ίσως να συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία επιδιόρθωσης, αφού κύτταρα *PARP-2*^{-/-} που έχουν επωαστεί με τον καρκινικό παράγοντα N-νιτροζο-N-μέθυλο-ουρία παρουσιάζουν αργή επανασύνδεση του DNA, όμοια με αυτή των *PARP-1*^{-/-} κυττάρων. Ίσως οι δύο πρωτεΐνες να δρουν παράλληλα κατά την BER και να αλληλοσυμπληρώνουν η μία την απουσία της άλλης. Για να αποδειχτεί περαιτέρω η λειτουργική τους σύνδεση, οι Menissier de Murcia *et al.* [134] δοκίμασαν να μεγαλώσουν διπλά μεταλλαγμένα ποντίκια *PARP-1*^{-/-}*PARP-2*^{-/-} με διασταύρωση *PARP-1*^{-/-} και *PARP-2*^{+/-} στελεχών. Δεν προέκυψαν όμως διπλά ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα. Βρέθηκε ότι η ανάπτυξή τους διακόπηκε κατά τη φάση E8.0 των εμβρύων, όπου υπάρχει ραγδαία αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και ταυτόχρονα σοβαρή πιθανότητα βλάβης του γενετικού υλικού. Φαίνεται ότι η καταλυτική ενεργότητα του ετεροδιμερούς είναι απαραίτητη για την ομαλή πορεία της εμβρυακής φάσης της ζωής [134–137]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα κύτταρα των θηλαστικών, υπάρχουν επίσης δύο κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης των DSBs. Αυτά είναι η επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό (Homologous Recombination; HR) και η επιδιόρθωση με μη ομόλογο ανασυνδυασμό- μη ομόλογη ένωση ελεύθερων άκρων (Non-Homologous Recombination ή Non-Homologous End Joining; NHEJ). Το μονοπάτι που επιλέγεται για την επιδιόρθωση ενός DSB, εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στην G1 χρησιμοποιούν κυρίως τον NHEJ, ενώ τα διαιρούμενα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν HR ανάμεσα στις αδερφές χρωματίδες τους. Έχει παρατηρηθεί ότι σε κύτταρα εμβρυικών ινοβλαστών από ποντίκια (Mice Embryonic Fibroblasts; MEFs) με απενεργοποιημένο το γονίδιο της *PARP-1*, προκαλείται φαινότυπος υψηλού ανασυνδυασμού με αύξηση του ρυθμού της αυθόρμητης ανταλλαγής μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange; SCE) και της συγκρότησης

μικροπυρηνίσκων, δείχνοντας έτσι την αύξηση των περιπτώσεων DSBs. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τον ρόλο της *PARP-1* στον NHEJ έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Είναι γνωστό ότι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον NHEJ όπως η Ku 70 και οι DNA- εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (DNA-PKcs), μπορούν να πολύ-ADP-ριβοζυλιωθούν από την *PARP-1* αλλά και ότι η *PARP-1* φωσφορυλιώνεται από τη DNA-PK, προτείνοντας ένα μοντέλο αλλοστερικής ρύθμισης στη δράση της *PARP-1* στο NHEJ [138]. Έχει βρεθεί όμως ότι δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική αλλαγή στο ρυθμό επιδιόρθωσης DSBs ανάμεσα σε στελέχη *PARP-1*^{+/+} και *PARP-1*^{-/-} της κυτταρικής σειράς 3T3. Παράλληλα, έχει αποδειχτεί ότι μεταλλαγμένα στελέχη με βλάβες σε κύρια μόρια του NHEJ έχουν τη δυνατότητα να προχωρήσουν, σε μικρότερο βαθμό, σε τέτοιου είδους επιδιόρθωση. Προτείνεται λοιπόν ότι η *PARP-1*, η *PARP-2* και πρωτεΐνες της BER όπως η XRCC1 και η DNA λιγάση III, εμπλέκονται σε ένα εναλλακτικό μονοπάτι NHEJ (B- NHEJ) διαφορετικό από το εξαρτώμενο από το DNA- PK μονοπάτι (D-NHEJ) που χρησιμοποιεί τις Artemis και PNK για την επεξεργασία ακραίων θραυσμάτων, την οικογένεια πολυμερασών X που προάγουν τη συνοχή του συμπλέγματος, την XRCC4-DNA λιγάση IV για σύνδεση των κομμένων άκρων και τον μεταγραφικό παράγοντα XLF/Cernunnos [139] (Εικόνα 3.7).

Η *PARP-1* δεν έχει αναγνωριστεί ως πρωτεύον μόριο στον HR. Είναι πιθανό ότι η απώλεια της δραστηριότητας της *PARP-1* οδηγεί σε αύξηση των βλαβών που σχετίζονται με τον ανασυνδυασμό παρά ότι εμπλέκεται η ίδια σε αυτόν. Σε κύτταρα που έχουν απενεργοποιημένο το μονοπάτι του HR άρα και της δράσης της *PARP-1*, όπως κύτταρα BRCA^{-/-}, έχουν αυξημένες πιθανότητες θνησιμότητας και παρουσιάζουν περισσότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, γεγονός που υποστηρίζει την ιδέα αύξησης των DSBs, απουσία της *PARP-1* [135, 140, 141].



Εικόνα 3.7. Το προτεινόμενο εναλλακτικό μονοπάτι μη ομόλογου ανασυνδυασμού [142].

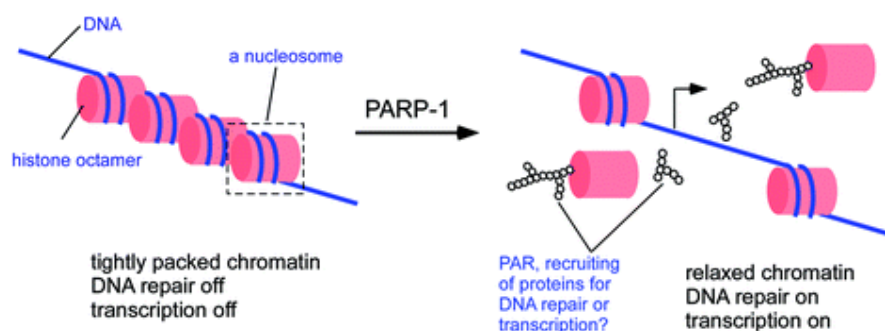
3.3.1.α Ο ρόλος της *PARP-1* ως αισθητήρας εγκοπών

Η απάντηση σε DNA βλάβη, εντοπίζεται ως ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την ενεργοποίηση των οδών και ενζύμων επιδιόρθωσης, καθώς και αλλαγές στη μεταγραφή και εκκίνηση διαδικασιών κυτταρικής θανάτωσης (απόπτωση). Η ταχεία ενεργοποίηση της *PARP-1* σε περιπτώσεις θραύσης της αλυσίδας του DNA, ίσως καταλήγει στην πολύ ADP-ριβοζυλίωση ενζύμων-μεταβιβαστών σήματος.

Έχει πράγματι βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης ATM (ataxia-telangiectasia mutated protein; ATM) που είναι ένα σηματοδοτικό μόριο, του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, και της *PARP-1*. Ποντίκια με φαινότυπο ATM^{-/-} παρουσιάζουν στον εγκέφαλο μειωμένα επίπεδα NAD⁺, τα οποία δικαιολογούνται από την αύξηση της ενεργοποίησης της *PARP-1* λόγω της σταθεροποίησης των DNA θραυσμάτων. Η σχέση μεταξύ p53 και *PARP-1* φαίνεται σε *PARP-1*^{-/-} MEFs, όπου τα επίπεδα της p53 είναι ιδιαίτερα μειωμένα. Έτσι, η *PARP-1* μελετάται όχι μόνο ως αισθητήρας εγκοπών, αλλά και η ίδια ως μεταγωγέας σήματος μεταγραφής και κυτταρικού θανάτου λόγω της δυνατότητας να ρυθμίζει κυτταρικές διαδικασίες απευθείας μέσω της καταλυτικής της λειτουργίας [141]

3.3.1.β Τροποποίηση της δομής της χρωματίνης και ρύθμιση της μεταγραφής

Η *PARP-1* δεσμευόμενη στη χρωματίνη, αλλάζει τη δομή των νουκλεοσωμάτων, τη σύνθεση ή και τη συμπύκνωσή της. (Εικόνα 3.8). Η πρόσδεση στα νουκλεοσώματα γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει αλληλεπίδραση με το DNA και τις ιστόνες πάνω ή κοντά στον άξονα της δυάδας του νουκλεοσώματος, όπου το DNA προσέρχεται και απομακρύνεται από αυτό. Επιπλέον, η *PARP-1* μπορεί να αλληλεπιδράσει με ποικιλία πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τη χρωματίνη, συμπεριλαμβανομένων εξαρτημάτων της μεταγραφικής μηχανής, προσδέτες DNA συγκεκριμένων ακολουθιών, ενζύμων που μεταβάλλουν τη χρωματίνη και εκδόχων ιστονών [143].



Εικόνα 3.8. Επίδραση της πολύ ADP-ριβοζυλίωσης στη δομή της χρωματίνης.

Η *PARP-1* ρυθμίζει τη μεταγραφή με σύνδεσή της κυρίως σε υποκινητές γονιδίων και συσχετίζεται με λειτουργίες όπως η σύνδεση της DNA pol II, η γονιδιακή έκφραση και η

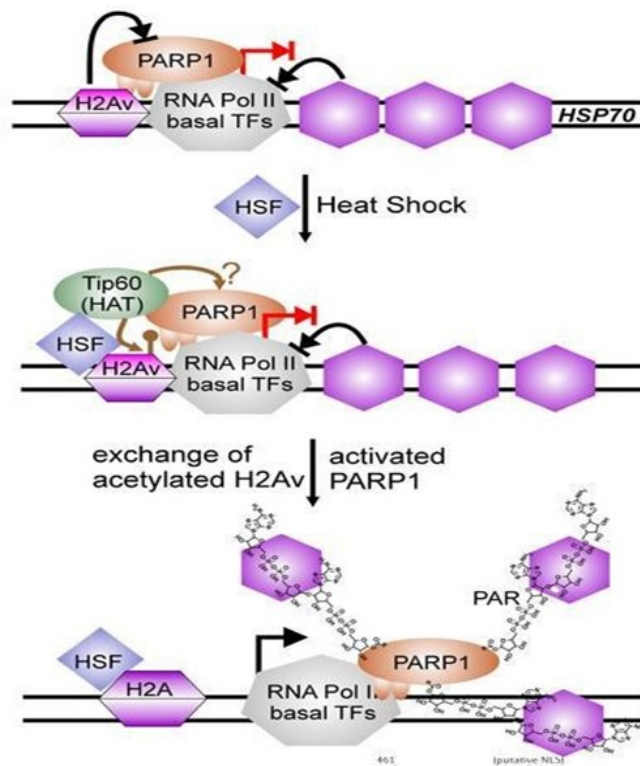
υπόσταση/ δημιουργία της ιστόνης H3K4me3 (H3 lysine 4 trimethylation), δηλαδή ενός μεθυλιωμένου εκδόχου της ιστόνης H3 που βρίσκεται σε ενεργούς υποκινητές. Σύνδεση της *PARP-1* έχει παρατηρηθεί και σε ενισχυτές γονιδίων με ιδιότητα επαγωγής ή αναστολής της ενίσχυσης. Η ταχύτατη αναδιανομή της *PARP-1* σε περιπτώσεις θραύσης του DNA και η μετακίνησή της σε τέτοιες θέσεις, ίσως εξηγεί την συνολική μείωση στην μεταγραφή του DNA που παρατηρείται σε απόκριση βλάβης [144, 145]. Σε αυτές τις καταστάσεις, η ανασταλτική δράση της *PARP-1* στη μεταγραφή οδηγεί πιθανά σε παύση του κυτταρικού κύκλου ώστε είναι δυνατή η επιδιόρθωση του DNA. Άρση της αναστολής δύναται να ενεργοποιεί τη γονιδιακή μεταγραφή, με επαγωγή προς επιδιόρθωση, απόπτωση ή έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η παύση του κυτταρικού κύκλου μπορεί να γίνει μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της pRb από τη Cdk ή μέσω συσσώρευσης της p53 [146].

Οι H1 και H2B θεωρείται ότι επηρεάζονται περισσότερο από την πολύ-ADP-ριβοζυλίωση *in vivo*, από το σύνολο των ιστονών [144]. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι η πολύ-ADP-ριβοζυλίωση αυτών των μορίων επιφέρει αποσυμπίεση στην χρωματινική δομή. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια PAR, συνδεδεμένα με πρωτεΐνες ή ελεύθερα στο πυρηνόπλασμα, μπορούν να λειτουργήσουν σαν μήτρα συγκέντρωσης ιστονών που έχουν απομακρυνθεί από αποσταθεροποιημένα νουκλεοσώματα. Η σύνδεση ιστονών-PAR εκθέτει περισσότερο το DNA απελευθερώνοντας το χώρο γύρω από την αλυσίδα ώστε να εκκινήσουν οι γενωμικές διαδικασίες. Παρόλο που το μήκος των αλυσίδων PAR είναι μικρότερο από αυτό που εντοπίζεται σε σημεία που απαιτούν επιδιόρθωση, φαίνεται να είναι επαρκώς επιμήκη και άφθονα για την τοπική αποσυναρμολόγηση της δομής της χρωματίνης. Αυτός ο γενικός μηχανισμός, επαυξάνει την μετατροπή μη-ιστονών, όπως δομικές πρωτεΐνες (π.χ. HMG proteins) και μεταγραφικών παραγόντων [133, 146, 147].

Η *PARP-1* όμως ενδέχεται να λειτουργεί διαφορετικά, έχοντας και αντίστροφα αποτελέσματα ως προς τη δομή της χρωματίνης. Σε απουσία κυτταρικού NAD⁺, η *PARP-1* προσδένεται στα νουκλεοσώματα και συμμετέχει στην συμπίεση της χρωματίνης φέρνοντας κοντά γειτνιάζοντα νουκλεοσώματα. Η αύξηση των επιπέδων NAD⁺ προκαλεί την PARυλίωση της *PARP-1* και τα αποτελέσματα της συμπίεσης αντιστρέφονται ολοκληρωτικά [148]. Σχεδόν σε κάθε υποκινητή μεταγραφικά ενεργού γονιδίου, εντοπίζεται *PARP-1*, προωθώντας με ετερογενείς τρόπους τη μεταγραφή. Φαίνεται να αποτρέπει την σύνδεση της ιστόνης H1

(μιας δομικής πρωτεΐνης του νουκλεοσώματος που καταστέλλει τη μεταγραφή) σε νουκλεοτίδια των υποκινητών. Επιπλέον PARυλιώνει την πρωτεΐνη DEK, άλλη μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με καταστολή της μεταγραφής, προκαλώντας την απομάκρυνση της από τη χρωματίνη. Εντούτοις, η πραγματική ρυθμιστική δράση της *PARP-1* αφορά μόνο ένα υποσύνολο των προσδεδεμένων με αυτήν γονιδίων [144]. Εμφανώς λοιπόν, διάφοροι μηχανισμοί προστίθενται και αποτελούν την εξαιρετικά σύνθετη διαδικασία μεταγραφικής ρύθμισης από την *PARP-1*. Εν αρχή, η *PARP-1* λειτουργεί ως συνήθης ρυθμιστής, χρησιμοποιώντας διάφορους παράγοντες της μεταγραφής εξαρτώμενους από την αλληλουχία του DNA και σηματοδοτικά μόρια. Δρα ακόμα απευθείας ως παράγοντας που προσδένεται σε ενισχυτή, όπως επίσης ρυθμίζοντας την δράση μονωτών ή παραγόντων που προσδένονται σε μονωτές όπως ο CTCF (Transcriptional repressor CTCF, aka 11-zinc finger protein aka CCCTC-binding factor). Σε περιπτώσεις συρρυθμιστικής επίδρασης της *PARP-1* με άλλα μόρια, μπορεί να λειτουργήσει ως το τελικό μόριο σε σηματοδοτικές οδούς, με σκοπό την ανταλλαγή κατασταλτικών παραγόντων με διεγερτικούς στο σύμπλοκο μεταγραφής του υποκινητή. Σε κάποιες περιπτώσεις η ενζυμική δραστηριότητα της *PARP-1* είναι αναγκαία (π.χ. με τις HES1, Elk1) ενώ με άλλες όχι (NF-κB, RAR). Μία ενδιαφέρουσα οπτική ως προς τη χρήση της *PARP-1* έχει προταθεί από τους Ju et al. σύμφωνα με την οποία, διασπάσεις του DNA παραμερίζουν τυχόν τοπολογικά φράγματα και επιτρέπουν θετικές δομικές αλλαγές για την έναρξη λειτουργίας του υποκινητή. Δεν έχει αποδειχτεί όμως κάτι πάνω σε αυτό το μοντέλο. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η δροσόφιλα έχει χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη της *PARP-1* ως προς τη δομή της χρωματίνης και τη μεταγραφή, καθώς παρουσιάζονται μόνο δύο γονίδια *PARP*: Ένα που μοιάζει στην *PARP-1* με τρεις ισομορφές (*dPARP*) κι ένα που μοιάζει στις *PARP-5α,β* δηλαδή στις τανκυράσες (Εικόνα 3.9). Σε προνύμφες δροσόφιλας, καταστολή της δράσης των *PARP* ή αποδιοργάνωση του γονιδίου της *dPARP* οδήγησε σε: αναστολή της συσσώρευσης PAR, αποσυμπίεση της χρωματίνης και επαγωγή της μεταγραφής σε περιοχές της χρωματίνης που περιέχουν υψηλά επαγώγιμα γονίδια όπως η εκδυσόνη και αυτά που ρυθμίζονται από θερμικό σοκ [149]. Στην περίπτωση των γονιδίων της οικογένειας Hsp 70, που αποτελείται από πρωτεΐνες γρήγορα αποκρινόμενες σε θερμικό σοκ, η *dPARP* απαιτείται για την αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωμάτων σε όλο το γονίδιο ανεξάρτητα της μεταγραφής του. Η αποσυναρμολόγηση μάλιστα λαμβάνει χώρα σε 30'', ταχύτερα από το χρόνο που απαιτεί η Pol II για την μεταγραφή. Το μοντέλο αυτό

προτείνει έναν διαφορετικό τρόπο λειτουργίας, ρύθμισης κι έκθεσης γονιδίων που χρειάζονται άμεσα ως απόκριση σε στρες. Η dPARP ακόμα απενεργοποιεί την πρωτεΐνη ISWI, μια ATP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη της δροσόφιλας που αναδιαμορφώνει τα νουκλεοσώματα, μετά από PARυλίωση των νουκλεοσωμάτων του γονιδίου της (Εικόνα 3.9). Παρατηρήθηκε επίσης συσχέτιση της dPARP στη δομή της ετεροχρωματίνης. Τα παραπάνω παραδείγματα προτείνουν νέους τρόπους προσέγγισης της δράσης της *PARP-1*, στηρίζοντας ταυτόχρονα την λειτουργική εξελικτικά διατήρηση του μορίου σε διαφορετικούς οργανισμούς [149].

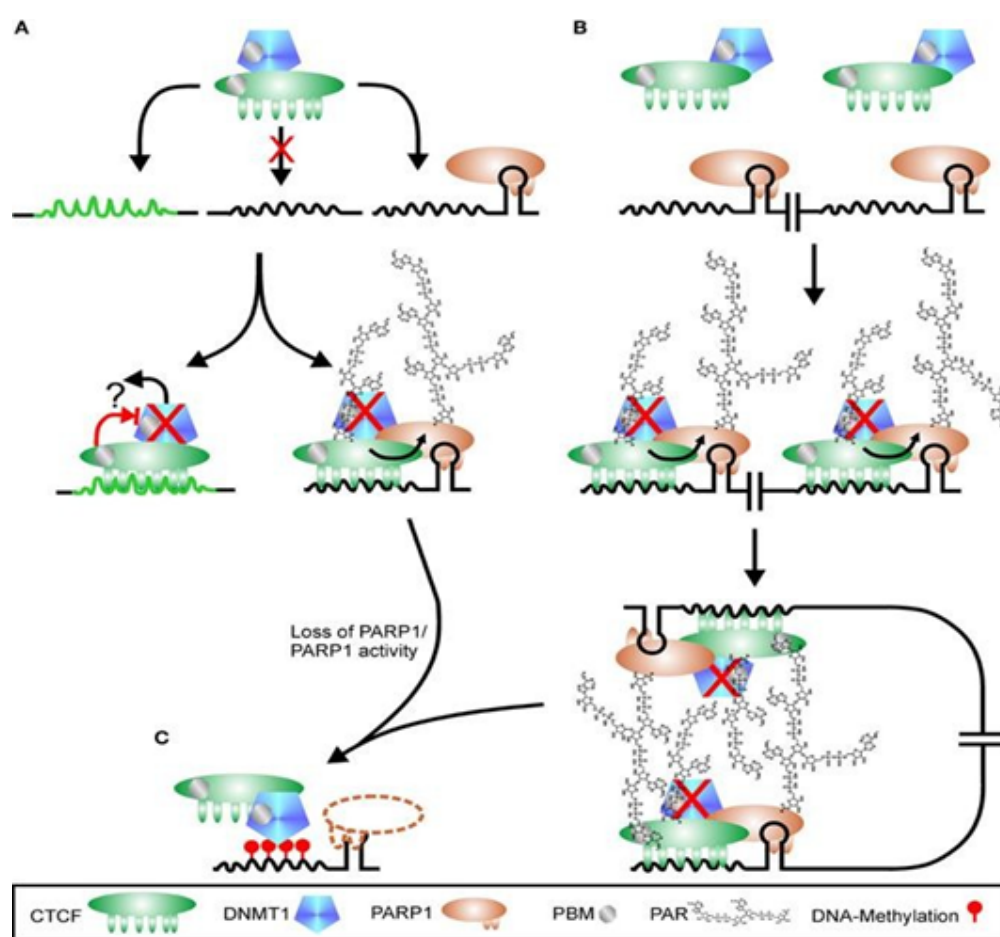


Εικόνα 3.9. Αλληλεπίδραση της *PARP-1* και της ιστόνης *H2Av* στη ρύθμιση του γονιδίου *HSP70* της *Drosophila* [150].

3.3.1.γ Επιγενετικές ρυθμίσεις- μεθυλίωση του DNA

Η *PARP-1* συνδέεται με την μεθυλίωση στο DNA, ένα σταθερό επιγενετικό σήμα που μπορεί να διαιωνιστεί στα θυγατρικά κύτταρα μετά τη μίτωση και σχετίζεται με την αποσιώπηση της γενετικής έκφρασης. Η ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNA methyltransferase; *DNMT1*) καθώς και η απευθείας ρύθμιση της ενεργότητας της

πρωτεΐνης της, αποτελούν βασικούς τρόπους επιρροής της *PARP-1* στη μεθυλίωση. Η *PARP-1* προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου και προστατεύει από μεθυλίωση, επάγοντας την ενεργοποίηση της *Dnmt1* (Εικόνα 3.10)[150]. Αντίθετα, υπερέκφραση μιας γλυκοϋδρολάσης αποσύνθεσης των PARs, επάγει η αποσιώπησή της και μη φυσιολογική μεθυλίωση του υποκινητή σε μία νησίδα CpG, προκαλώντας τελικά αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου. Απώλεια έκφρασης του *Dnmt1* προκαλεί υπομεθυλίωση όλου του γενωμικού DNA. Ακόμα, οι αλυσίδες PAR μπορεί να συνδεθούν με την πρωτεΐνη, αναστέλλοντας την λειτουργία μεθυλοτρανσφεράσης. Η διαδικασία αυτή υπόκειται πιθανώς σε αλλοστερικό ρυθμιστικό μηχανισμό [129].



Εικόνα 3.10. Μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA, της *PARP-1*, της *Dnmt1* και του *CTCF*. (Α) ενεργοποίηση *PARP-1* και ταυτόχρονη καταστολή *Dnmt1*/λειτουργία *CTCF*, που καταλήγει σε υπομεθυλίωση του DNA, (Β) ενεργοποίηση της *PARP-1* καταλήγοντας σε τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, (C) καταστολή της *PARP-1* που καταλήγει σε μεθυλίωση του DNA από το σύμπλεγμα *Dnmt1*/*CTCF* [150].

3.3.2 Κυτταρικές λειτουργίες

3.3.2.α Ρύθμιση σταθερότητας των πρωτεϊνών

Η πολυ-ADP-ριβοζυλίωση κατά τις μελέτες των PARP, εμφάνισε έναν απρόσμενο ρόλο στην ρύθμιση των πρωτεϊνών μέσω της λειτουργίας της πρωτεϊνικής αποσύνθεσης. Συγκεκριμένα, η *PARP-1* και οι τανκυράσες 1 και 2 συνδέονται με το μονοπάτι της αποσύνθεσης πρωτεϊνών. Έτσι, σε περίπτωση καταστροφής στο DNA, η *PARP-1* μέσω αυτοτροποποίησης άγει την ουβικουιτίνωσή της από την Iduna πρωτεΐνη (ή RNF146) και την αποσύνθεσή της στο πρωτεάσωμα σε επόμενο στάδιο. Παρόμοια αποτελέσματα έχει και η PARυλίωση της αξίνης από τις τανκυράσες στο μονοπάτι σηματοδότησης της Wnt. Η Iduna προσδένεται σε PARs ποικίλου μήκους και οδηγεί στην ουβικουιτίνωση των υποστρωμάτων τους [151]. Οι τανκυράσες σημαδεύουν τα υποστρώματα με αλυσίδες PAR λίγων καταλοίπων ADPrs, ενώ η *PARP-1* με αλυσίδες πολλών. Η διαφοροποίηση αυτή ίσως καταδεικνύει την ύπαρξη πολλών σημείων ελέγχου της λειτουργίας της Iduna. Η δράση της πρωτεΐνης εντοπίζεται παρουσία του παράγοντα MNNG (N-μέθυλο-N-νίτρο-N-νιτροσογουανιδίνη) και μετά από έκθεση σε ακτίνες-γ, όπου προωθεί την κυτταρική επιβίωση. Επιπλέον, εμπλέκεται ως ρυθμιστής σε μία διαδικασία κυτταρικού θανάτου που θα περιγραφεί παρακάτω [152].

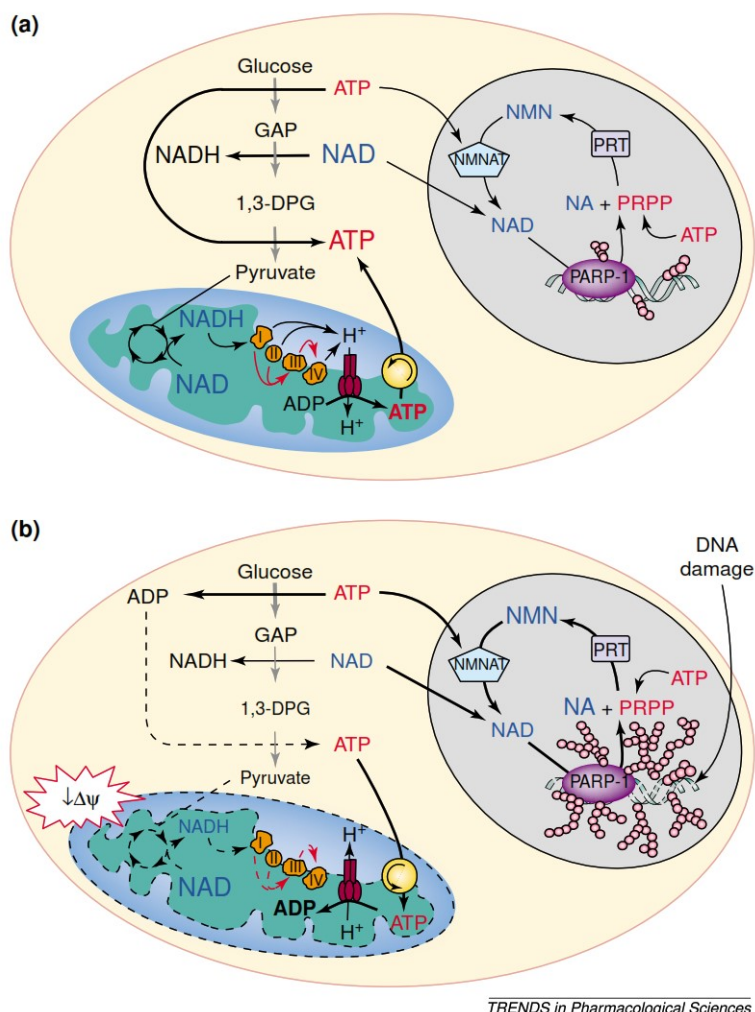
3.3.2.β Κυτταρικός θάνατος – PARθάνατος

Με τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου έγινε φανερός και ο ρόλος της *PARP-1* σε αυτόν. Έτσι, έλλειψη ή καταστολή της δράσης της *PARP-1* προωθεί εμμέσως την κυτταρική δυσλειτουργικότητα, καθώς επιτρέπει τη μη επιδιόρθωση των θραύσεων του DNA και συμβάλλει στη αδυναμία του κυττάρου να επιβιώσει ή έστω να λειτουργεί φυσιολογικά σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή. Παρατηρήθηκαν δε σε μελέτες ευεργετικά αποτελέσματα από αναστολείς της *PARP-1*, πιθανώς λόγω της έλλειψης των αρνητικών επιδράσεων της υπερδραστηριότητας του ενζύμου, που όταν το κύτταρο θα τύγχανε υπό κυτταροτοξικό στρες, θα οδηγούσε σε λύση του κυττάρου. Τέτοια παραδείγματα θεραπευτικών δράσεων εμφανίστηκαν σε πειραματικά μοντέλα διαβήτη, φλεγμονών, ενδοτοξικού σοκ και νευρωνικού θανάτου [153].

Πράγματι σε *in vitro* πειράματα, δείχθηκε ότι υπερ-ενεργοποίηση της *PARP-1* καταναλώνει

τα αποθέματα του κυττάρου σε NAD^+ σε ελάχιστα λεπτά, προκαλώντας σημαντική καταστροφή στο DNA. Συγκεκριμένα, η παρεμπόδιση της γλυκόλυσης και της μιτοχονδριακής αναπνοής, των πιο κρίσιμων δηλαδή NAD^+ -εξαρτώμενων οδών, προκαλούν μείωση του ATP (απαιτούνται 4 ATP μόρια προς σύνθεση ενός μορίου NAD^+) και επομένως σε κυτταρική αδυναμία [154]. Τα μιτοχόνδρια είναι τα πρώτα που βάλλονται από την έλλειψη ATP και ακολουθούν κυτταρόπλασμα και πυρήνας, ενώ η μείωση ενισχύεται από τα ένζυμα πυροφωσφορική φωσφοριβόζυλο-συνθετάση (PRPP synthetase) και νικοτινάμιδο-(μονο)νουκλεοτιδική αδενυλοτρανσφεράση (nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase) [155]. Ως κυτταρική αντίδραση προς αναπλήρωση των επιπέδων του NAD^+ , τα προαναφερόμενα ένζυμα καταναλώνουν επιπλέον ATP, δηλαδή τις ενεργειακές «αποθήκες», οδηγώντας σε έναν θανατηφόρο φαύλο κύκλο. Το μονοπάτι αυτό έχει περιγραφεί από τον Berger ως «**υπόθεση αυτοκτονίας**» («suicide hypothesis») και αποτελεί κύριο γεγονός «ολίσθησης» σε νεκρωτικό θάνατο του κυττάρου (Εικόνα 3.11) [156]. Η συντήρηση ενός ενζύμου με τέτοιες δυνατότητες φαίνεται να αναπτύχθηκε ως εξελικτικό πλεονέκτημα με σκοπό την αδυναμία επιβίωσης κυττάρων με μεγάλη καταστροφή του DNA.

Έχει προταθεί επίσης ότι τα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου κινάσης-φωσφατάσης, όπως το μονοπάτι των MAP κινασών, αλληλεπιδρούν με την σηματοδότηση μέσω PAR. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον παράγοντα κυτταρικής θανάτωσης που χρησιμοποιείται, αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να είναι διαφορεικής σημασίας, συμβάλλοντας σημαντικά στην πολυπλοκότητα των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου στους οποίους εμπλέκεται η *PARP-1*. Επιπλέον, *in vivo* και *in vitro* μελέτες επιβεβαιώνουν την «υπόθεσης αυτοκτονίας». Για παράδειγμα όταν κυτταρικά στελέχη *PARP-1*-/- ινοβλαστών εκτεθούν σε παράγοντες που προκαλούν καταστροφή του DNA, η εξάντληση των αποθεμάτων NAD^+ είναι ίδια με αυτή των *PARP-1*+/+ κυττάρων [156, 157].



TRENDS in Pharmacological Sciences

Εικόνα 3.11 Αναπαράσταση του μοντέλου αυτοκτονίας [158].

Παρομοίως, σε κύτταρα με βλάβη στο DNA, οι αναστολείς της *PARP-1* δεν οδηγούν κατ' ανάγκη σε μείωση του ATP ή του NAD⁺. Η διατήρηση των επιπέδων NAD⁺ μπορεί να εξηγείται από τη δυνατότητα λήψης του μορίου από τον εξωκυττάριο χώρο όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπρόσθετα έχει αποδειχτεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ATP από PARs, κάτι που υποστηρίζει την θεωρία ότι τα PARs μπορούν να λειτουργήσουν ως προμηθευτές ενέργειας. Άλλες μελέτες πάλι δείχνουν ότι κύτταρα με γονοτοξικό στρες και σε συνθήκες υπερέκφρασης της *PARP-1*, καταλήγουν σε κυτταρικό θάνατο με μηχανισμούς ανεξάρτητους των ATP ή NAD⁺ [153].

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι σε πειραματόζωα στα οποία πραγματοποιήθηκε επαναιμάτωση, όταν η *PARP-1* θα έπρεπε να είναι υπερενεργοποιημένη, τα περιεχόμενα σε NAD⁺ δεν ήταν

μειωμένα. Έχει παρατηρηθεί μάλιστα ότι σε περιπτώσεις αιμορραγικού σοκ και χρόνιας κολίτιδας, η αναστολή της *PARP-1* μειώνει την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος [159]. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η «υπόθεση αυτοκτονίας» ισχύει υπό προϋποθέσεις: τη συνολική ρήξη του DNA, την έντονη ενεργοποίηση της *PARP-1* και την απουσία αναστολέων.

PARθάνατος (Parthanatos – Κυτταρικός θάνατος εξαρτώμενος από την PARP-1)

Σύγχρονες μελέτες με χρήση τεχνικών πρωτεομικής, ρίχνουν κι άλλο φως στη διαδικασία της ενεργειακής κατάρρευσης του κυττάρου. Βρέθηκε ότι η παρεμπόδιση της γλυκόλυσης προκαλείται από σύνδεση του PAR με το PBM της εξωκινάσης 1 (hexokinase 1; HK1), η οποία απενεργοποιείται. Φυσιολογική δράση της HK1 είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης κατά το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης. Για την πραγματοποίηση αυτού, η HK1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης VDAC. Παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης από αλυσίδες PAR οδηγούν στην μείωση του ρυθμού της γλυκόλυσης. Αντίθετα αναστολή της *PARP-1* επανενεργοποιεί την HK1. Παραδόξως, παρόλο που η *PARP-1* εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα και η HK1 στο μιτοχόνδριο, η καταστολή αυτής συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα [160].

Η παραπάνω διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε συνθήκες γενοτοξικού στρες, αναγνωρίζεται ως κρίσιμο γεγονός στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, μόλις τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκαν τα PARs ως σηματοδότες εναλλακτικού μονοπατιού κυτταρικού θανάτου, εμπλεκόμενα στον εξαρτώμενο από τον παράγοντα επαγωγής απόπτωσης (Apoptosis Inducing Factor; AIF) θάνατο.

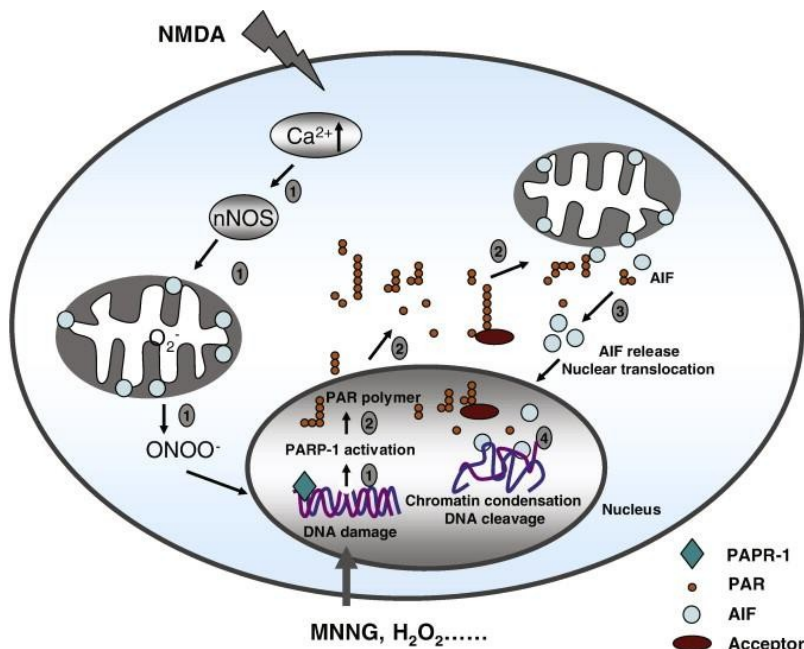
Ο AIF είναι μία φλαβοπρωτεΐνη που αποσυνθέτει τη χρωματίνη σε μεγάλα θραύσματα μεγέθους περίπου 50kb και ενεργοποιεί ενδονουκλεάσες οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Αρχικά, ο AIF θεωρούταν ως συστατικό της αποπτωτικής μηχανής και ότι απελευθερωνόταν μαζί με προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες από τον διαμεμβρανικό χώρο του μιτοχονδρίου[161]. Η υπόθεση αυτή διαψεύστηκε όταν αποκαλύφθηκε η σύνδεση PARs-AIF κατά την προσπάθεια σύνδεσης μεταξύ της ενεργότητας της *PARP-1* σε καταστάσεις γενοτοξικού στρες και την μετατόπιση της AIF από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι μόρια PAR μετακινούνται κατά την αντίστροφη κατεύθυνση και

δρουν ως παράγοντας απελευθέρωσης AIF. Μάλιστα η αυξημένη συγκέντρωση, η πολυπλοκότητα και το μεγαλύτερο μέγεθος και των πολυμερών σχετίζονται με εκτενέστερη απελευθέρωση του παράγοντα από τα μιτοχόνδρια.

Ο κυτταρικός θάνατος μέσω σήμανσης από PARs ονομάστηκε PARθάνατος (Parthanatos) (Εικόνα 3.12). Νευρικού τύπου κύτταρα ήταν τα πρώτα που παρατηρήθηκαν να υφίστανται τέτοιου τύπου θάνατο, λόγω τοξικότητας από υπερδιέγερση (υπερ-ενεργοποίηση) από νευροδιαβιβαστές, όμως παρατηρήθηκε αργότερα και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, όταν η βλάβη του DNA προκαλούταν από συγκεκριμένους γονοτοξικούς παράγοντες [162].

Το γονίδιο του AIF μεταγράφεται στον πυρήνα, ενώ η βάρους 62kDa πρωτεΐνη μεταφέρεται στον διαμεμβρανικό χώρο της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του N-τελικού σήματος εντοπισμού που διαθέτει [163]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταχύτατη μετανάστευσή του, συντομότερα ακόμα και από αυτή του κυτοχρώματος, οδηγώντας μας στην υπόθεση ύπαρξης διαφορετικού μηχανισμού απελευθέρωσης [164]. Κατά τη μελέτη του φαινομένου, διαπιστώθηκε ότι το PBM μοτίβο που περιέχεται στον AIF είναι απαραίτητο για την ενεργοποίησή του [165]. Με αυτό δεδομένο, σχεδιάστηκαν μόρια που εμπόδισαν την αλληλεπίδραση PAR-AIF και έδρασαν είτε ως αναστολείς του PARθανάτου, είτε ως επαγωγείς απελευθέρωσης AIF σε χημειοθεραπευτικές μεθόδους. Παρατηρήθηκε ακόμα σχέση μεταξύ του PARθανάτου και της ανταγωνιστικής πρωτεΐνης Iduna. Όπως σχολιάστηκε παραπάνω, η καταλυτική δράση της Iduna εντοπίζεται στην ικανότητά του να προσδένεται σε πρωτεΐνες παρουσία μορίων PARs: Η Iduna προσδένεται πάνω στα μόρια PAR αποτρέποντας την μετακίνησή τους στο μιτοχόνδριο και την επαγωγή του PARθανάτου [151].

Συνοψίζοντας, το μονοπάτι σηματοδότησης των PARs εκτός του πυρήνα δρα από τη μια πλευρά ως παράγοντας απελευθέρωσης AIF και από την άλλη ως ενεργοποιητής της Iduna. Ως αναστολέας PARθανάτου αναγνωρίστηκε και η πολύ-ADP-ριβόζυλο-γλυκοϋδρολάση (Poly(ADP-ribose) glycohydrolase; PARG) που αποσυνθέτει τις αλυσίδες PAR [166]. Η δράση της πρωτεΐνης αυτής θα συζητηθεί παρακάτω.



Εικόνα 3.12. PARθάνατος [163]

Η διαδικασία του PARθανάτου μπορεί να διαφέρει από το «μοντέλο αυτοκτονίας» αλλά δεν είναι ανεξάρτητη του NAD⁺. Φαίνεται ότι η απουσία NAD⁺ και ταυτόχρονη αύξηση της *PARP-1*, οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ αναπλήρωση των αποθεμάτων την αποκαθιστά, εμποδίζοντας την απελευθέρωση του AIF. Ο PARθάνατος επομένως προϋποθέτει την εξάντληση των αποθεμάτων NAD⁺ πριν τη αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης [167] .

Σε κάθε περίπτωση, ο μηχανισμός δράσης και ρύθμισης του PARθανάτου δεν έχει εξακριβωθεί. Αυτό που οδηγεί σε θάνατο του κυττάρου τελικά, είναι η μετακίνηση του AIF στον πυρήνα και όχι η έλλειψή του από τα μιτοχόνδρια. Η μετανάστευση του AIF έχει παρατηρηθεί σε νευρωνικά κύτταρα, σε πειραματικά μοντέλα της ασθένειας του Parkinson, σε περιπτώσεις διεγερσιμοτοξικότητας, σε περιγεννητική υποξία-ισχαιμία, σε εγκεφαλικά τραύματα και σε ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια [168]

Τα κύτταρα που νεκρώνονται μέσω του μονοπατιού του PARθανάτου και αυτά που υφίστανται απόπτωση εμφανίζουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά όπως: απελευθέρωση φωσφατιδυλοσερίνης, απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, αποσύνθεση της χρωματίνης και συρρίκνωση. Εν τούτοις, στον parθάνατο, που η

ενεργοποίησή του είναι ανεξάρτητη της δράσης κασπασών, διασπάται η κυτταρική μεμβράνη, ακολουθούμενη από εκτεταμένη καταστροφή του DNA (περίπου 50kDa), αντίθετα από τις αποπτωτικές οδούς του κυτταρικού θανάτου. Έτσι, ο παρθάνατος θεωρείται πλέον μονοπάτι προγραμματισμένης νέκρωσης.

3.3.2.γ Απόπτωση – Ρυθμιζόμενη νέκρωση (Νεκρόπτωση)

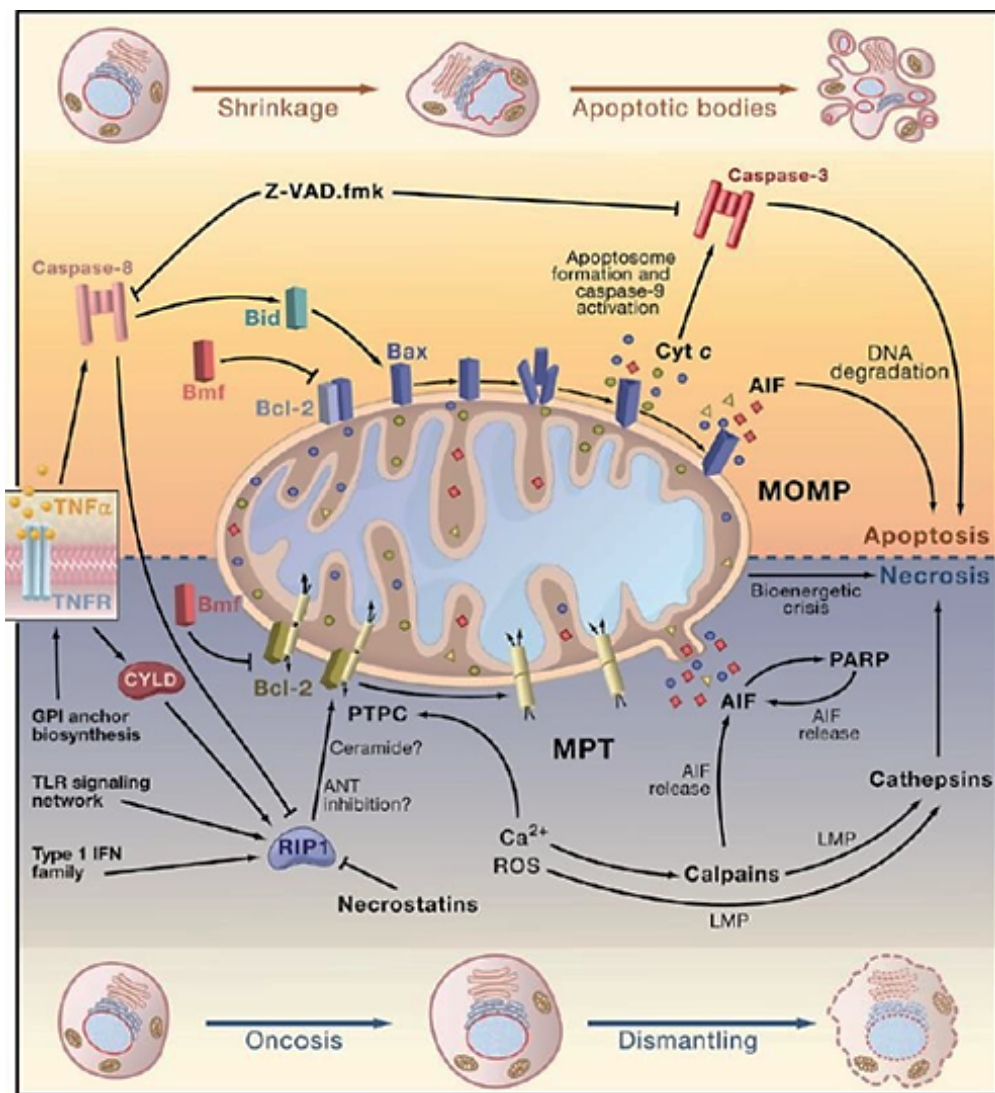
Η νέκρωση θεωρούνταν αρχικά ως μια διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο τερμάτιζε πρόωρα και απότομα τη λειτουργία του, εξαιτίας αντίξων συνθηκών του εξωκυττάριου χώρου που προκύπτουν από βακτηριακή μόλυνση, τοξίνες ή μηχανική καταπόνηση. Κατάληξη αυτής είναι η διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων στο εξωκυττάριο περιβάλλον κατά έναν μη ρυθμιζόμενο τρόπο ο οποίος δεν επιδέχεται φαρμακολογικές ή γενετικές επιδράσεις. Η νέκρωση λογιζόταν ως αντίθετη της απόπτωσης, δηλαδή της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Όταν όμως οι Virag *et al.* απέδειξαν ότι κύτταρα εκτεθειμένα σε ROS/RNS οδηγούνται σε υπερενεργοποίηση της *PARP-1* και κατά τα φαινόμενα περισσότερο σε νεκρωτικά παρά σε αποπτωτικά αποτελέσματα, η άποψη αυτή άλλαξε. Ήταν η πρώτη φορά που ένας ρυθμιζόμενος κυτταρικός θάνατος μπορεί να είχε χαρακτηριστικά νέκρωσης. Η ρυθμιζόμενη νέκρωση ονομάστηκε **νεκρόπτωση** [169].

Η επίδραση στο εξωκυττάριο περιβάλλον αποτελεί και τη βασική διαφορά των δύο διαδικασιών. Στη νέκρωση (ή νεκρόπτωση), ο κυτταρικός θάνατος συνεπάγεται απελευθέρωση του ενδοκυττάριου περιεχομένου και πιθανή πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης. Αντίθετα, τα αποπτωτικά κύτταρα συγκροτούνται σε αποπτωτικά σωματίδια που διατηρούν τη λειτουργικότητα των οργανιδίων που περιέχουν αλλά και της κυτταρικής μεμβράνης, στη συνέχεια όμως επιδρά η φαγοκύττωση. Η φαγοκύττωση επιταχύνεται από μοριακά σήματα που εκπέμπονται από τα αποπτωτικά κύτταρα [170]

Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η νέκρωση μπορεί να είναι ένα ρυθμιζόμενο μονοπάτι. Νεκρωτικά κύτταρα συμβάλλουν στην εμβρυική ανάπτυξη αλλά και στη ομοιόσταση ώριμων ιστών, νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος επάγεται από συνδέτες υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης ενώ η νέκρωση ρυθμίζεται από γενετικούς, επιγενετικούς και φαρμακολογικούς παράγοντες. Επιπλέον, αναστολή των κασπασών οδήγησε τα κύτταρα

από το αποπτωτικό μονοπάτι σε ανάμεικτα αποπτωτικά-νεκρωτικά ή και πλήρως νεκρωτικά αποτελέσματα. Ο κυτταρικός θάνατος είναι επομένως αποτέλεσμα συρρύθμισης των δύο μορφών ενώ η νέκρωση εμφανίζεται σε περιπτώσεις που απαραίτητοι παράγοντες του αποπτωτικού μηχανισμού δεν λειτουργούν [169]. Οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται ως ρυθμιστές σε μονοπάτια νεκρόπτωσης είναι οι RIP1 κινάση σερίνης/θρεονίνης και η Κυκλοφιλίνη D μέσω του κοινού τους μονοπατιού και η *PARP-1* μέσω του PARθανάτου. Η πρωτεολυτική δράση της κασπάσης 8 και της κασπάσης 3 στις RIP1 και *PARP-1* ίσως να αποτελούν κύριους μοριακούς διακόπτες επιλογής των δύο μονοπατιών (Εικόνα 3.13). Η δυνατότητα επιλογής τύπου κυτταρικού θανάτου με χρήση αναστολέων ή ενισχυτών προς όφελος της απόπτωσης, είναι ένα σημείο έρευνας που θα μπορούσε να οδηγήσει στην αποφυγή φλεγμονών και σε μείωση δευτερογενούς τραυματισμού των ιστών. Αντίθετα, καρκινικοί τύποι με κάποια αντίσταση στον αποπτωτικό μηχανισμό θα μπορούσαν να υποστούν νέκρωση. Τέλος, καλό θα είναι σε παθολογικές καταστάσεις να μελετάται και με ποιον τρόπο προήλθε ο κυτταρικός θάνατος, καθώς η παράλληλη λειτουργία των δύο μονοπατιών ίσως δίνει ερμηνείες που στο παρελθόν είχαν απορριφθεί [171].

Η συμμετοχή της *PARP-1* σε αποπτωτικά μονοπάτια είναι μικρή αλλά σημαντική. Κύριο χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η δημιουργία θραυσμάτων DNA. Λόγω της επιδιορθωτικής της δράσης, η *PARP-1* αποτυπώνεται ως αντι-αποπτωτικό μόριο. Έτσι τα αποπτωτικά κύτταρα προωθούν την αδρανοποίηση της καταλυτικής δράσης της *PARP-1* με την συστράτευση της κασπάσης 3 και της πρωτεολυτικής της δράσης, διασπώντας την πρώτη σε 2 τμήματα, ένα 25kDa N-τελικό θραύσμα που εμπεριέχει τον DBD και ένα 85kDa που διατηρεί τη βασική ενζυματική λειτουργία αλλά δεν προσδένεται στο DNA και δε λειτουργεί προς όφελος της επιδιόρθωσης. Ταυτόχρονα, τα μόρια ATP που απαιτούνται δεν σπαταλούνται προς όφελος μιας μάταιης προσπάθειας επιδιόρθωσης ενώ ξεκινάει η αποσύνθεση της χρωματίνης με τη δράση ενδονουκλεασών. Ο κεντρικός ρόλος που έχει η *PARP-1* στην επιδιόρθωση και την επιβίωση του κυττάρου γίνεται πιο εμφανής από το γεγονός ότι το κύτταρο κατέστησε απαραίτητη την διακοπή της λειτουργίας της σε αποπτωτικά μονοπάτια (Εικόνα 3.13) [172]



Εικόνα 3.13 Διαφορετικά μονοπάτια απόπτωσης- προγραμματισμένης νέκρωσης [169].

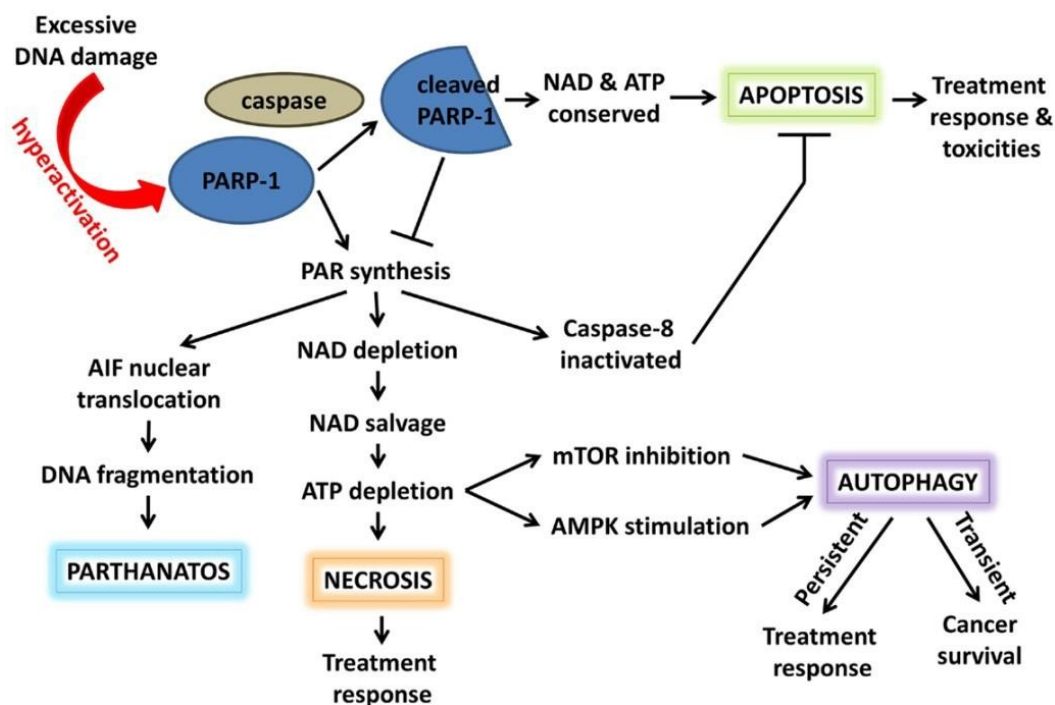
3.3.2.6 Αυτοφαγία

Μελέτες δείχνουν την *PARP-1* να βρίσκεται στο επίκεντρο της ρύθμισής της. Η μακροαυτοφαγία (αναφερόμενη απλά ως αυτοφαγία) είναι ένα ομοιοστατικό μονοπάτι κατανάλωσης των κυτταρικών περιεχομένων από το ίδιο το κύτταρο και αποτελεί ιδιαίτερα συντηρημένη τακτική εντός των ευακρωτικών οργανισμών. Η διαδικασία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα λυσοσώματα [173]. Τα κυτταρικά περιεχόμενα εγκλωπώνονται σε κυστίδια διπλής μεμβράνης, τα οποία καλούνται αυτοφαγοσώματα, και αποσυντίθενται από λυσοσωμικές υδrolάσες. Το μονοπάτι αυτοφαγικής αποσύνθεσης ευθύνεται για την παρουσία πρωτεϊνών που δρουν για μεγάλη χρονική περίοδο, για την «απόσυρση» των μη

λειτουργικών οργανιδίων και την εκκαθάριση αδρανών πρωτεϊνών. Αντίθετα από την καταστροφή των πρωτεϊνών, που λαμβάνει χώρα στο πρωτεάσωμα, σκοπός της αυτοφαγίας είναι η ανακύκλωση των περιεχομένων, κυρίως σε περιπτώσεις κυτταρικής «πείνας» (έλλειψης ενέργειας), ώστε να διατηρηθεί το δυναμικό του κυττάρου σε ATP. Άλλες περιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί αυτοφαγία, είναι υπό συνθήκες υποξίας, εμφάνισης ROS, εναλλαγής pH, σε βλάβες του DNA, σε παρουσία ενδοκυττάρων παθογόνων ή και σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [174]. Η αυτοφαγία ακόμα, συνδέεται με διάφορες διαδικασίες ρύθμισης της πρόσληψης θρεπτικών, του κυτταρικού κύκλου, των μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, του ελέγχου της αύξησης, συγκεκριμένων αποφάσεων κυτταρικής διαφοροποίησης, του ενδιάμεσου μεταβολισμού και της ανάπτυξης του ιστού. Συχνά η αυτοφαγία καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο. Αναφέρεται ως κυτταρικός θάνατος τύπου II ενώ, η απόπτωση ως κυτταρικός θάνατος τύπου I (Εικόνα 3.14). Χαρακτηριστική διαφορά των δύο είναι ότι τα αποπτωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν τα λυσοσώματα φαγοκυττάρων για την αποσύνθεση των πρωτεϊνών, ενώ τα αυτοφαγικά χρησιμοποιούν τα ενδογενή. Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο αν η αυτοφαγία καθεαυτή οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ή εάν είναι δευτερογενές αποτέλεσμα της αποπτωτικής μηχανής [175].

Η αυτοφαγία συμβαίνει παράλληλα με την κυτταρική επιδιόρθωση και τον ρυθμιζόμενο κυτταρικό θάνατο. Σε μελέτες έγινε χρήση του παράγοντα δοξορουμπικίνη, ο οποίος επάγει την αυτοφαγία, προωθεί τις βλάβες του DNA άρα και την υπερέκφραση της *PARP-1*. Παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μέσω πρωτεϊνών-χιμαιρών GFP-LC3 σε καλλιέργειες κυττάρων διαγονιδιακών ποντικών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία του παραπάνω παράγοντα, η δημιουργία αυτοφαγικών κυστιδίων και η αύξηση της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενα με την αυτοφαγία (BNIP3, Cathepsin B και L, Beclin1). Σε *PARP-1*^{-/-} κυτταρικές σειρές εν τούτοις, αυτά απουσίαζαν. Η έλλειψη αυτοφαγικών χαρακτηριστικών σε κύτταρα με ανεπάρκεια *PARP-1* ή αναστολή των PARP γενικότερα, οφείλεται στην πρόληψη εξάντλησης των ATP και NAD⁺ καθώς και στην ενεργοποίηση του κύριου κυτταρικού ρυθμιστή της αυτοφαγίας, του mTOR. Η αναστολή της αυτοφαγίας οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο, προτείνοντας έτσι τον προστατευτικό ρόλο της PARP, στην επαγόμενη από τη δοξορουμπικίνη αυτοφαγία. Παράλληλα, για την εξακρίβωση της κασπασο-ανεξάρτητης δράσης της *PARP-1* στην αυτοφαγία, κυτταρικές σειρές

αναπτύχθηκαν παρουσία του αναστολέα κασπασών Z-VAD (Z-Val-Ala-DL-Asp-CH₂F). Η δράση της δοξορουμπικίνης παρέμεινε ίδια [175, 176].



Εικόνα 3.14. Συγκεντρωτικό σχήμα επιρροών της PARP σε διάφορες διαδικασίες κυτταρικού θανάτου [177].

Στα θηλαστικά, ο mTOR είναι κεντρικής σημασίας στη σηματοδότηση θρεπτικών και παραγόντων αύξησης και πιστεύεται ότι διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην απόφαση του κυττάρου να προβεί σε αυτοφαγία. Ο mTOR ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από την κινάση p70s6. Έχει αποδειχθεί ότι σε κύτταρα άγριου τύπου υπό δοξορουμπικίνη, δεν υπήρξε ενεργοποίηση του mTOR. Απουσία της *PARP-1* και μετά από κατεργασία με δοξορουμπικίνη, ο mTOR βρέθηκε ενεργοποιημένος. Ο ρυθμιστικός ρόλος της *PARP-1*, ενδεχομένως να βρίσκεται λοιπόν στη ρύθμιση της δράσης της κινάσης ή κάποιας ανώτερης διαδικασίας αυτής [175, 176].

3.3.2.ε *PARP-1* και κυτταρικός κύκλος

Η *PARP-1* αλλά και άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των PARP (*PARP-3*, *v-PARP* ή *PARP-4*, τανκυράσες 1,2) σχετίζονται κι ελέγχουν τη λειτουργία της μιτωτικής συσκευής, συμπεριλαμβανομένων των κεντρομερών, των κεντροσωμάτων και της μιτωτικής ατράκτου

[131]. Συγκεκριμένα, η δομή και η λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου εξαρτάται από την ύπαρξη μορίων PAR. Υπεύθυνη για την ύπαρξη αυτών είναι πιθανόν η τανκυράση 1 (PARP-5α), καθώς έλλειψη αυτής οδηγεί σε μη κανονική κατανομή χρωμοσωμάτων και μορφολογία της ατράκτου. Ο ρόλος της *PARP-1* και ίσως της *PARP-2*, έχει να κάνει με την σταθερότητα των χρωμοσωμάτων και τον εντοπισμό των μιτωτικών κεντρομερών, ώστε να συνδεθούν οι μικροσωληνίσκοι στους κινητοχώρους και να κατασκευαστεί η μιτωτική άτρακτος. Χρώση των PAR που είχαν απομονωθεί από σωματικά κύτταρα και αυγά του είδους *Xenopus*, επέδειξε ότι συνεντοπίζονται με μικροσωληνίσκους της ατράκτου και βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς κοντά στους πόλους και τους κινητοχώρους. Επιπλέον, ο εντοπισμός μορίων PARP και PARG στη μιτωτική συσκευή, προτείνει ότι η δυναμική ρύθμιση του μεταβολισμού των PAR συμμετέχει ενεργά στον σχηματισμό της ατράκτου. Αντισώματα κατά των PAR ή της PARG οδήγησαν σε ταχεία διάσπαση της ατράκτου. Ο ακριβής ρυθμιστικός ρόλος των PAR παραμένει άγνωστος. Έχει προταθεί ότι χρησιμοποιούνται ως μόρια-σηματοδότες ή ως δομικό συστατικό και μήτρα της συνδεσμολογίας της ατράκτου [148].

Η *PARP-1* συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με τη συλλειτουργία της με άλλες πρωτεΐνες. Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 για παράδειγμα, ο οποίος ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και επάγοντας την απόπτωση (ενεργοποίηση του p53 προκαλεί αναστολή στη φάση G1 μέσω αλληλεπίδρασης με κυκλοεξαρτώμενες κινάσες CdKs, ενώ η απόπτωση ρυθμίζεται με την αλληλεπίδραση του p53 και των αποπτωτικών πρωτεϊνών BAX και του υποδοχέα Fas), εμφανίζει μειωμένα επίπεδα ενεργότητας σε κύτταρα με ελαττωμένη πολύ-ADP-ριβοζυλίωση. Τα κύτταρα αυτά είναι λιγότερο ευαίσθητα σε απόπτωση επαγόμενη από τον p53. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, έχει αναφερθεί ότι η πολύ ADP-ριβοζυλίωση είναι απαραίτητη για την έκφραση και την σταθερότητα του p53. Σε *PARP-1*-/- ινοβλάστες, η μειωμένη ενεργότητα της p53 αντικαθίσταται από υπερέκφραση της p73, του πρώτου ομολόγου της p53 που περιγράφηκε [178].

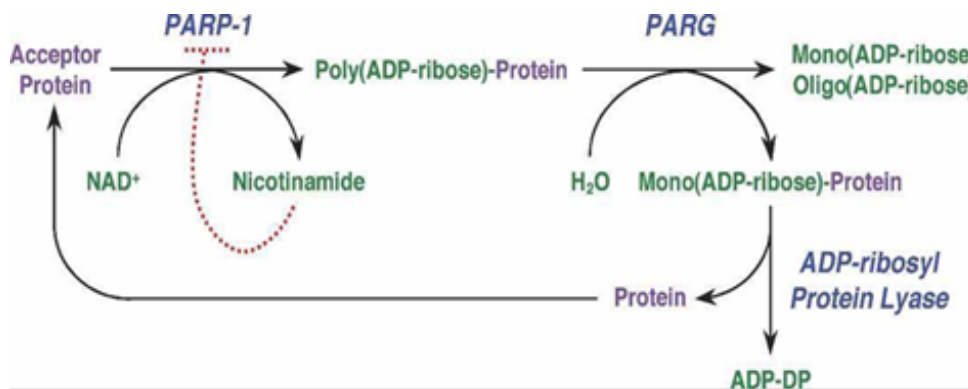
3.3.3 Βιοχημικές λειτουργίες

Παραπάνω συζητήθηκε η καταλυτική δράση της *PARP-1* και τα βιολογικά αποτελέσματα των διεργασιών αυτών. Στη συνέχεια αναλύονται οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

που δέχεται το μόριο της *PARP-1*, τα μοτίβα που διαθέτουν τα υποστρώματά της τα οποία αναγνωρίζει και αναπτύσσει τις αλυσίδες PAR, καθώς και ο καταβολισμός των προϊόντων της.

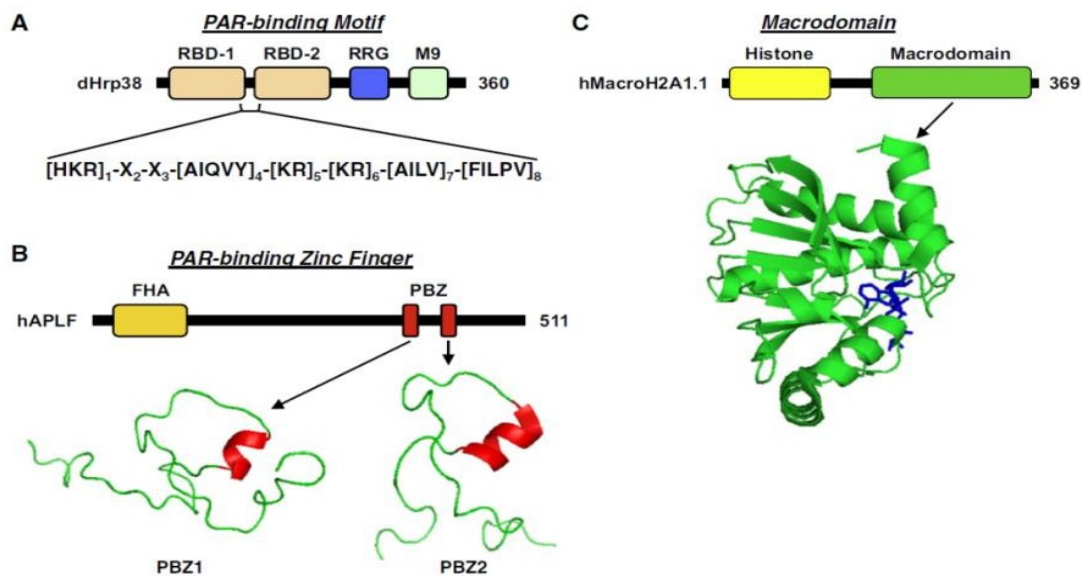
3.3.3.α Καταβολισμός των PAR από την PARG

Ο καταβολισμός των αλυσίδων PAR ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από την πολύ ADP-ριβόζη, ή αλλιώς PARG. Η PARG είναι ένα ένζυμο με λειτουργία εξω-γλυκοϋδρολάσης - και ενδογλυκοσιδικές λειτουργίες, με τις δεύτερες να υπερτερούν. Υδρολύει τους γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών ADPr, παράγοντας ελεύθερα μόρια (Εικόνα 3.15). Πρωτεΐνες PARG έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς όπως σε θηλαστικά, μύγες, δακτυλιοσκώληκες και φυτά. Διαθέτουν ένα καταλυτικό τομέα, έναν τομέα πυρηνικού εντοπισμού, μια σήμανση εξαγωγής από τον πυρήνα καθώς κι έναν ενδεχόμενο ρυθμιστικό τομέα. Ο καταλυτικός τομέας έχει υψηλό επίπεδο ομολογίας ανάμεσα στα είδη, ενώ οι υπόλοιποι δεν παρουσιάζουν κάποια αξιοσημείωτη ομοιότητα [131].



Εικόνα 3.15. Η θέση της PARG στον κύκλο αναβολισμού και καταβολισμού των PAR. Η PARG καταλύει την υδρόλυση των PAR παράγοντας μόνο ή όλιγο ADP- ριβόζες. Το τελευταίο μονομερές ADP-ριβόζης κόβεται από μια λύση απελευθερώνοντας ADP-DP [131].

Μοτίβα αναγνώρισης Έχουν αναγνωριστεί τρία μοτίβα ή τομείς που προσδένουν PAR. Βρίσκονται σε μία ποικιλία πρωτεϊνών που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA και τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης (Εικόνα 3.16).



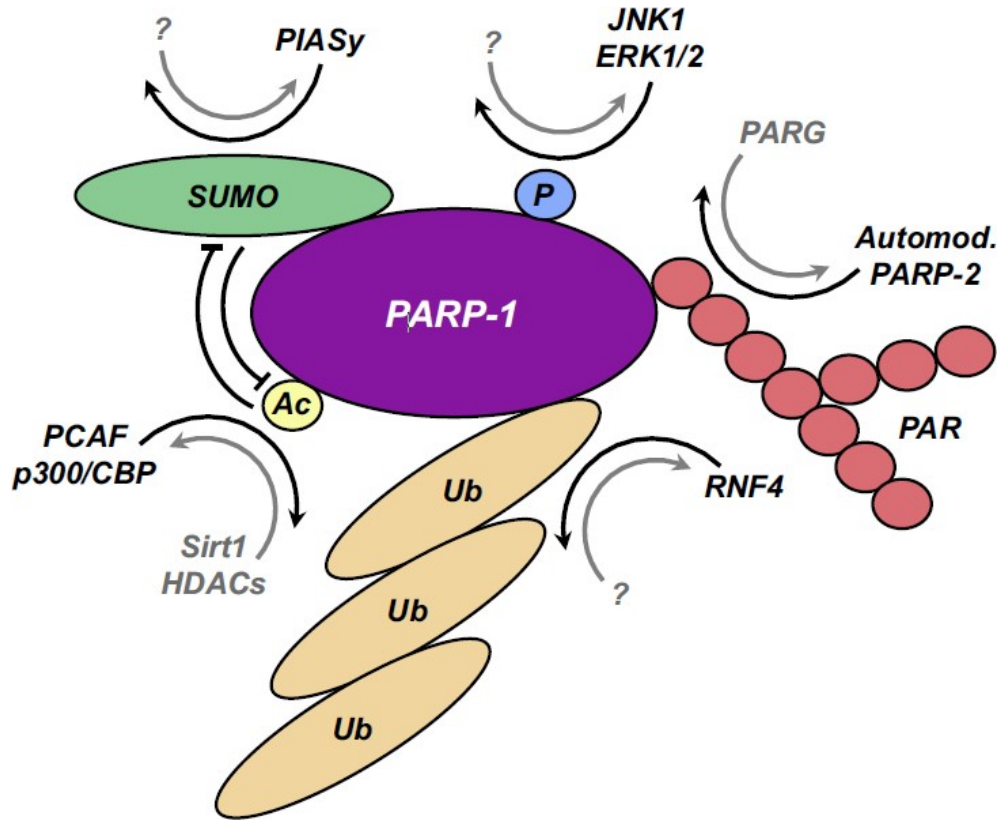
Εικόνα 3.16. Μοτίβα αναγνώρισης των PAR και μακροτομέας ιστόνης (macroH2A1.1) προσδεσμένο στην ADP-ριβόζη [129].

3.3.3.β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της *PARP-1*

PARυλίωση: η *PARP-1* PARυλιώνεται από την ίδια, την *PARP-2* και πιθανώς από άλλες PARP. Η αυτοPARυλίωση μπορεί να αφορά μεγάλες αλυσίδες >200 καταλοίπων αλλά και σε μικρότερες αλυσίδες έως 20 κατάλοιπα [179]. Υπερβολική αυτοPARυλίωση προκαλεί έλλειψη λειτουργικότητας και καταλυτικών ιδιοτήτων λόγω ανικανότητας πρόσδεσης στο DNA [180] (Εικόνα 3.17).

Φωσφορυλίωση/ακετυλίωση: Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν την *PARP-1* κυρίως, στις θέσεις σερίνης 372 και θρεονίνης 373, αλλά και η JNK σε απροσδιόριστες θέσεις. Η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 είναι απαραίτητη για τη μέγιστη ενεργοποίηση του ενζύμου σε περίπτωση βλάβης του DNA ενώ η τροποποίηση από JNK1 παρατείνει την ενεργοποίηση σε περίπτωση μη αποπτωτικού θανάτου που προκαλείται από H₂O₂ [181]. Η ακετυλίωση προκαλείται από τις ακετυλοτρανσφεράσες p300/CBP και PCAF, και αναστρέφεται από πλήθος απακετυλασών, όπως η Sirt1. Η ακετυλίωση σημειώθηκε πρώτη φορά κατά τη μελέτη του συμπλόκου NF-κB, το οποίο ελέγχει το μηχανισμό της μεταγραφής. Έχει παρατηρηθεί επίσης σε καρδιομυοκύτταρα ως απόκριση στο στρες, προάγοντας την ενεργοποίηση του ενζύμου [182]. Ακετυλίωση παρουσιάζει και η *PARP-2*.

Ουβικουιλίνωση και SUMΟλίωση: οι πρωτεΐνες SUMO είναι παρόμοιες με την ουβικουιλίνη ενώ η δράση τους κατευθύνεται από ένα μονοπάτι παρόμοιο με αυτό της ουβικουιλίνωσης. Σε αντίθεση με την ουβικουιλίνη όμως, οι SUMOs δεν χρησιμοποιούνται ως πρωτεΐνες σήμανσης για μετακίνηση σε πρωτεάσες και αποσύνθεση αλλά για την επαγωγή της πρωτεϊνικής σταθερότητας, της μεταφοράς από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και ως ρυθμιστές της μεταγραφής [183, 184].



Εικόνα 3.17. Τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της PARP-1: PARυλίωση, φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, SUMΟυλίωση, ουβικουιλίνωση [129].

3.4 Παθοφυσιολογία της PARP-1

Όλο και περισσότερες έρευνες προσπαθούν να συσχετίσουν με ποικίλους τρόπους τον τρόπο συμβολής της PARP-1 σε παθολογικές καταστάσεις παράλληλα με την κατανόηση της ρύθμισης στην οποία υπόκειται. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η PARP-1 συμμετέχει στην ανάπτυξη, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος, καθώς και στη γήρανση.

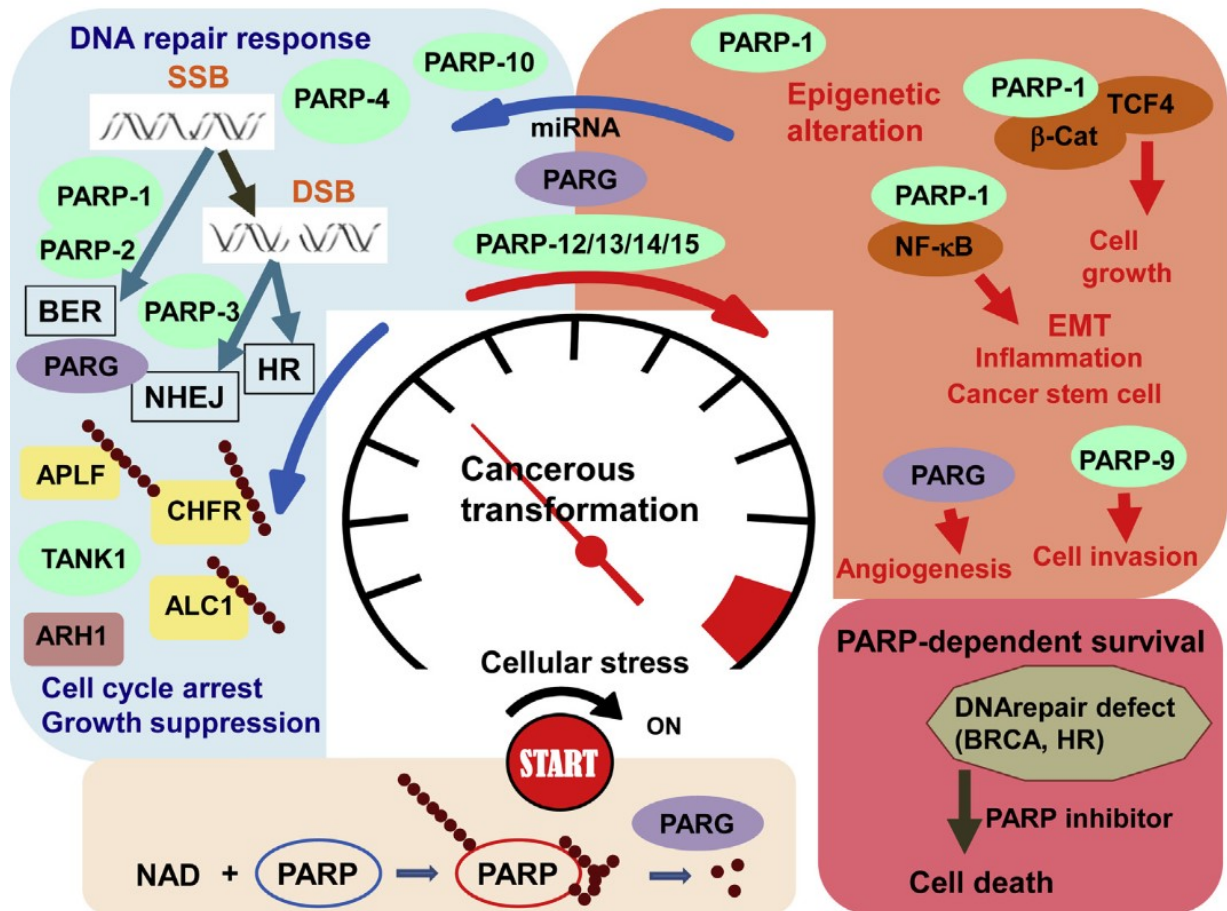
3.4.1 Καρκινογένεση

Η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία πολλών σταδίων και περιλαμβάνει εκτροπές από τη φυσιολογική λειτουργία σε μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του γονιδιώματος, της επιδιόρθωσης, του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Η PARυλίωση από την *PARP-1* και άλλα μόρια της υπεροικογένειας, εμπλέκεται σε όλες τις παραπάνω διεργασίες, γεγονός που καταδεικνύει την σχέση της *PARP-1* με την καρκινογένεση (Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.19). Τελευταία, έρευνες επικεντρώνονται στην εμπλοκή της PARP στη μεταγραφική και τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω RNA (RNA interference; RNAi), χωρίς αξιόλογα αποτελέσματα μέχρι στιγμής [185].

Διαγονιδιακά ποντίκια επωασμένα σε αλκυλιωτικούς παράγοντες, παρουσίασαν αύξηση των περιπτώσεων καρκίνων στο κόλον και στο ήπαρ σε σχέση με *PARP-1*^{+/+} ποντίκια. Τα περιστατικά δημιουργίας όγκων από βλάβες του DNA προκαλούμενες από άλλους παράγοντες όμως, δεν διέφεραν ανάμεσα στους δύο τύπους ποντικών. Η φύση της βλάβης του DNA επομένως, υπαγορεύει την συγκεκριμένη συμβολή της *PARP-1* στην πρόληψη του καρκίνου [131].

Η αποσιώπηση της *PARP-1* σε ποντίκια με σοβαρή συνδυαστική ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency; SCID), τα οποία διαθέτουν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της DNA-PK, εμφανίζουν δραματική αύξηση στις περιπτώσεις Τ-λεμφωμάτων. Όπως έχει αναφερθεί, η *PARP-1* συμμετέχει στη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση των DNA-PKcs σε περιπτώσεις επιδιόρθωσης. Η από κοινού έλλειψη των *PARP-1* και p53 έχει οδηγήσει σε διφορούμενα αποτελέσματα. Σε p53^{-/-} στελέχη ποντικών, η έλλειψη της *PARP-1* που έχει δημιουργηθεί με εξάλειψη του εξωνίου 2, οδήγησε σε επιταχυνόμενη δημιουργία όγκων, ενώ με εξάλειψη του εξωνίου 4, αυξάνεται η λανθάνουσα φάση της ανάπτυξης όγκων σε επίπεδα που είναι ίδια με τα ποντίκια που διαθέτουν κανονικά την *PARP-1* [186]. Ωστόσο, στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη εμφάνιση γενετικής αστάθειας, πιθανώς λόγω της αύξησης των κεντροσωμάτων, δείχνοντας τη συσχέτιση μεταξύ της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και της διατήρησης του γονιδιώματος. Τέλος, η *PARP-1* αλληλεπιδρά με την *PARP-2* και άλλους παράγοντες της γονιδιακής σταθερότητας, προλαβαίνοντας αυθόρμητες

δημιουργίες όγκων [187]. Η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στο DNA και την καρκινογένεση είναι δεδομένη. Όσον αφορά την *PARP-1*, μικρομοριακές συγκεντρώσεις αρσενίτη προσδένονται στα «δάκτυλα ψευδαργύρου» (zinc fingers) και παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου στην BER επιδιόρθωση. Ίδια επίδραση έχουν και ο αμίαντος (asbestos), οι εξωγενείς δραστικές ρίζες οξυγόνου και τα νιτρικά [188, 189].



Εικόνα 3.18. Συμμετοχή της PARυλίσωσης στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η PARυλίωση καταστέλλει την καρκινογένεση μέσω της επιδιόρθωσης του DNA και άλλων μηχανισμών ως απόκριση στις βλάβες του DNA και συνεπώς ρυθμίζει μονοπάτια που χρησιμεύουν ως καρκινικοί φραγμοί σε διάφορα στάδια. Από την άλλη πλευρά, οι PARPs υποστηρίζουν την διαδικασία της καρκινογένεσης με τη συμμετοχή τους στη μεταγραφή, την επιγενετική ρύθμιση και τους σηματοδοτικούς καταρράκτες. Εάν υπάρχει ογκογονίδιο, σε καρκινικά κύτταρα που επιβιώνουν με εξαρτώμενο από τις PARP τρόπο, ένας PARP αναστολέας μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση [185].

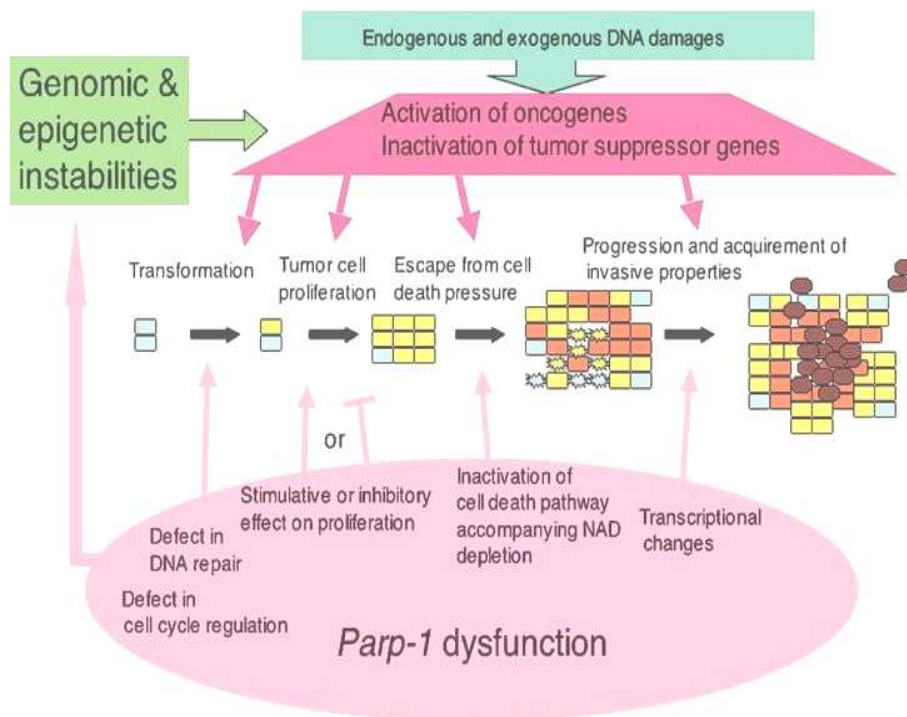
3.4.1.α Ρόλος της *PARP-1* στον καρκίνο των ωοθηκών

Τα γονίδια *BRCA1* και 2 είναι γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών [190]. Μεταλλάξεις σε αυτά μεταβάλλουν τον μηχανισμό επιδιόρθωσης των DSB του κυττάρου, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η ενεργότητα της ογκοπρωτεΐνης αναδόμησης της χρωματίνης ALC1, εξαρτάται από την αυτοτροποποίηση της *PARP-1*, καθώς χρειάζεται να πολύ-ADP-ριβοζυλιωθεί στον μακροτομέα της. Έλλειψη ή υπερέκφραση αυτής οδηγεί σε ευαισθητοποίηση του κυττάρου [191]. Προβλήματα της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου που εμπλέκουν την *PARP-1* έχουν επίσης καρκινογόνο δράση. Ο PARBP είναι παράγοντας που απαιτείται για διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 σε περιπτώσεις βλάβης του γενετικού υλικού. Σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος έχει παρατηρηθεί υπερέκφρασή του και αλληλεπίδραση με την *PARP-1*, έτσι ώστε επάγεται η λειτουργία της φάσης G1. Η πρωτεΐνη CHFR με δράση ουβικουιτινικής λιγάσης προσδένει PAR μέσω ενός δακτύλου ψευδαργύρου (Zinc finger), ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο κυρίως στη φάση M, ενώ ακολουθεί πρόσδεση στην *PARP-1* και τη σηματοδοτεί προς αποικοδόμηση [192]. Με αυτόν τον τρόπο, δεν υπάρχει αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Καρκινογένεση παρατηρείται και από επίδραση της μη φυσιολογικής PARP σε ανώτερα στάδια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 3.19). Για παράδειγμα, δεν ρυθμίζονται σημαντικά για την ογκογένεση γονίδια, όπως είναι το σύμπλεγμα β-κατενίνης-TCF4, του β-υποδοχέα ρετινικού οξέος και του NF-κΒ, όπου η *PARP-1* συμμετέχει ως συνενεργοποιητής-συγκатаστολέας [129].

Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται σημαντικός ογκογενετικός παράγοντας. Ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (senescence-associated secretory phenotype; SASP), συνοδεύεται με αύξηση της έκκρισης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και συνδέει δύο πολύ διακριτά γεγονότα καρκινικού στρες: τις βλάβες του DNA και τα φλεγμονώδη σήματα των προ-καρκινικών σταδίων. Η λιποπολυσακχαριδική προαγωγή των μακροφάγων ενεργοποιεί την *PARP-1*, η οποία με τη σειρά της δρα επί των ιστονών και διευκολύνει τη στρατολόγηση του NF-κΒ [187].

Η δράση της *PARP-1* αναδεικνύεται σε περιπτώσεις λευχαιμίας ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας. Νεοπλασίες τέτοιου τύπου οφείλονται πολύ συχνά σε ελαττωματικά μονοπάτια απόπτωσης, των οποίων η στοχοποίηση με χρήση αναστολέων της *PARP-1* και

με τη ρυθμιστική σχέση της τελευταίας με τις κασπάσες 3 και 7 να αποτελούν θέμα διερεύνησης. Η αυξημένη ποσότητα μεγάλου θραύσματος της *PARP-1* σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) σε σχέση με αυτήν από υγιείς δότες, καταδεικνύει το ρυθμιστικό μηχανισμό μεταξύ του αποπτωτικού μονοπατιού και της προσπάθειας επιδιόρθωσης του DNA ή της διαδικασίας νέκρωσης/νεκρόπτωσης [193, 194]. Τα αποτελέσματα της επίδρασης της *PARP-1* είναι δυσνόητα λόγω της πολυπλοκότητας του μορίου και της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας της παθοφυσιολογίας των νεοπλασματικών νοσημάτων του μυελού των οστών.



Εικόνα 3.19. Πιθανές επιπτώσεις μιας δυσλειτουργικής *PARP-1* κατά την πορεία της καρκινογένεσης.

3.4.2. Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι η πρώτη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε μόλυνση, ερεθισμό και άλλους τραυματισμούς. Χαρακτηρίζεται από την άμεση μετακίνηση συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος στην τοποθεσία του ερεθισμού και πραγματοποιείται με ταχεία παροχή αίματος και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα που μεταβαίνουν σε περιοχές φλεγμονής,

χαρακτηρίζονται από ενδογενή παραγωγή περοξυνιτρικών (ONOO⁻), μιας ασταθούς τοξίνης που προκαλεί θραύσεις στην αλυσίδα του DNA και μιτοχονδριακό τραυματισμό [195]. Η *PARP-1*, όπως προτείνεται από πολλές μελέτες, δείχνει να έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο μετά από πολλές διαφορετικές καταστάσεις δημιουργίας φλεγμονών όπως: βλάβες από ισχαιμία-επαναιμάτωση, χρόνια σύνδρομα φλεγμονών, ασθένειες φλεγμονών του πεπτικού, ασθένειες του νευρικού συστήματος, περιοδοντικές φλεγμονές, μηνιγγίτιδες, άσθμα, δερματικές φλεγμονές και σακχαρώδη διαβήτη [131]. Διαφορετικοί μηχανισμοί που έχουν αναφερθεί, όπως η «υπόθεση αυτοκτονίας» ή η σχέση των *PARP-1* και NF-κB που έχει ρυθμιστικό ρόλο σε μονοπάτια απόκρισης φλεγμονών μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών, διευκρινίζουν ότι η ρύθμιση της ενεργότητας της *PARP-1* ενδέχεται να βελτιώσει τη συστηματική φλεγμονή [196]. Σε μία άλλη ρυθμιστική λειτουργία της, η *PARP-1*, με επαγωγή από την ιντερφερόνη γ, βρέθηκε να διατηρεί την κινάση p38 σε ενεργή μορφή και να προστατεύει το mRNA της επαγωγίμης από την ιντερφερόνη γ πρωτεΐνης, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των φλεγμονωδών αποκρίσεων [131].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρόλη την αποτελεσματικότητά τους και την ιστοειδικότητα που παρουσιάζουν, οι αναστολείς της *PARP-1* δεν χρησιμοποιούνται ευρέως φαρμακολογικά σε καταστάσεις φλεγμονών, καθώς λόγω του σημαντικού ρόλου της πρωτεΐνης στην κυτταρική επιδιόρθωση, είναι πιθανή η επαγωγή μετλλάξεων και καρκινογένεσης. Τέλος, οι εξαρτώμενες από την *PARP-1* προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις δεν περιορίζονται μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού, αλλά εντοπίζονται και σε αυτά του νευρικού και καρδιαγγειακού συστήματος [129, 187].

3.4.3. Νευρωνική λειτουργία

Η *PARP-1* εμπλέκεται στη νευρωνική φυσιολογία και παθολογία [197]. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στην επαγωγή νεκρόπτωσης σε κύτταρα που έχουν υποστεί νευρωνικό τραυματισμό και τοξικότητα από διέγερση. Ο νευρωνικός τραυματισμός παράγει σημαντικές ποσότητες ελεύθερων ριζών, οξυγόνου και νιτρικών, ουσιών ιδιαίτερα τοξικών προς τους νευρώνες. Αποτέλεσμα αυτών να προκύπτουν: θραύσεις του DNA, ενεργοποίηση της *PARP-1*, νεκρόπτωση. Η χημική ή γενετική καταστολή της *PARP-1* σε συστήματα θηλαστικών, αποτρέπει τα νευροτοξικά αποτελέσματα. Παράλληλα, παραλλαγές απώλειας

λειτουργίας της PARC στη δροσόφιλα, προάγει τον νευροεκφυλισμό και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του προσδόκιμου ζωής σε ενήλικα άτομα. Γίνεται έτσι κατανοητό ότι ο μεταβολισμός των PAR είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη φυσιολογική νευρωνική λειτουργία. Η *PARP-1* εμπλέκεται επίσης και στην παθογένεση της νόσου Parkinson, που προκύπτει λόγω της αποσύνθεσης των νευρώνων, μέσω της ενεργοποίησης του NF-κΒ.

Επίσης αποτελέσματα ερευνών προτείνουν ρόλο της *PARP-1* στη μνήμη και τη μάθηση. Σε δοκιμές δύο διακριτών μαθησιακών ικανοτήτων του θαλάσσιου μαλακίου *Aplysia*, σχετικών με την απόκριση σε ερεθίσματα και την αναζήτηση τροφής, παρατηρήθηκε αύξηση της καταλυτικής λειτουργίας του ομολόγου της *PARP-1* στα νευρωνικά κύτταρα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποίηση της *PARP-1* απαιτείται για την επανένωση και εξαφάνιση της μνήμης φόβου σε ποντίκια [198]. Ο ακριβής ρόλος της *PARP-1* και των ομολόγων της όμως παραμένει άγνωστος τόσο στα θηλαστικά όσο και στην *Aplysia*.

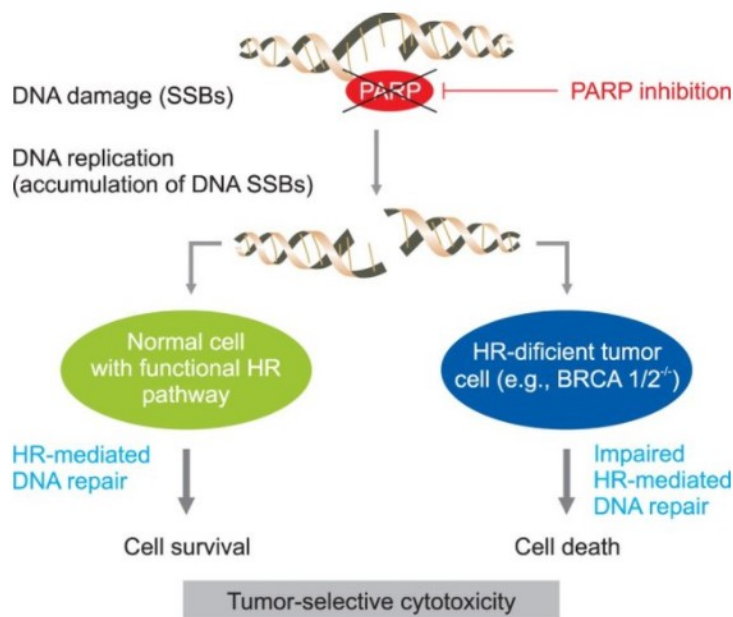
3.4.4 Γήρανση

Η γήρανση είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων που χαρακτηρίζεται ως γενική έπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας εξαρτώμενη από το χρόνο. Η συσσώρευση μακρομοριακών ελλείψεων, ειδικά στα άκρα των χρωμοσωμάτων, είναι χαρακτηριστική της πορείας της γήρανσης. Η πρώτη παρατήρηση που προκάλεσε τη μελέτη της *PARP-1* είναι ότι η κυτταρική ικανότητα σύνθεσης της *PARP-1* πολλών μονοπύρηνων κυττάρων θηλαστικών, σχετίζεται θετικά με τη διάρκεια ζωής του οργανισμού [197]. Έχει βρεθεί ότι οι *PARP-1,2 & 5α,β* συμμετέχουν στη διατήρηση του μήκους και της δομής των τελομερών. Όπως είναι γνωστό, η δομική κατάσταση των τελομερών είναι εξαιρετικής σημασίας στην κυτταρική γήρανση [198].

4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ *PARP-1* ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

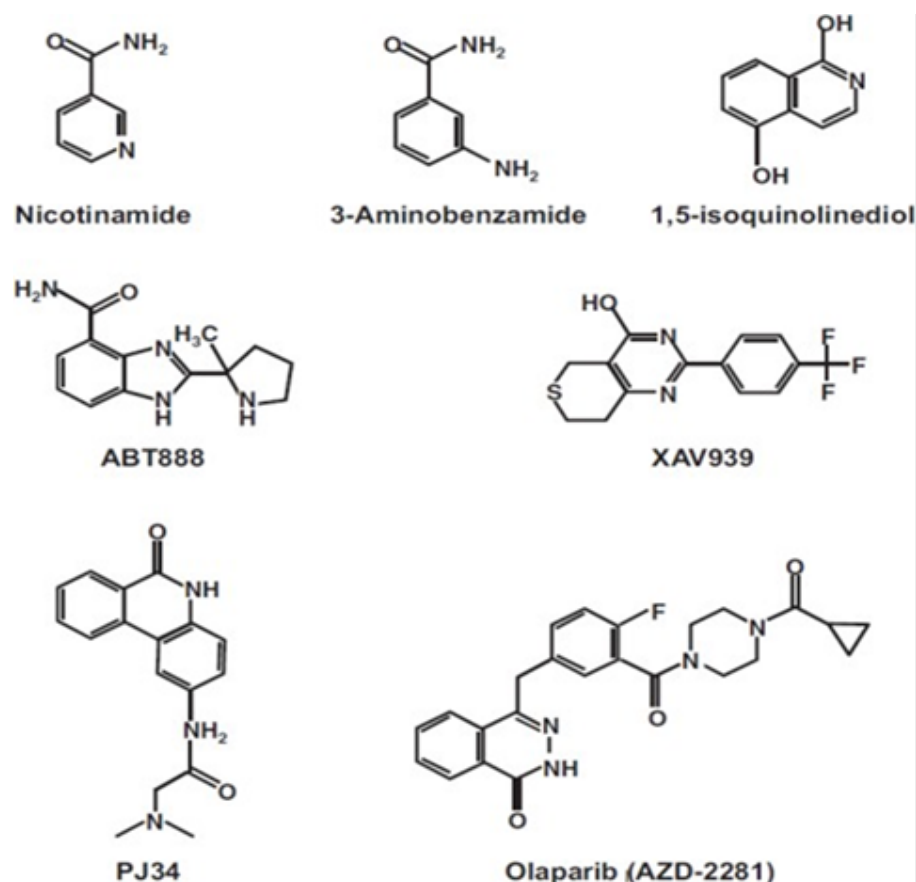
4.1 Μηχανισμός Συνθετικής Θνησιμότητας (synthetic lethality)

Νοσήματα που χαρακτηρίζονται από γενετική αστάθεια όπως ο καρκίνος των ωοθηκών, διέπονται από μη φυσιολογική επιδιόρθωση θραύσεων του DNA. Τα *BRCA* [199] και *PARP* γονίδια είναι δύο βασικοί παράγοντες στην επιδιόρθωση του DNA και έχουν διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές λειτουργίες στο κύτταρο. Η απώλεια της πρωτεΐνης *BRCA* εξακολουθεί να επιτρέπει στο κύτταρο να επιβιώσει αλλά αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητές του να γίνει καρκινικό μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Η απώλεια και των δύο πρωτεϊνών, ωστόσο, σκοτώνει το κύτταρο σε μια διαδικασία που ονομάζεται συνεργιστική/ συνθετική θνησιμότητα (synergistic/ synthetic lethality) [199–202] (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Μηχανισμός «συνθετικής θνησιμότητας» σε καρκινικά κύτταρα με έλλειψη *BRCA1/2*. Η αναστολή της *PARP* λειτουργεί συνεργιστικά και προάγει το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Με την αναστολή της *PARP* οι μονόκλωνες θραύσεις του DNA (SSB) κατά την αντιγραφή μετατρέπονται σε δίκλωνες (DSB). Τα κύτταρα με λειτουργικό ομόλογο ανασυνδυασμό (HR), επιδιορθώνονται (αριστερά). Αντιθέτως (δεξιά) κύτταρα με δυσλειτουργία στον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού, όπως κατά την ελλείψη των *BRCA 1* και *2* γονιδίων, δεν επιδιορθώνονται και καταλήγουν σε κυτταρικό θάνατο [200, 203].

Αναστολείς της *PARP-1* (Εικόνα 4.2), στοχεύουν επιλεκτικά κύτταρα με περιορισμένη λειτουργία του ομόλογου ανασυνδυασμού ως προς την επιδιόρθωση θραυσμάτων στη διπλή έλικα του DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη θανάτωση αυτών των κυττάρων [204]. Συνδυαστική θεραπεία με χρήση αναστολέων (Εικόνα 4.3) του επιγενετικού ελέγχου και της *PARP-1*, μπορεί να οδηγήσει στη θανάτωση των μη φυσιολογικών κυττάρων χωρίς την αύξηση της κυτταροτοξικότητας στα φυσιολογικά κύτταρα, παρέχοντας μια εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση [194, 202, 205].

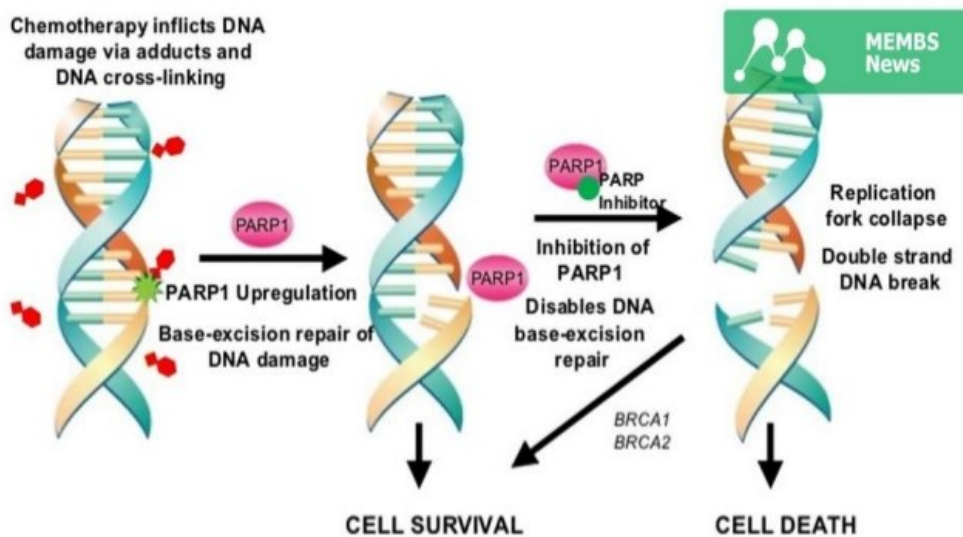


Εικόνα 4.2. Δομές αναστολέων της *PARP-1* [129].

4.2 Αναστολείς της *PARP-1*

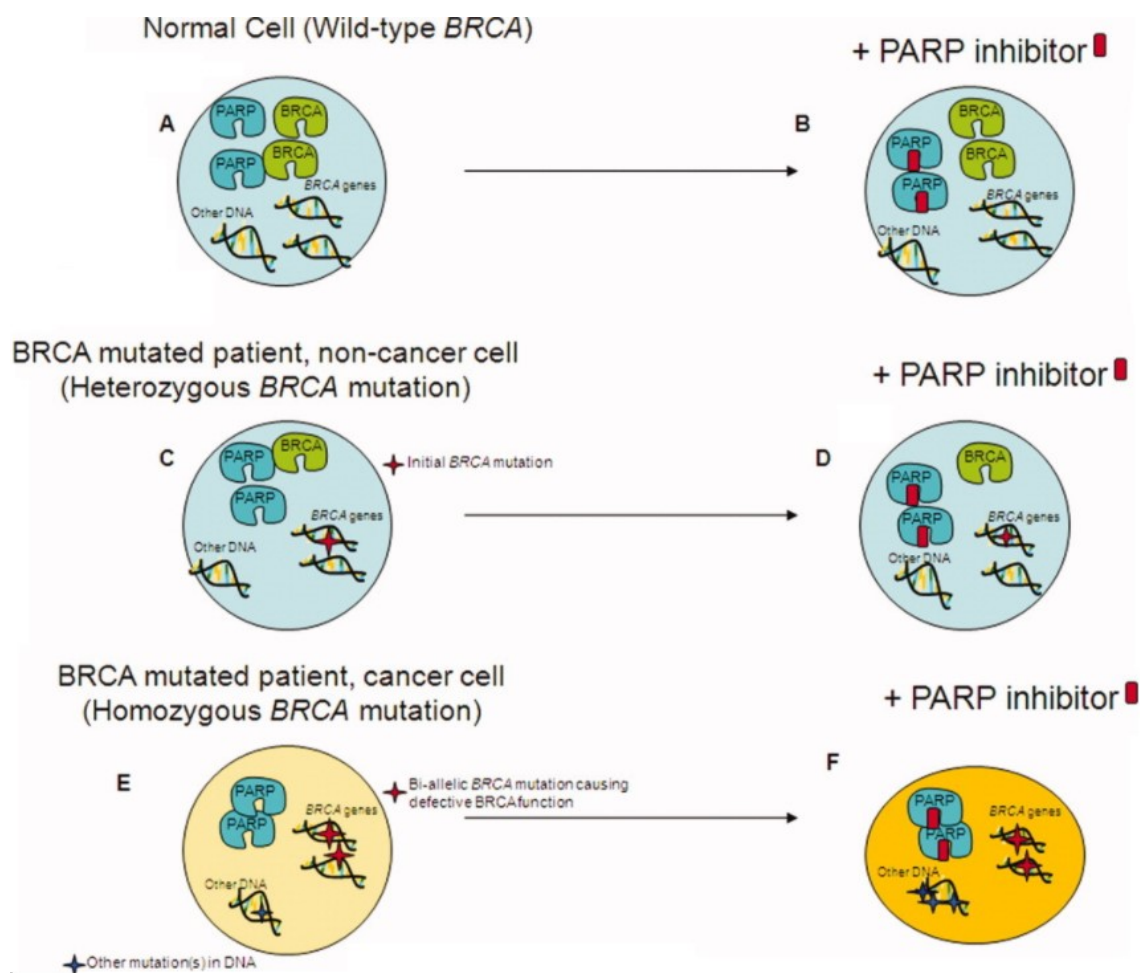
Η χρήση των αναστολέων (Εικόνα 4.2) έχει σαν κύριο σκοπό την ενίσχυση της αντικαρκινικής θεραπείας με ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε κυτταροτοξικές καταστάσεις [195, 206]. Έχει διασαφηνιστεί ότι τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την ενεργότητα της *PARP-1* για αποφυγή της απόπτωσης [205] (Εικόνα 4.3). Αναστολή της

PARP-1, παρατείνει την βλάβη του DNA που θα είχε επιδιορθωθεί μέσω του συστήματος BER και προκαλεί δυσλειτουργία των καρκινικών κυττάρων. Συνδυαστικές θεραπείες με γ- και x- ραδιενέργεια παρουσία αναστολέων, προκαλούν αυξημένη ευαισθητοποίηση [207]. Αυτή εντοπίζεται σε κύτταρα που βρίσκονται στις φάσεις S ή G2 ενώ στα υπόλοιπα δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση. Ωστόσο, μικρότερες ποσότητες ακτινοβολίας παρουσία αναστολέων, δεν έχουν παρόμοια αποτελέσματα, ίσως λόγω της λειτουργικής ομοιότητας των *PARP-1* και *PARP-2*.



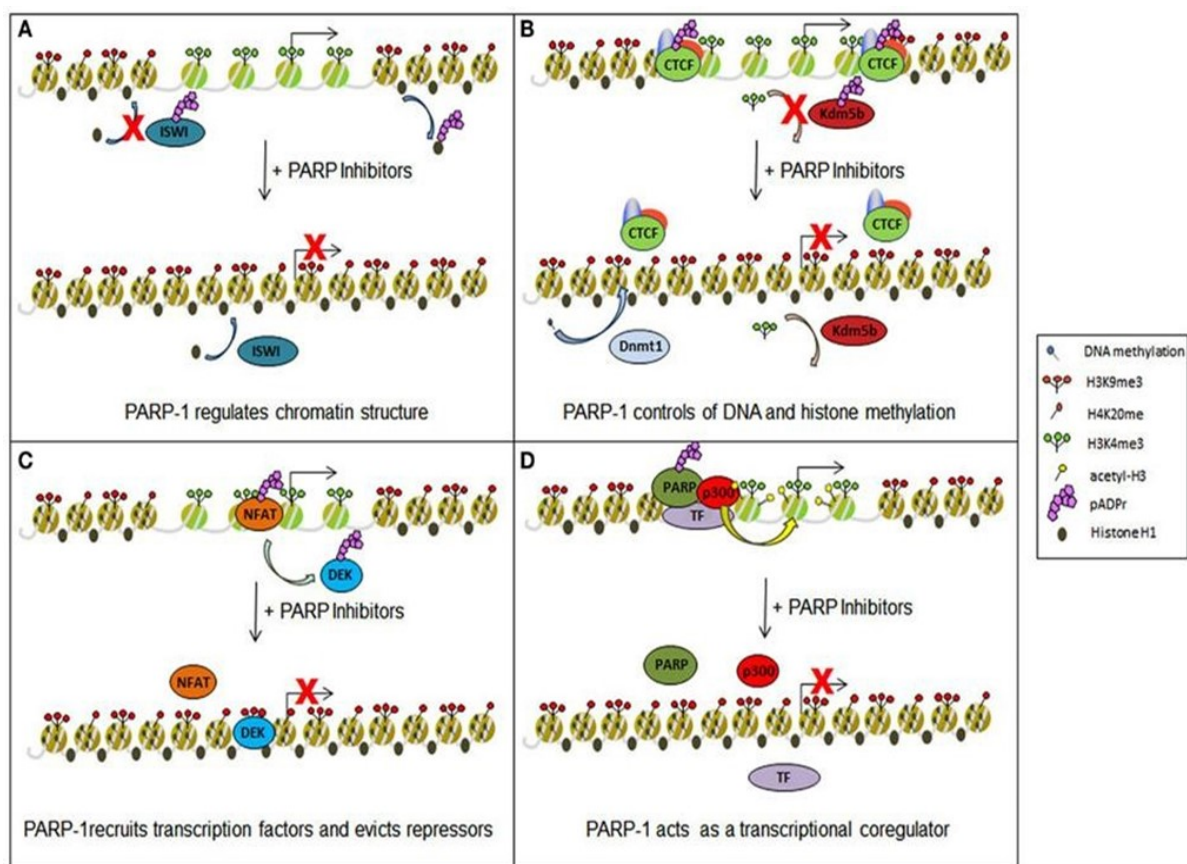
Εικόνα 4.3. Συνδυαστική δράση χημειοθεραπείας και αναστολέων *PARP-1*.

Εξαιρετικά αποτελέσματα εμφάνισαν οι μελέτες σε ασθενείς με έλλειψη των γονιδίων *BRCA1,2* [208, 209] (Εικόνα 4.4). Φυσιολογικά, τα γονίδια αυτά συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό, ενώ έλλειψή τους οδηγεί σε καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και σε άλλες κακοήθειες. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με παραδοσιακά αντικαρκινικά φάρμακα μόνο ή σε συνδυασμό με έναν από τους δύο νέους αναστολείς PARP [202, 204], Olaparib ή BSI-201. Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία συνδυασμού είχαν βελτιωμένη επιβίωση, ελεύθερη νόσου και μεγαλύτερο συνολικό χρόνο επιβίωσης σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν μόνο παραδοσιακά φάρμακα.



Εικόνα 4.4. Επίδραση των αναστολέων της *PARP-1* σε κύτταρα με παραλλαγές στα γονίδια *BRCA* και η επίδρασή τους στον ομόλογο ανασυνδυασμό *HR*. A-B) Σε κύτταρα *BRCA*+/-, η χρήση αναστολέων δεν επιδρά στο κύτταρο ως προς τον *HR*, C-D) Σε κυτταρικές σειρές *BRCA*+/-, επίσης δεν παρατηρείται αλλαγή καθώς το λειτουργικό αλληλόμορφο αρκεί για την επίτευξη του *HR*, E-F) Στα καρκινικά κύτταρα με μεταλλαγμένα και τα δύο αλληλόμορφα (*BRCA*-/-), ο *HR* δε λειτουργεί με αποτέλεσμα να προκύπτει συσσώρευση θράυσεων στο *DNA*. Η παρουσία αναστολέων στα τελευταία, οδηγεί σε αδυναμία επιδιόρθωσης του *DNA* και τελικά στον κυτταρικό θάνατο [210].

Λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν τα προαναφερθέντα κλινικά δεδομένα, η παρούσα μελέτη εστιάζει ιδιαίτερα στην *PARP-1* και στο σχεδιασμό νέων αναστολέων της. Χρήση νεώτερων και ειδικότερων για την *PARP-1* αναστολέων έδειξαν πλήρη αδυναμία επιδιόρθωσης και αποπτωτικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Η δράση των αναστολέων επομένως ίσως να είναι πιο αποτελεσματική σε ασθενείς με συγκεκριμένες βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης [202, 204, 210] (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5. Επίδραση των αναστολέων της *PARP-1* σε διάφορες επιγενετικές και μεταγραφικές διαδικασίες [211].

Σημαντικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η εξαιρετική ανάγκη για θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Η έλλειψή τους μπορεί να προκαλέσει μεταβολικό στρες (ασιτία-υποξία), καταστροφή του DNA και ενεργοποίηση της *PARP-1*. Υπό τις συνθήκες αυτές, τα κύτταρα ενεργοποιούν την διαδικασία της αυτοφαγίας ως μέσο προσαρμογής και ενισχύουν την επιβίωσή τους. Η συγχρονισμένη δράση της *PARP-1* και διαφορετικών κινασών που μπορούν να αντληφθούν τα επίπεδα ενέργειας (AMPK) και θρεπτικών συστατικών (mTOR), είναι σημαντική για την επερχόμενη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η απουσία ή η αναστολή της *PARP-1* καθυστερεί σημαντικά την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας λόγω ασιτίας, με επακόλουθο την εξάντληση των αποθεμάτων σε θρεπτικά μέσα [206, 207, 209].

Παρ' όλα αυτά, η χρήση αναστολέων δεν έχει μόνο θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι αναστολή της *PARP-1* προκαλεί υπερέκφραση του MDR-1, ενός

μεταφορέα της κυτταρικής μεμβράνης που μεταφέρει έξω από το κύτταρο κυταροτοξικούς παράγοντες. Αυτό προκύπτει φυσιολογικά ως προστασία του κυττάρου μέσω μεταγραφικών μηχανισμών, αφού μείωση της πολύ ADP-ριβοζυλίωσης μπορεί να καταλήξει σε αντίσταση του κυττάρου στην πρόσληψη παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA. Μελέτες εστιάζουν μεταξύ της θεραπευτικής ικανότητας του αναστολέα και της πρόκλησης ανεπιθύμητων παρενεργειών καθώς και στην ανάπτυξη συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων [212, 213].

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in clinical development

Agent/company. Date first into clinic	Route	Disease	Single agent/combination	Clinical status
AG014699/PF0367338/CO338 Rucaparib Pfizer/Clovis 2003	Intravenous and oral	Solid tumours Melanoma BRCA-related tumours Ovarian cancer	Various combinations Single agent	Phase I complete Phase II ongoing
KU59436/AZD2281 Olaparib AstraZeneca 2005	Oral	BRCA-related cancers Solid tumours	Single agent Various combinations	Phase I complete Several Phase II ongoing
ABT888 Veliparib Abbott 2006	Oral	Solid Haematological	Single agent Various combinations	Phase 0/I complete Several Phase II ongoing
BSI-201 Iniparib BiPar/Sanofi 2006	Intravenous	Triple negative breast cancer (TNBC)	Gemcitabine-carboplatin/ temozolomide combinations	Phase II complete Phase III complete
INO-1001 Inotek/Genentek 2003/6	Intravenous	Melanoma glioblastoma multiforme (GBM)	Temozolomide combinations	Phase II (? Status)
MK4827 Niraparib Merck/Tesaro 2008	Oral	Solid BRCA ovarian	Single	Phase I complete
CEP-9722 Cephalon 2009	Oral	Solid tumours	Temozolomide combinations and single agent	Phase I complete
GPI 21016/E7016 (E7449 2011) MGI Pharma/Eisai 2010	Oral	Solid tumours	Temozolomide combinations Single agent and combination	Phase I ongoing
LT673/BMN 673 Biomarin 2011	Oral	Solid tumours and haematological malignancies	Single agent	Phase I complete, Phase III ongoing

Πίνακας 3. Αναστολείς των ενζύμων PARP 1 και 2 σε κλινικές δοκιμές (έτος: 2014)

Οι αναστολείς της πολυμεράσης της πολυ-ADP-ριβόζης (PARP) έχουν αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο οι ασθενείς με BRCAness (δηλαδή με έλλειψη HR λειτουργικότητας και BRCA γονιδίων λόγω γενετικών ή και επιγενετικών μηχανισμών όπως η μεθυλίωση του BRCA1) [214] αντιμετωπίζουν τον καρκίνο των ωοθηκών [26, 56, 215]. Τα Olaparib [216], rucaparib και niraparib έλαβαν έγκριση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) και του (FDA) για τον καρκίνο των ωοθηκών [210]. Το Veliparib δεν έχει ακόμη εγκεκριμένη ετικέτα και η χρήση του διερευνάται κυρίως σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή στοχευμένους παράγοντες. Όλοι οι αναστολείς PARP αναπτύχθηκαν ενάντια σε επιθηλιακά κύτταρα του

καρκίνου των ωοθηκών. Είναι αναστολείς *PARP-1/ 2*, ενώ το olaparib και το rucaparib αναστέλλουν επίσης την *PARP3*. Επιπλέον, το rucaparib αναστέλλει την τανκυράση-1, η οποία περιλαμβάνεται επίσης στην οικογένεια των *PARP*. Πρόσφατα, συνδυαστικές στρατηγικές με τους αναστολείς της *PARP* έχουν αρχίσει επίσης να διερευνώνται συστηματικά. Συνδυασμοί αναστολέων *PARP* με φάρμακα που αναστέλλουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) μπορεί να δημιουργήσουν ευαισθησία στους καρκίνους των επιθηλιακών κυττάρων των ωοθηκών με HR επάρκεια ως προς τους αναστολείς της *PARP* και ενδεχομένως να επεκτείνουν τη χρήση τους πέραν του HR συσχετιζόμενου καρκίνου των ωοθηκών [56].

Συνολικά, δεν είναι βέβαιο εάν τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των προκλινικών μελετών θα μεταφραστούν σε βελτιωμένη κλινική δράση. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η συνεχής φαρμακευτική έρευνα για νέους αναστολείς των *PARPs* με τα κατάλληλα σύγχρονα μέσα σχεδιασμού και ελέγχου καινοτόμων μορίων.

5. *IN SILICO* ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ - ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Ο προσδιορισμός και η επιβεβαίωση πρωτεϊνών-στόχων με χρήση της γενωμικής, της πρωτεωμικής και της βιοπληροφορικής ακολουθούνται από την ανακάλυψη μορίων/δομών-οδηγών (την αναζήτηση ενός φαρμακοφόρου, δηλ. ενός δομικού τμήματος που συνδέεται με έναν στόχο, ασκώντας μια συγκεκριμένη δράση με αποδεκτή θεραπευτική δραστικότητα) και τη βελτιστοποίηση των δομών αυτών. Υπολογιστική χημεία (computational chemistry- CC) και υψηλής απόδοσης ελέγχος (high- throughput screening- HTS) χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νέων ενώσεων και τη βελτιστοποίηση τους ως προς την αύξηση της δραστικότητάς τους. Η διαδικασία της βελτιστοποίησης των δομών-οδηγών γίνεται σε κύκλους. Η χημική βιβλιοθήκη που λαμβάνεται μπορεί να αποτελείται από αρκετές χιλιάδες νέες δομές και στο τέλος της διαδικασίας, η δυνατότητα ανάπτυξης των ενώσεων ερευνάται συνήθως με χρήση ταχέων υπολογιστικών πειραματικών τεχνικών που προσμετρούν παράγοντες όπως η σταθερότητα, η διαλυτότητα, η διαπερατότητα και η τοξικότητα. Μετά από τα παραπάνω συμπεράσματα, μερικά "υποψήφια" φαρμάκα (candidate drugs- CD) επιλέγονται από τη βιβλιοθήκη για περαιτέρω ανάπτυξη [217].

Οι *in silico* εφαρμογές (δηλαδή υπολογιστικές τεχνικές, προγράμματα, μοντέλα κλπ) αποτελούν πλέον σημαντικό μέρος της διαδικασίας παραγωγής φαρμάκων, επιτρέποντας τη διεξαγωγή περισσότερων εκ των προαναφερόμενων διαδικασιών «εικονικά» (ως υπολογιστικά μοντέλα), μειώνοντας σημαντικά το κόστος και τον χρόνο. Η ταχέως αυξανόμενη γνώση της βιολογίας του καρκίνου, έχει οδηγήσει σε πληθώρα πιθανών μοριακών πρωτεϊνών-στόχων, οι οποίοι «ελέγχονται» μέσω ανίχνευσης χημικών βιβλιοθηκών και τελικά του «ορθολογικού» σχεδιασμού φαρμάκων, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Ο υποβοηθούμενος από ηλεκτρονικούς υπολογιστές σχεδιασμός φαρμάκων CADD (Computer Aided Drug Design), που αναπτύσσεται ταχέως τα τελευταία χρόνια, στοχεύει στη γρήγορη και αποτελεσματική διαδικασία σάρωσης (screening) μορίων (τυχαία, μέσω βιβλιοθηκών ή εστιασμένα) και στον εξαρχής σχεδιασμό μορίων. Επιπλέον μειώνονται πειράματα σε ζώα μέσω μοντελικών προσομοιώσεων, επανπροσδιορίζεται η ασφάλεια ήδη

γνωστών φαρμάκων, και εν γένει ενισχύεται κάθε στάδιο (σχεδιασμός, ανάπτυξη και βελτιστοποίηση) της διαδικασίας της ανακάλυψης φαρμάκων [218, 219].

Κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι αυτές που βασίζονται στη δομή της πρωτεΐνης-στόχου (structure-based drug design / SBDD), περιλαμβάνοντας τη μελέτη της πρωτεΐνης-στόχου σε υπολογιστικό μοντέλο και της ικανότητας πρόσδεσης (Molecular Docking) των πιθανών μορίων-προσδετών (ως αναστολέων ή και ενισχυτών) με την πρωτεΐνη. Οι μελέτες ADME(T) (Απορρόφηση-Κατανομή-Μεταβολισμός-Αποβολή-Τοξικότητα) αποτελούν επίσης χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των βιοενεργών μορίων προσδετών. Τέλος, τα τελευταία 20 χρόνια επικρατεί η μέθοδος Virtual HighThroughput (Drug) Screening (VHTS), δηλαδή ευρείας κλίμακας ψηφιακή διαλογή φαρμάκων (υπό δοκιμή) με τη βοήθεια *in silico* τεχνικών (computer-aided drug design) και ευρέων εικονικών ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών πρωτεϊνών (ανακρυσταλλομένες κυρίως δομές) από διάφορα πανεπιστήμια και οργανισμούς για περαιτέρω διερεύνηση (ως πιθανών στόχων νέων ενώσεων-προσδετών).

5.1 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων (Rational Drug Design) στις *in silico* μελέτες

Ο Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων (rational drug design), δηλαδή μια σειρά διαδικασιών με στόχο την επιτυχή ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων, αποτελείται από διάφορες υπολογιστικές, βιολογικές και χημικές μεθόδους, συνοψιζόμενη επιγραμματικά στα στάδια: Ταυτοποίηση φαρμακευτικού στόχου – αναπαραγωγή και μελέτη στόχου – προσδιορισμός και ανάλυση των δομών συμπλόκων στόχου με φυσιολογικές ή άλλες βιοδραστικές ενώσεις – μελέτη των προαναφερθέντων ενώσεων προς παραγωγή νέων ή βελτιστοποιημένων δομικά ενώσεων-προσδετών – διάφορες μελέτες των παραγώγων ενώσεων, π.χ. τοξικότητας, φαρμακοκινητικής κλπ – δοκιμασίες *in vitro* και *in vivo* – προκλινικές και κλινικές μελέτες.

Στις φαρμακευτικές μελέτες που περιλαμβάνουν *in silico* διαδικασίες όπως προαναφέρθηκε, ακολουθούνται δύο πρότυπα μεθοδολογικής ερευνητικής προσέγγισης:

- Ο σχεδιασμός φαρμάκων από ήδη γνωστά μόρια, φαρμακευτικά ή μη (μπορεί να έχουν κάποια άλλη φαρμακοχημική/ βιολογική χρήση), όπου γίνεται προσπάθεια εύρεσης κατάλληλου βιολογικού στόχου/ υποστρώματος (π.χ ενζύμου), με γνωστή συσχέτιση με κάποιο βιοχημικό μονοπάτι (που αφορά και τη νόσο προς θεραπεία), στον οποίο πρέπει να δεσμεύονται τα μελετούμενα μόρια και να παράγουν κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα (π.χ. αναστολή ή ενίσχυση ενεργότητας ενζύμου)
- Ο βασισμένος στη δομή πρωτεϊνών ή και νουκλεϊκών οξέων σχεδιασμός φαρμάκων (structure-based drug design, SBDD), όπου με γνωστή την τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα διερευνάται το πιθανό φαρμακευτικό δυναμικό άγνωστων (υπαρχόντων ήδη, νέων ή παραμετροποιημένων μορίων) ενώσεων-αναστολέων (ligands) [220]. Αυτή η μέθοδος αποτελεί πιθανότατα την πιο λογική προσέγγιση για την δημιουργία εξειδικευμένων και αποτελεσματικών ενώσεων ως προς μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-στόχο.

5.1.1 Μοριακή πρόσδεση (molecular docking)

Η **μοριακή πρόσδεση (molecular docking** ή απλώς «(protein) **docking**» όπως αναφέρεται στα επιμέρους προγράμματα) είναι μια από τις κύριες διαδικασίες του SBDD. Περιλαμβάνει τη μοντελική σύνδεση των μορίων- πιθανών προσδετών στην κατάλληλη θέση (θέση πρόσδεσης) του υποστρώματος (συνήθως κάποια πρωτεΐνη, ένζυμο/ υποδοχέας κλπ) στόχου, προβλέποντας την «ικανότητα σύνδεσης» μεταξύ τους, δηλαδή το την πιθανότητα να προσδεθεί η προς μελέτη ένωση με το βιομόριο- στόχο, και «πόσο συμβατά» (ισχυρά συνδεδεμένα) είναι τα δύο μόρια (βιοχημική διαδικασία σύνδεσης προσδέτη-υποστρώματος). Σημαντικό είναι επίσης ότι προσδιορίζεται η μορφή των αλληλεπιδράσεων των μορίων (πχ μέσω καταλοίπων αμινοξέων αν μιλάμε για πρωτεΐνη) και ο «προσανατολισμός» των μορίων που επιφέρει την καταλληλότερη αλληλεπίδραση ως προς την ισχύ και τη σταθερότητα της σύνδεσης, μέσω ελαχιστοποίησης της ενέργειας του συμπλόκου [221]. Άλλωστε η συνολική τελική ενέργεια σύνδεσης του συμπλόκου «μόριο-υπόστρωμα» (ή των δύο μορίων πιο απλά) μετράει ουσιαστικά την ικανότητα σύνδεσης ενώ αποτελεί και το μέτρο σύγκρισης μεταξύ διάφορων συνδέσεων του υποστρώματος στόχου με άλλα μόρια (ως προς την ισχύ των συνδέσεων αυτών). Η διαδικασία αυτή μπορεί

να αφορά σύνδεση μεταξύ (μικρών συνήθως) χημικών μορίων (ligands) και πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, αλλά και πρωτεΐνης με νουκλεϊκό οξύ (DNA ή RNA) [222].

5.1.2 ADME(T) ιδιότητες

Εντούτοις, πέρα από την παραπάνω διαδικασία, τα μόρια-προσδέτες για να αποτελέσουν πιθανά φάρμακα, στις υπολογιστικές μελέτες (επίσης) θα πρέπει να πληρούν και **κριτήρια των ADME(T) ιδιοτήτων**. Αυτά αφορούν τις φαρμακοκινητικές και φυσικοχημικές ιδιότητές τους, με συγκεκριμένα όρια τιμών των μεταβλητών που περιγράφουν αυτές τις ιδιότητες («περιγραφείς» κάθε λογισμικού), και προσμετρώνται με βάση τη (στεreo)χημική τους (και πιθανώς, αν μιλάμε για «μεγάλα» μόρια, την τρισδιάστατη) δομή (π.χ ο κανόνας των 5 του Lipinski που θεσπίζεται από επιμέρους κανόνες όπως το μοριακό βάρος, η μεταβολική σταθερότητα της δομής ή και το τοξικολογικό δυναμικό μιας ένωσης). Τα ειδικά υπολογιστικά προγράμματα που υπάρχουν (δωρεάν ή εμπορικά), στηρίζονται σε συγκεκριμένα πεδία ορισμού (forcefields) και σε μαθηματικές συναρτήσεις και μοντέλα, ώστε να πραγματοποιούν «προβλέψεις» τιμών για τους παραπάνω αναφερόμενους περιγραφείς σε σχέση με τις δομές.

Ανάμεσα στις διάφορες περιγραφόμενες ιδιότητες που «ενδυναμώνουν» το προφίλ φαρμακοδυναμικής και ασφάλειας των εν δυνάμει φαρμακοποιήσιμων ουσιών (lead compounds), ειδικά για ουσίες που πρόκειται να χορηγηθούν από του στόματος, υπάρχουν τρεις τυποποιημένοι «κανόνες». Σημειώνεται ότι η στοματική οδός χορήγησης αποτελεί και την πιο κρίσιμη, την πιο απαιτητική (ως προς την ασφάλεια, τη βιοδιαθεσιμότητα και τον μεταβολισμό) οδό για τα φάρμακα, λόγω συμμετοχής όλων σχεδόν των ανθρώπινων οργάνων (με κύρια ήπαρ, νεφροί, γαστρεντερικό σύστημα) από τη χορήγηση ως και την απέκκριση, και άρα διέπεται από τους «αυστηρότερους» κατ' ανάγκην κανόνες.

Οι κανόνες αυτοί είναι:

i. Κανόνας «των Πέντε» του Lipinski (Lipinski's Rule of Five)

ο Κανόνας των Πέντε του Lipinski [223, 224], αποτελεί ένα πρώτο μέτρο της «φαρμακομοιότητας» (drug-likeness) των προσδετών από τον Christopher A. Lipinski, και βασίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα χορηγούμενα φάρμακα από του στόματος είναι μόρια

σχετικά μικρά με μέτρια λιποφιλικότητα. Απαιτείται γενικά, ένα από του στόματος χορηγούμενο, ενεργό φάρμακο να έχει κατά μέγιστο μία μόνο παραβίαση από τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Όχι περισσότεροι από 5 δότες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου με ένα ή περισσότερα άτομα υδρογόνου)
2. Όχι περισσότεροι από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου)
3. Μοριακό βάρος ως 500 daltons
4. Έναν συντελεστή διαχωρισμού οκτανόλης-νερού $\log P$, όχι μεγαλύτερο από 5 (λιποφιλικότητα μορίου).

(Σημειώνεται ότι όλοι οι αριθμοί είναι πολλαπλάσια του «πέντε», εξού και η προέλευση του ονόματος του κανόνα. Επιπλέον, για να αξιολογηθεί καλύτερα η ομοιότητα προσδετών προς φαρμακευτικές ουσίες, έχουν δημιουργηθεί επεκτάσεις στους κανόνες αυτούς, [225, 226])

ii. Ο κανόνας των «Τριών» του Jorgensen (Jorgensen's Rule of Three)

Ο καθηγητής William L. Jorgensen (που είναι ο κύριος σχεδιαστής του προγράμματος QikProp που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή τη μελέτη), πρόσθεσε 3 επιπλέον κριτήρια εκτός από τον κανόνα Lipinski, προκειμένου να καταστούν οι προβλέψεις ακριβέστερες:

- $QPlogS > -5.7$
- $QPPCaco > 22 \text{ nm/s}$
- Αρχικοί μεταβολίτες < 7 .

Οι παραπάνω περιγραφείς κωδικοποιούν στο χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα τις ιδιότητες της υδατοδιαλυτότητας και την διαπερατότητα/ βιοδιαθεσιμότητα. Στην πραγματικότητα, η υδατοδιαλυτότητα ($\log S$) ενός υποψηφίου φαρμάκου είναι μια κρίσιμη ιδιότητα για τη βιοδιαθεσιμότητά του [227]. Επιπλέον, η πολύ χαμηλή διαπερατότητα των Caco-2 κυττάρων, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη εντερο-αιματική παρεμπόδιση (φραγμός) [228, 229], δείχνει χαμηλή απορρόφηση ή διείδυση για ένα μόριο προσδέτη,

ειδικά εάν ο προσδέτης παρουσιάζει μια ή περισσότερες παραβιάσεις του κανόνα των 5 του Lipinski. Οι προσδέτες με λιγότερες (και κατά προτίμηση καμία) παραβιάσεις του κανόνα Jorgensen είναι πιθανότερο να είναι διαθέσιμοι από το στόματος [230, 231].

i. Οι κανόνες του Veber (Veber's Rules)

Η μείωση του εμβαδού πολικής επιφάνειας (polar surface area - PSA) σχετίζεται καλύτερα με την αύξηση στον ρυθμό διαπερατότητας απ' ότι η λιποφιλικότητα [232–234] και είναι επομένως ένα ελκυστικό εναλλακτικό μοντέλο για την πρόβλεψη της απορρόφησης φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Η μελέτη βιοδιαθεσιμότητας του Veber [232] για τέτοιες ουσίες, έδειξε ότι η ευελιξία ενός υποψηφίου φαρμάκου, μετρούμενη ως ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή (<10) καθώς και το εμβαδόν πολικής επιφάνειας ($<140 \text{ \AA}^2$) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φίλτρα στα πρώτα στάδια κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων, αν και έχει φανεί ότι αυτή η προσέγγιση πρέπει να αντιμετωπιστεί με σύνεση, τόσο αναφορικά με την επιλογή του αλγορίθμου του περιγραφέα που χρησιμοποιούμε όσο και επειδή κι άλλοι παράγοντες μπορεί να έχουν σημαντική επιρροή στη βιοδιαθεσιμότητα [235]. Σε σχέση με το κριτήριο του εμβαδού πολικής επιφάνειας εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντ' αυτού ένα κριτήριο με βάση το συνολικό άθροισμα των δοτών και των δεκτών υδρογονικών δεσμών (≤ 12), που είναι ανεξάρτητο αλγορίθμου [232].

Τα υποψήφια προς φαρμακευτική χρήση μόρια που συμμορφώνονται με τα παραπάνω κριτήρια, έχουν συνήθως χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας κατά τις κλινικές δοκιμές. Εν τούτοις, οφείλουμε να αναφέρουμε ότι οι υπολογιστικές μελέτες πρέπει να ελέγχονται ακόμα και σήμερα, με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα ως προς την ακρίβειά τους, καθώς υπόκεινται σε μεγάλους περιορισμούς [236]. Ομοίως και ο ίδιος ο «ορθολογικός σχεδιασμός» φαρμάκων πρέπει να ελέγχεται από τα κλινικά αποτελέσματα, καθώς το ανθρώπινο σώμα διαθέτει μηχανισμούς ελέγχου, συστήματα ρύθμισης, μηχανισμούς επανατροφοδότησης κλπ που είναι πιθανόν να αλληλεπιδρούν, οδηγώντας για παράδειγμα ένα βιοχημικό μονοπάτι να αναπληρώνει τη δράση του μονοπατιού (πρωτεΐνης) στόχου του «φαρμάκου» μας. Έτσι, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι από την αρχή ότι ο σχεδιασμός ενός φαρμάκου που στοχεύει σε έναν συγκεκριμένο υποδοχέα ή ένζυμο θα «δουλεύει» επαρκώς ως προς μια ασθένεια (πόσο μάλλον αν προκαλεί και αντίστροφα

αποτελέσματα σε άλλους φυσιολογικούς μηχανισμούς), ακόμη και αν είναι γνωστό ότι το συγκεκριμένο βιομόριο αφορά άμεσα έναν φυσιολογικό μηχανισμό της συγκεκριμένης νόσου.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΣΚΟΠΟΣ

Φυσικό αντικείμενο της εργασίας είναι η ανάπτυξη και ο έλεγχος νέων υβριδικών ομο-αζαστεροειδών αλκυλιωτών με στοχευμένη δράση κατά των ενζύμων «Πολυμεράση της πολυαδενο διφωσφορικής ριβόζης» (PARP) 1 και 2 για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στη σύνθεση και την αξιολόγηση της δράσης νέων εστέρων με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, εξειδικευμένων προς ζωτικά κυτταρικά συστατικά όπως τα ένζυμα *PARP-1* και *PARP-2*. Κύριος στόχος αποτελεί η παρεμπόδιση της αύξησης και η εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων μέσω ειδικών, αλλά ελάχιστα τοξικών, δράσεων. Η μεθοδολογία της παρούσας ερευνητικής διατριβής περιλαμβάνει πειραματικές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη πρωτότυπων αζωτούχων στεροειδών ενώσεων, με ειδική και στοχευμένη δράση ενάντια σε κύτταρα του καρκίνου των ωοθηκών, σχετικές με τον *in silico* σχεδιασμό, αξιολόγηση και σύνθεση των νέων στεροειδών μορίων, καθώς και με την περαιτέρω αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας τους *in vitro* και μοριακά.

Βασικός στόχος των υπό μελέτη υβριδικών λακταμικών στεροειδών αλκυλιωτικών ενώσεων είναι η αναστολή της λειτουργικότητας τουλάχιστον ενός εκ των PARP 1 και 2 σε βιοχημικό (ή και μοριακό) επίπεδο. Ταυτόχρονα, το στεροειδικό μέρος των ενώσεων μπορεί να δρα ως ένας κλασσικός αναστολέας στεροειδών υποδοχέων (εκτός από μόριο-φορέας του αλκυλιωτή), ενώ το αλκυλιωτικό τμήμα, με τη βασική του λειτουργία, μπορεί να επιφέρει και περαιτέρω καταστροφή/ αποδιάταξη στο γενετικό υλικό του καρκινικού κυττάρου. Βασικό χαρακτηριστικό των νέων υβριδικών στεροειδών πρέπει να είναι η δομική τους «συνάφεια» χωροταξικά με τη θέση σύνδεσης της ενεργής περιοχής της πρωτεΐνης-στόχου, ώστε ως «προσδέτες» να συνδεθούν ισχυρά μαζί της, αναστέλλοντας τη δράση της αποτελεσματικά.

Κύριος και τελικός σκοπός είναι η απόδειξη της αντικαρκινικής δράσης έναντι του καρκίνου των ωοθηκών καθώς και η κατανόηση της μοριακής βάσης του συνολικού μηχανισμού δράσης των μελετούμενων ενώσεων, των αλληλεπιδράσεών τους με τις πρωτεΐνες-στόχους, και η επαλήθευση των προηγουμένως περιγεγραμμένων λειτουργιών.

7. ΥΛΙΚΑ

7.1 Ενώσεις

Οι μελετούμενες ενώσεις είναι υβριδικά μόρια, δηλαδή συνδυάζουν περισσότερες από μία πιθανές φαρμακευτικές δράσεις. Διάφορα υβριδικά στεροειδή παράγωγα μόρια έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για τη θεραπεία του καρκίνου με αυξημένη αντικαρκινική δράση, χάρη στη συνδυαστική δραστηριότητά τους, που αφορά κυρίως τη στεροειδική λειτουργικότητα ενός μορίου (που χρησιμοποιείται συχνά κι ως φορέας, λόγω της υψηλής διεισδυτικότητας και ειδικότητας των στεροειδών σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και την συσχέτιση με ορμονικούς υποδοχείς) [237] και την κυτταροτοξικότητα ενός δεύτερου μορίου (αλκυλιωτής), προερχόμενη από την ικανότητά του να σταματά την αντιγραφή του DNA μέσω σχηματισμού σταθερών και μόνιμων δεσμών ανάμεσα στις δύο αλυσίδες του γενετικού υλικού [238, 239]. Τα συνδυασμένα αυτά μόρια συνήθως εμφανίζουν καλύτερο προφίλ διαλυτότητας, λιποφιλικότητας και τοξικότητας από τον αλκυλιωτή από τον οποίο προέκυψαν.

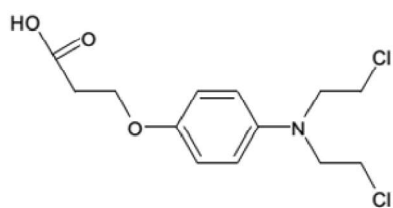
Σημαντική ερευνητικά κατηγορία των στεροειδών μορίων- τροποποιημένων φορέων, αποτελούν τα ομο-αζαστεροειδή, στα οποία η σύζευξη του στεροειδικού τμήματος με έναν αλκυλιωτή υλοποιείται με πολλαπλές προσεγγίσεις, όπως μέσω εστερικού δεσμού (-COO-), δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C) ή αμιδικού δεσμού στον -A ή τον -D δακτύλιο του στεροειδικού σκελετού [240–242]. Σε πάρα πολλές μελέτες [243–252] τα τελευταία 20 χρόνια, έχει προκύψει ότι η παρουσία μιας χαρακτηριστικής λακταμικής ομάδας (-NH-CO-) σε έναν ή δύο δακτυλίου του ομο-αζα-στεροειδικού φορέα, διατηρεί και βελτιώνει την ισορροπία μεταξύ χρόνου παραμονής στον οργανισμό και ποσότητας (συγκέντρωσης) του σκευάσματος που απαιτείται για θεραπεία, οδηγώντας συνολικά σε σημαντικότερη αντικαρκινική δράση (καθώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα. Έτσι, μια τροποποίηση του στεροειδικού φορέα με δημιουργία λακταμικών δακτυλίων (aza-steroids - αζαστεροειδών), φαίνεται να αυξάνει άμεσα την τελική δραστηριότητα των υβριδικών αζαστεροειδών αλκυλιωτικών μορίων, με την τοξικότητα να παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα του αλκυλιωτή, αρκετά υψηλά για να δρα η νέα ένωση σε μαγαλύτερα χρονικά διαστήματα (χρόνος παραμονής του φαρμάκου), και καλύτερα ανεκτά από τον οργανισμό συνολικά [253, 254].

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη διατριβή, η ιδέα και ο *in silico*, εν αρχή, σχεδιασμός διλειτουργικών (bifunctional) οργανικών υβριδικών στεροειδών παραγώγων και η ενδεχόμενη χημική σύνθεση (όσων εξ αυτών ικανοποίησαν τα κριτήρια κατά τη μοριακή πρόσδεση και τη δοκιμασία ADMET υπολογιστικά), ακολούθησαν κατά το παραπάνω περιγραφόμενο μοτίβο λειτουργικότητας, τον ορθολογικό σχεδιασμό υποψήφιων φαρμάκων όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, και δημιουργήθηκαν σύμφωνα με ήδη γνωστές διαδικασίες/ συνθετικές πορείες, δημοσιευμένες και σε προηγούμενες μελέτες [240, 242, 243, 247, 255]. Τελικός στόχος, πέραν των γενικών πλαισίων που προαναφέρθηκαν σχετικά με τις ιδιότητες των αζαστεροειδών, αποτέλεσε η χημική τροποποίηση των δομών των μορίων να καταστήσει τα προκύπτοντα υβριδικά παράγωγα αναστολείς των *PARP-1* ή/ και *PARP-2*, ταυτόχρονα με την αλκυλιωτική τους δράση, δηλαδή εξειδικευμένους και αποτελεσματικούς προσδέτες των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Έτσι, μέσω της τεχνικής βελτίωσης, αυτοί οι αναστολείς μπορεί να παραμείνουν αρκετά σταθεροί στο εσωτερικό του ανθρώπινου σώματος και πολύ σταθερά συνδεδεμένοι με τις πρωτεΐνες-στόχους, κάτι που θα οδηγήσει σε μακροχρόνια αντικαρκινική αποτελεσματικότητα.

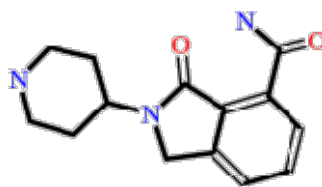
Τα στεροειδικά τμήματα των μορίων τροποποιήθηκαν ξεκινώντας από πρόδρομα στεροειδή, έτσι ώστε να διαθέτουν έναν λακταμικό δακτύλιο στο εσωτερικό τους, ο οποίος μπορεί να είναι ο -A ή ο -B ή -C ή ο -D (μονολακτάμες - με έναν λακταμικό δακτύλιο), είτε δύο λακταμικούς δακτυλίους, δηλαδή -B και -D, δακτυλίους του στεροειδικού σκελετού (διλακταμη- δύο λακταμικοί δακτύλιοι).

Μελετήθηκε υπολογιστικά η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες οκτώ νέων στεροειδών ενώσεων (A, B, C, D, E, XE2, XE3, XE4) και έγινε τελικά χημική σύνθεση πέντε εξ αυτών (A, B, C, D και E). Οι δομές τους παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

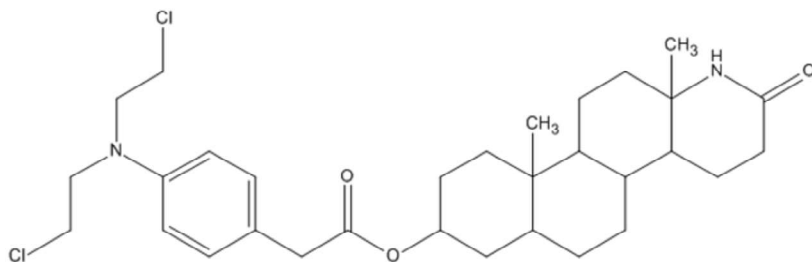
Οι ενώσεις αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορα στάδια πριν ή μετά τη χημική σύνθεση παρουσιάζονται παρακάτω στο Σχήμα 1:



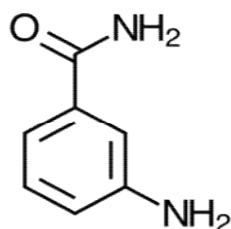
1a.



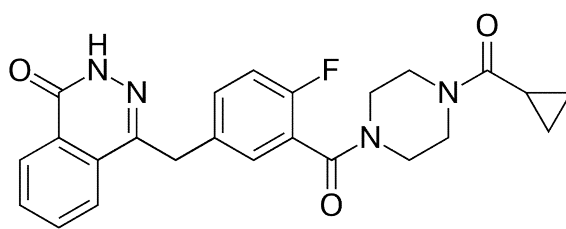
1b.



1c.



1d.



1e.

Σχήμα 1. Ενώσεις αναφοράς: *a.* 3-(4-(bis (2-chloroethyl) amino) phenoxy) propanoic acid / αλκυλιωτικό μόριο που εν συντομία για τη μελέτη μας, αναφέρεται απλώς ως «προπανοϊκό ή προπιονικό οξύ» - (**PA**) ή (**POPA**) [256],

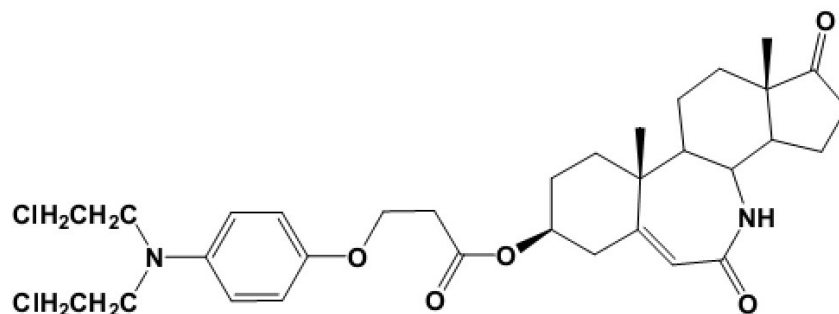
b. **3L3L** (pdb file) inhibitor a906894 «L3L»/ PARP-1 Ligand / 3-oxo-2-piperidin-4-yl-2,3-dihydro-1H-isoindole-4-carboxamide [257, 258]

c. ομοαζαστεροειδής εστέρας του POPA (**ASE**) ή **XE1** στη μελέτη μας, ένας επαρκώς προκλινικά μελετημένος λακταμικός στεροειδής αλκυλιωτής με δομή: 10a,12a-dimethyl-2-oxooctadecahydronaphtho[2,1-f]quinolin-8-yl 2-(4-(bis(2-chloroethyl) amino)phenyl)acetate [243, 246, 251],

d. 3-aminobenzamide (3AB) αναστολέας της PARP [259], κυρίως ως συγκριτικό μόριο για διάφορες πειραματικές μεθόδους,

e. Olaparib φαρμακευτικός PARP αναστολέας με θεραπευτική χρήση [260].

Οι οκτώ νέες ενώσεις είναι οι ακόλουθες (Σχήμα 2, Πίνακας 4):

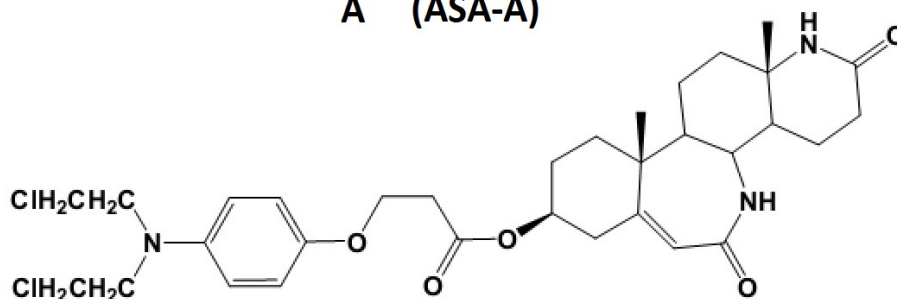


Chemical Formula: $C_{32}H_{42}Cl_2N_2O_5$

Exact Mass: 604,25

Molecular Weight: 605,59

A (ASA-A)

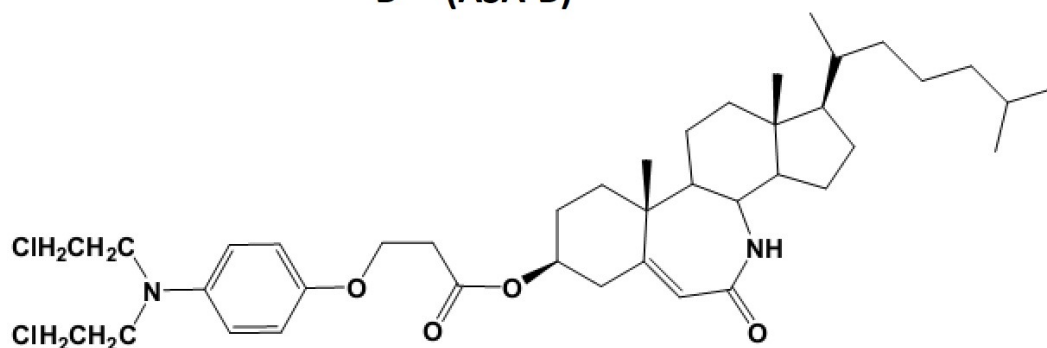


Chemical Formula: $C_{32}H_{43}Cl_2N_3O_5$

Exact Mass: 619,26

Molecular Weight: 620,61

B (ASA-B)

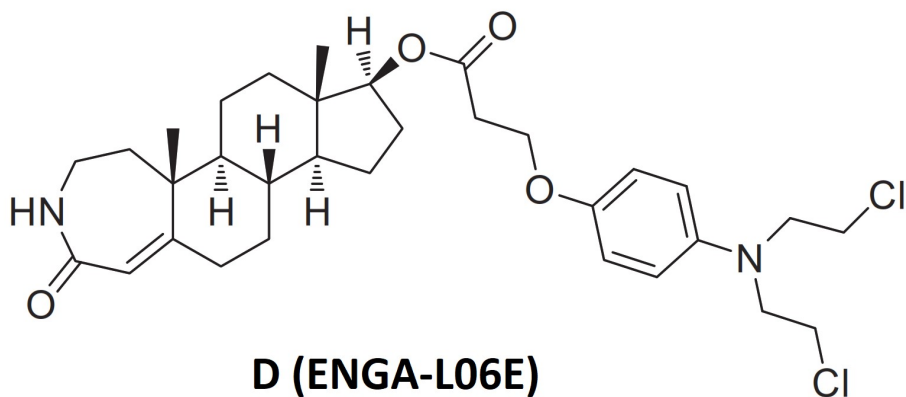


Chemical Formula: $C_{40}H_{60}Cl_2N_2O_4$

Exact Mass: 702,39

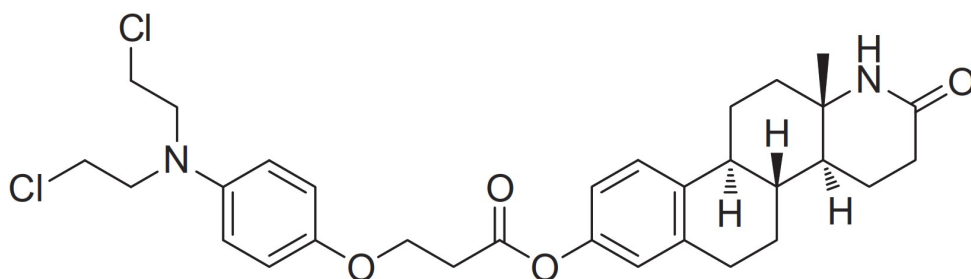
Molecular Weight: 703,82

C (ASA-C)



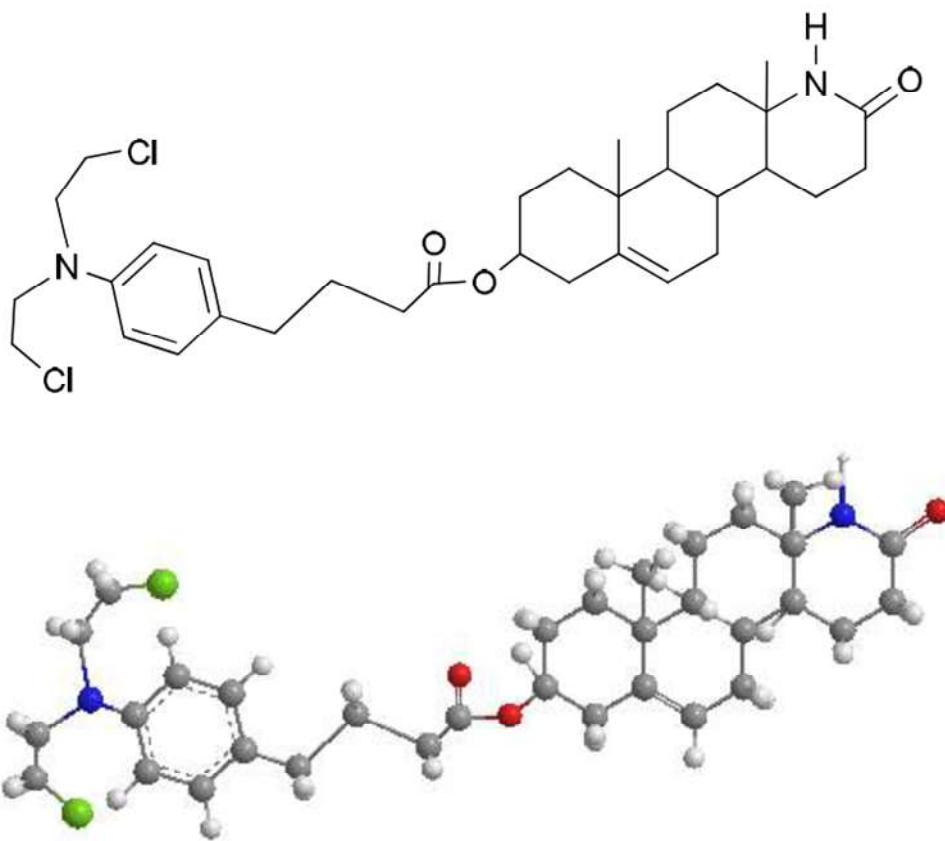
(5aR,5bS,7aS,8S,10aS,10bR)

5a,7a-dimethyl-2oxo-2,3,4,5,5a,5b,6,7,7a,8,9,10,10a,10b,11,12-hexa
decahydrocyclopenta [5,6] naphtho [1,2-d] azepin-8-yl 3-(4-(bis(2-chloroethyl)
amino) phenoxy) propanoate



(4aS,4bR,10bS,12aS)

12a-methyl-2-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,6,10b,11,12,12a dodecahydronaphtho[2,1-f]
quinolin-8-yl 3-(4-(bis(2-chloroethyl)amino) phenoxy) propanoate



Ένωση XE2 (Compound 2, C2 – DAaeSEB/p694.02t)

10a,12a-dimethyl-2-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,7,8,9,10,10a,10b,11,12,12a-hexadecahydronaphtho [2,1-f]quinolin-8-yl 4-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)butanoate

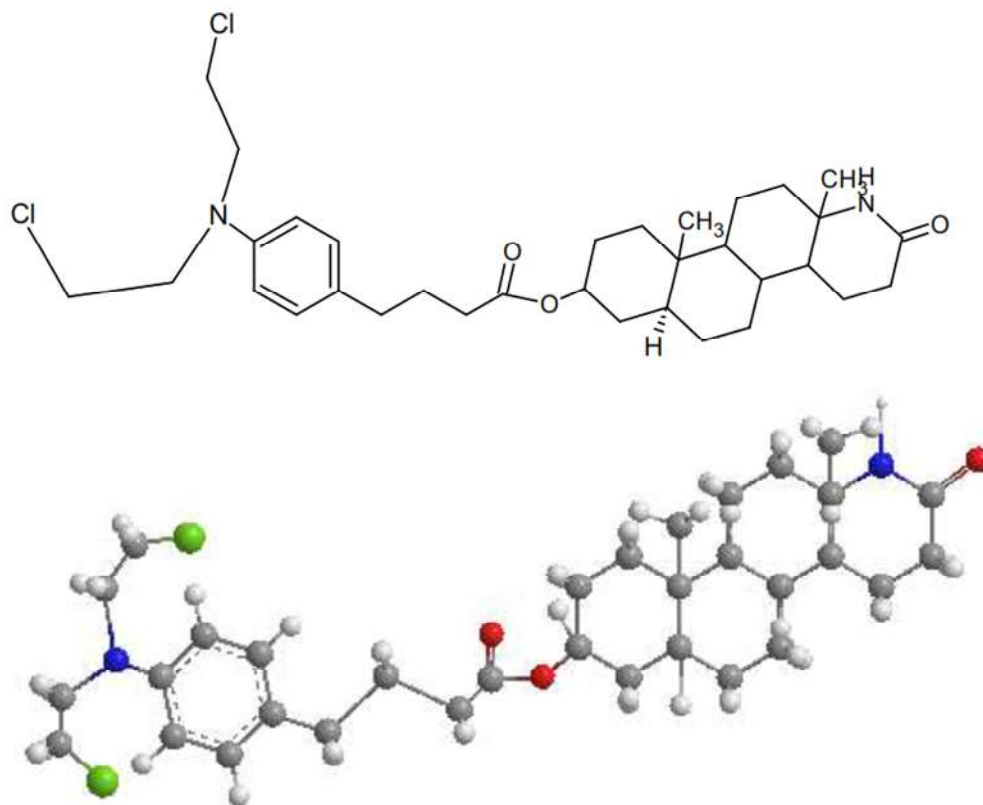
ή

3β-hydroxy-13α-amino-13,17-seco-5-androsten-17-oic-13,17-lactam,p-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenylbutyrate

Chemical Formula: C₃₃H₄₆Cl₂N₂O₃

Exact Mass: 588,29

Molecular Weight: 589,64



Ένωση XE3 (Compound 3, C3 – DAaSEB/p694.03t)

(6aS)-10a,12a-dimethyl-2-oxooctadecahydronaphtho[2,1-f]quinolin-8-yl 4-(4-(bis(2-chloroethyl) amino)phenyl)butanoate

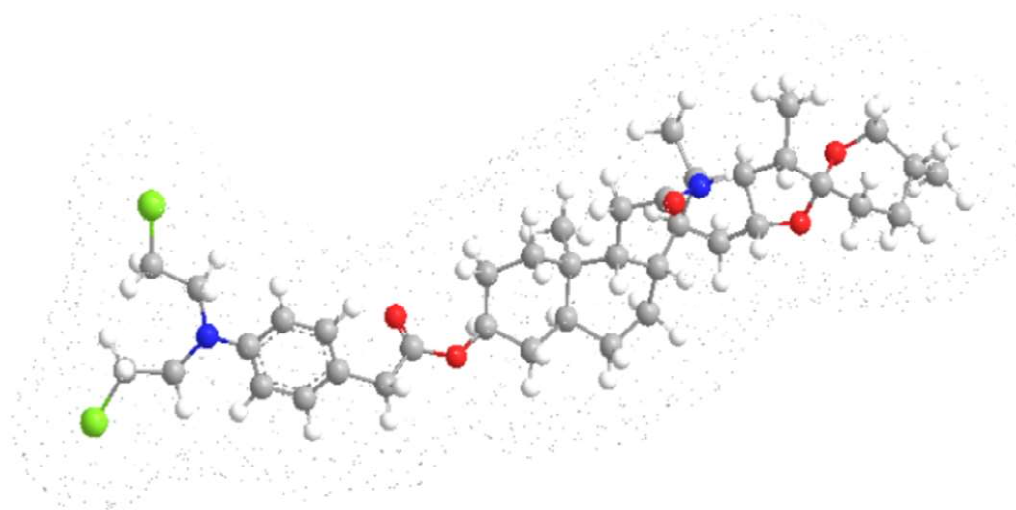
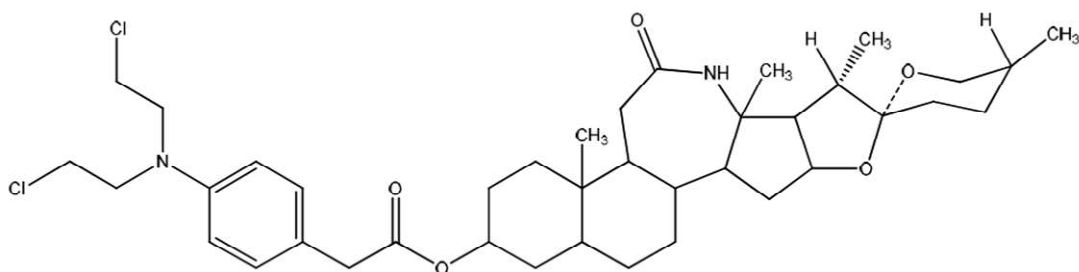
ή

3β-hydroxy-13α-amino-13,17-seco-5α-androstan-17-oic-13,17-lactam,p-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenylbutyrate

Chemical Formula: C₃₃H₄₈Cl₂N₂O₃

Exact Mass: 590,30

Molecular Weight: 591,65



Ένωση XE4 (Compound 4, C4 – DAheSEA/p694.04t)

(5'S,8S)-4a,5',7a,8-tetramethyl-6-oxodocosahydro-1H-spiro[furo[2',3':4,5] cyclopenta[1,2-b] naphtho[2,1-d]azepine-9,2'-pyran]-2-yl 2-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)acetate

ή

3β-hydroxy-12α-aza-C-homo-5α,22α-spirostan-12-one p-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenyl acetate

Molecular Formula: C₃₉H₅₆Cl₂N₂O₅

Formula Weight: 703.77834

Exact Mass: 702,36

Σχήμα 2. Χημικές Δομές και χαρακτηριστικά νεοσυνθετικών ενώσεων A, B, C, D, E, XE2, XE3 και XE4

ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΒΑΣΗ ΛΑΚΤΑΜΙΚΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ	ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ
A (ASA-A)	7a,9a-dimethyl-2,10-dioxo- 1,2,4,5,6,7,7a,7b,8,9,9a,10,11,12,12a,12b- hexadecahydrobenzo[d]indeno[4,5-b]azepin-5-yl 3-(4(bis(2chloroethyl)amino)phenoxy)propanoate	B-lactam- steroid alkylator	Dehydroepiandrosterone (δεϋδροεπιανδροστερόνη)
B (ASA-B)	11a,13a-dimethyl-2,6-dioxo- 2,3,4,4a,4b,5,6,8,9,10,11,11a,11b,12,13,13a- hexadecahydro-1H-benzo[4,5]azepino[2,3- f]quinolin-9-yl 3-(4(bis(2chloroethyl)amino)phenoxy)propanoate	B,D-homo-aza (bilactam)- steroid alkylator	Dehydroepiandrosterone (δεϋδροεπιανδροστερόνη)
C (ASA-C)	7a,9a-dimethyl-10-((R)-6-methylheptan-2-yl)-2- oxo-1,2,4,5,6,7,7a,7b,8,9,9a,10,11,12,12a,12b- hexadecahydrobenzo[d]indeno[4,5-b]azepin-5-yl 3-(4-(bis(2-chloro ethyl)amino)phenoxy)propanoate	B-homo-aza (lactam)- alkylator	5-cholesten-3β-ol-7-one (7-κετοχοληστερόλη, ένα παράγωγο μόριο χοληστερόλης) [261]
D (ENGA- L06E)	5a,7a-dimethyl-2-oxo- 2,3,4,5,5a,5b,6,7,7a,8,9,10,10a,10b,11,12 hexadecahydrocyclopenta[5,6] naphtho[1,2- d]azepin-8-yl3-(4-(bis(2- chloroethyl)amino)phenoxy)propanoate	A-homo-aza (lactam)- alkylator	Testosterone (τεστοστερόνη)
E (ENGA- L08E)	12a-methyl-2-oxo- 1,2,3,4,4a,4b,5,6,10b,11,12,12a- dodecahydronaphtho[2,1-f]quinolin-8-yl 3-(4- (bis(2-chloroethyl)amino)phenoxy) propanoate	D-homo-aza steroid alkylator	Estrone (οιστρόνη)

XE2	<i>3β-hydroxy-13α-amino-13,17-seco-5-androsten-17-oic-13,17-lactam,p-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenylbutyrate</i>	D-homo-aza steroid alkylator	Androstane (ανδροστανίο)
XE3	<i>3β-hydroxy-13α-amino-13,17-seco-5α-androstan-17-oic-13,17-lactam,p-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenylbutyrate</i>	D-homo-aza steroid alkylator	Epiandrosterone (επιανδροστερόνη)
XE4	<i>3β-hydroxy-12α-aza-C-homo-5α,22α-spirostan-12-onep-N,N-bis(2-chloroethyl) amino phenyl acetate</i>	C-homo-aza steroid alkylator	Hecogenin (εκογενίνη)

Πίνακας 4. Ονοματολογία νεοσυνθετικών ενώσεων με τη συντομογραφία τους και τα πρόδρομα/μητρικά τους στεροειδή μόρια.

Τα φαρμακευτικά παράγωγα που προέκυψαν, φαίνεται στα αποτελέσματά μας (παρακάτω) να έχουν υψηλή εκλεκτικότητα και ειδικότητα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων (ή και να τα οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο) συνδυάζοντας ταυτόχρονα ευνοϊκότερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, ώστε να προτείνονται ως δυνητικά αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

7.2 Κυτταρικές σειρές

Τέσσερις κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών στον άνθρωπο χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη για την *in vitro* ανάλυση της βιολογικής δράσης και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των νέων συνθετικών ενώσεων. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, οι ινοβλάστες πνεύμονα MRC-5 (ATCC CCL-171™) [262] που χρησιμοποιούνται συχνά κατά την παραγωγή εμβολίων, για χρήση ως μέτρο αναφοράς της επιλεκτικότητας (ειδικότητας) των μελετούμενων μορίων προς τις μελετούμενες ωοθηκικές καρκινικές σειρές κυττάρων.

Η επιλογή αυτών των καρκινικών κυτταρικών σειρών έγινε με βάση τα χαρακτηριστικά τους, κυρίως όσον αφορά το γενετικό τους υπόβαθρο (δηλ. BRCA, ανδρογόνα και

οιστρογόνα, έκφραση υποδοχέα) (Πίνακας 5) [208]. Αυτά τα κριτήρια επιλογής θεωρούνται απαραίτητα επίσης για τη διερεύνηση της αντοχής στα φάρμακα κατά του καρκίνου των ωοθηκών και την αξιολόγηση της ορμονικής θεραπείας.

Καρκινικός τύπος	Όνομα ανθρώπινης κυτταρικής σειράς	Ογκογονίδια-Μεταλλάξεις	Ειδικά χαρακτηριστικά
Καρκίνωμα ωοθηκών (Επιθηλιακής μορφολογίας)	UWB1.289	p53 (625delAG) BRCA1-null (2594delC)	p53, cytokeratin 7 (CK-7) positive; calretinin positive; Wilms' tumor protein (WT) positive; Estrogen/Progesterone receptor negative; MSS **
Καρκίνωμα ωοθηκών (Επιθηλιακής μορφολογίας)	UWB1.289+BRCA1	p53 (625delAG)	Estrogen/Progesterone receptor negative; MSS **
Αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών (Επιθηλιακής μορφολογίας, ασκίτης)	SK-OV-3 (SKOV-3, SKOV3)	TP53 (p.S90fs) PIK3CA (p.H1047R)	Tumor Necrosis Factor; Diphtheria Toxin; Cisplatin and Adriamycin not sensitive; Estrogen receptor α (ER α) positive / Progesterone receptor negative; MSI-High *
Επιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών	NIH:OVCA-3 (OVCA3)	MEK1 (p.G159R; p.R160K; p.A158) TP53 (p.R248Q)	Androgen/Estrogen/Progesterone receptor positive; Cisplatin, Adriamycin not sensitive; Melphalan resistant; MSS **

* MSI-high: High Microsatellite Instability, ** MSS: Microsatellite stable.

Πίνακας 5. Κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών στον άνθρωπο που επιλέχθηκαν για την *in vitro* ανάλυση της δράσης των νέων ενώσεων.

UWB1.289 (ATCC CRL-2945)

Κύτταρα αδενοκαρκινώματος ωοθηκών ανθρώπου, τα οποία αναπτύσσονται εύκολα σε καλλιέργεια, δημιουργώντας μονόστρωμα, έχουν μορφολογία επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων και δεν εκφράζουν τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς. Επίσης τα κύτταρα UWB1.289 έχουν μεταλλαγμένο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, δεν διαθέτουν το γονίδιο *BRCA1* και είναι θετικά στην έκφραση των cytokeratin 7 (CK-7),

calretinin και Wilms' tumor protein (WT). Τέλος είναι ευαίσθητα στην ιοντίζουσα ακτινοβολία [208, 263].

UBWB1.289+BRCA1 (ATCC CRL-2946)

Κύτταρα αδеноκαρκινώματος ωοθηκών ανθρώπου, τα οποία προέρχονται από τα UBWB1.289, στα οποία έχει αποκατασταθεί η ύπαρξη του *BRCA1* γονιδίου. Αναπτύσσονται εύκολα σε καλλιέργεια, δημιουργώντας μονόστρωμα, έχουν μορφολογία επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων και δεν εκφράζουν τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς. Επίσης τα κύτταρα αυτά έχουν μεταλλαγμένο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, και είναι θετικά στην έκφραση των cytokeratin 7 (CK-7), calretinin και Wilms' tumor protein (WT) [208].

SK-OV-3 (SKOV-3) (ATCC HTB 77)

Κύτταρα αδеноκαρκινώματος ωοθηκών ανθρώπου, τα οποία αναπτύσσονται εύκολα σε καλλιέργεια, δημιουργώντας μονόστρωμα, έχουν μορφολογία επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων και είναι ανθεκτικά στην δράση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) καθώς και της αδριαμυκίνης και cis-πλατίνας. Όταν εμφυτευτούν υποδορίως SKOV-3 κύτταρα σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (nude mice), αναπτύσσεται όγκος μετρίως διαφοροποιημένος, και το μοντέλο που προκύπτει προσομοιάζει με πρωτογενές αδеноκαρκίνωμα των ωοθηκών στον άνθρωπο [263–265].

NIH: OVCAR-3 (ATCC HTB-161)

Κύτταρα αδеноκαρκινώματος ωοθηκών ανθρώπου, τα οποία απομονώθηκαν 1982 από τον T.C. Hamilton και τους συνεργάτες του. Τα OVCAR-3 κύτταρα αναπτύσσονται εύκολα σε καλλιέργεια, δημιουργώντας μονόστρωμα, έχουν μορφολογία επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων και εκφράζουν οιστρογονικούς, προγεστερονικούς και ανδρογονικούς υποδοχείς, ενώ είναι ανθεκτικά στην δράση της αδριαμυκίνης, μελφαλάνης και cis-πλατίνας. Όταν εμφυτευτούν 107 κύτταρα OVCAR-3 υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (nude mice), αναπτύσσεται όγκος σε 21 ημέρες περίπου, και το μοντέλο που προκύπτει προσομοιάζει με τον καρκίνο των ωοθηκών στον άνθρωπο [266–272].

8. ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 *In silico* εκτίμηση των νέων μορίων ως πιθανών φαρμακευτικών ουσιών και χημική σύνθεση

Η *in silico* μεθοδολογία περιλαμβάνει τη μελέτη των χημικών, βιοχημικών, φυσικών και δομικών/τοπολογικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών- στόχων (εδώ των *PARP-1/2*) μέσω υπολογιστικών μοντέλων και μεθόδων βιοπληροφορικής. Αυτή η μέθοδος σχεδιασμού μέσω ανάλυσης της δομής της πρωτεΐνης-στόχου (structure-based drug design / SBDD) περιλαμβάνει πέρα από τη μελέτη της ίδιας της πρωτεΐνης σε υπολογιστικό μοντέλο, τη μελέτη σύνδεσης (docking) και μοριακής μοντελοποίησης (molecular modeling) των μορίων-προσδετών (πιθανών αναστολέων) με την πρωτεΐνη σε ευρεία και ταχεία κλίμακα, για λόγους ανάλυσης της δυνατότητας και της σταθερότητας της σύνδεσης, των διαμοριακών τροποποιήσεων. Επίσης, οι ADME (Απορρόφηση-Κατανομή-Μεταβολισμός-Αποβολή) ιδιότητες/ προβλέψεις, η προβλέψη της τοξικότητας και ο έλεγχος της βάσης δεδομένων (database screening) είναι χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση των βιολογικών υποδοχέων και βιοενεργών μορίων-προσδετών, όπως προαναφέρθηκε. Όλα τα παραπάνω μαζί με κάποια ακόμα ψηφιακά- μοντελικά εργαλεία (QSAR ανάλυση, Conformational search, κλπ) αποτελούν τμήματα των εξειδικευμένων λογισμικών προγραμμάτων ("suites") που υπάρχουν σήμερα (δωρεάν ή επί πληρωμή) κάποια από τα οποία (όπως το MAESTRO της εταιρείας SCHRODINGER που χρησιμοποιήθηκε ως κύριο λογισμικό για την παρούσα μελέτη, κ.α.) εντάχθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία για τους προαναφερθέντες σκοπούς.

Προκειμένου να μειωθεί η τοξικότητα και να ενισχυθεί η αντικαρκινική δράση των νέων αζωτούχων στεροειδών μορίων που εξετάστηκαν, έγιναν αρχικά *in silico* (υπολογιστικές) μελέτες ώστε να επιλεγθούν οι πιο δραστικοί λακταμικοί (αζωτούχοι) αλκυλιωτικοί εστέρες, μονολακτάμες ή διλακτάμες, και να συντεθούν στο επόμενο στάδιο.

8.1.1 Υπολογιστικές τεχνικές ελέγχου φαρμακολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων

Κατά το πειραματικό μέρος της *in silico* μελέτης εκτιμήθηκε το φαρμακοκινητικό προφίλ των νέων υβριδικών στεροειδών ενώσεων ASE (ή XE1), A, B, C, D, E, XE2, XE3, XE4 και του

αλκυλιωτικού μορίου PA με μελέτες πρόβλεψης ADME/Tox (Absorption-απορρόφηση, Distribution- κατανομή σε ιστούς, Metabolism- μεταβολισμός, Excretion- απέκκριση & Toxicity- τοξικολογικό προφίλ) μέσω σύγχρονων μεθόδων μοριακής προσομοίωσης με χρήση του ειδικού λογισμικού QikProp από την εταιρεία Schrödinger [231, 273]. Οι προβλέψεις των προγραμμάτων όπως το QikProp βασίζονται σε αξιόπιστα φίλτρα ελέγχου για τις ιδιότητες ADMET (π.χ η διαλυτότητα, η διαπερατότητα, η βιοκατανομή, η τοξικότητα κλπ), αλλά σχετίζονται και με τη χημική δομή των εξεταζόμενων ενώσεων και την αντιπαράβολή τους με μεγάλες βάσεις δεδομένων με τιμές ιδιοτήτων γνωστών ουσιών ή φαρμάκων, που περιλαμβάνονται στα λογισμικά. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο τοξικολογικό δυναμικό, στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και στη βιοδιαθεσιμότητα των νέων φαρμάκων [274], με έμφαση στην ανακάλυψη κατάλληλων «φίλτρων» μέτρησης της απορρόφησης για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας [228, 275] και τεχνικών μέτρησης της διαλυτότητας (υδατοδιαλυτότητα και λιποφιλικότητα των μορίων) [224, 228]. Όλα τα παραπάνω, ως ιδιότητες των μελετούμενων ενώσεων, στα υπολογιστικά προγράμματα παραθέτονται ως «περιγραφείς» ιδιοτήτων.

Για τη διερεύνηση των προαναφερθέντων χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή, δύο γρήγορα, ακριβή και τεκμηριωμένα προγράμματα προβλέψεων ADME(T):

1. Το QikProp, υπολογιστικό της ευρύτερης πλατφόρμας MAESTRO από την εταιρεία Schrödinger (που σχεδιάστηκε από τον καθηγητή William L. Jorgensen).

Συνοπτικά, το QikProp βασίζει τις προβλέψεις του στην πλήρη 3D (τριδιάστατη) μοριακή δομή των ενώσεων, επιτρέπει τον έλεγχο για παραβιάσεις των κανόνων του Lipinski (rule-of-five) και του Jorgensen (rule-of-three) ώστε να παρέχει ένα μέτρο πιθανότητας φαρμακοποίησης μιας εξεταζόμενης ουσίας, ενώ δέχεται μια ευρεία γκάμα αρχείων σε διάφορες μορφές ως εισαγωγικά αρχεία στο πρόγραμμα (input formats), συμπεριλαμβανομένων των αρχείων Maestro, αρχεία MDL SD, και αρχεία PDB. Οι υπολογισμοί είναι εύκολο να ξεκινήσουν και να πραγματοποιηθούν, και τα αποτελέσματα μπορούν να μελετηθούν και να αναλυθούν χρησιμοποιώντας το περιβάλλον εργασίας του Maestro. Κατά την εκτέλεση αξιολόγησης μιας ένωσης, το QikProp αναλύει γρήγορα είδη ατόμων και φορτία, αριθμήσεις στροφών καθώς επίσης όγκο μορίου και εμβαδόν της επιφάνειάς του. Στη συνέχεια χρησιμοποιεί τις

πληροφορίες αυτές, μαζί με τους φυσικούς περιγραφείς που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με ορισμένους ειδικούς αλγόριθμους, σε εξισώσεις παλινδρόμησης, ενώ χρησιμοποιεί ομοιότητα στον χώρο των ιδιοτήτων προκειμένου να βελτιώσει τις προβλέψεις των ιδιοτήτων «κλειδιά», και να αλιεύσει όμοια μόρια από μια βάση δεδομένων. Το αποτέλεσμα είναι μια ακριβής πρόβλεψη των σχετικών φαρμακολογικών ιδιοτήτων ενός μορίου [231, 273, 276].

2. Το “module” “ADMET” από το ACCELRYs Discovery Studio μόνο για τις προειδοποιήσεις πιθανής υπερβολικής τοξικότητας λόγω δομής, που υπολογίζονται συνοπτικά αξιολογώντας τα αποτελέσματα του module ADMET TOXICITY Predictions (Predictive Toxicology, TOPKAT και Extensive toxicity modules) από το ACCELRYs Discovery Studio [277].

Οι περιγραφείς προβλέψεων (ιδιότητες) που παραθέτονται στη μελέτη επιλέχθηκαν λόγω της σημασίας τους ανάμεσα σε πλήθος άλλων, για τη διερεύνηση της πιθανότητας φαρμακοποίησης νέων ενώσεων, όπως εμφανίζονται σε πολλές φαρμακευτικές μελέτες ADME(T), και αποτελούν τους κύριους ακολουθούμενους κανόνες (όπως αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 5.1.2: κανόνας των πέντε του Lipinski - κανόνας τριών του Jorgensen - κανόνες του Veber) [223, 224, 232].

Παρακάτω παραθέτονται οι συντομογραφίες των περιγραφέων και οι αντίστοιχες ιδιότητες, όπως θα τεθούν προς αξιολόγηση στον συγκεντρωτικό πίνακα των αποτελεσμάτων των ADME(T):

1. MW = Μοριακό βάρος
2. Num. H-bond donors = Δότες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου με ένα ή περισσότερα άτομα υδρογόνου)
3. Num. H-bond acceptors = Δέκτες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου)
4. log P = Συντελεστής διαχωρισμού οκτανόλης-νερού
5. Caco-2 perm. = Διαπερατότητα των Caco-2 κυττάρων (χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη εντερο-αιματική παρεμπόδιση [229, 275])
6. Log S = συντελεστής της υδατοδιαλυτότητας
7. Num. Prim. Metab = Αρχικοί μεταβολίτες
8. Num. Rot. Bonds = ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή

9. PSA = το εμβαδόν της επιφάνειας ($\text{\AA}^2$) van der Waals πολικών N και O ατόμων (σχετίζεται καλύτερα με την αύξηση στον ρυθμό διαπερατότητας απ' ό,τι η λιποφιλικότητα [232, 234, 278])
10. Hbond donor/ accept = το συνολικό άθροισμα των δοτών και των δεκτών υδρογονικών δεσμών
11. LogK_hsa = η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού.
12. Log BB = ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού

Ο Κανόνας των Πέντε του Lipinski γενικά είναι ο βασικότερος (με μια παραβίαση κατά το μέγιστο) και ισχύει για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, όμως ακολουθείται και ως γενικός κανόνας για μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα. Μόρια με λιγότερες παραβιάσεις στον κανόνα του Jorgensen είναι πιθανότερο να είναι κατάλληλοι για φαρμακοτεχνική μορφή από το στόμα [224, 273], ενώ στην περίπτωση των κανόνων του Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφές <10 και (2) η PSA <140 $\text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο.

8.1.2 Μεθοδολογία *in silico* αξιολόγησης της ανασταλτικής δράσης των νέων μορίων έναντι των *PARP-1* και *PARP-2*

8.1.2.α Επιλογή της κρυσταλλικής δομής του πρωτεϊνικού στόχου και προετοιμασία

Οι δομές των πρωτεϊνών λαμβάνονται σε κατάλληλα αρχεία τύπου pdb για τη χρήση σε προγράμματα, από το RCSB Protein Data Bank (PDB), μια ηλεκτρονική "αποθήκη" για τρισδιάστατα δομικά/ μορφολογικά στοιχεία πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, που λειτουργεί από το "Research Collaboratory for Structural Bioinformatics": <https://www.rcsb.org/>). Κοινός στόχος τέτοιων «βιβλιοθηκών» είναι η άμεση παροχή στους ερευνητές, γνωστών δομικών στοιχείων των βιομορίων-στόχων για τον πιο εύκολο και ευρύ σχεδιασμό νέων μορίων-προσδετών ή και την τροποποίηση ήδη γνωστών ενώσεων. Πλέον, υπάρχει άλλωστε πληθώρα κρυσταλλογραφημένων (από τεχνικές μελέτης/ ανακρυστάλλωσης) πρωτεϊνών για χρήση σε *in silico* μελέτες. Τέλος, πολλές φορές στα PDB αρχεία, υπάρχει ένας «εγγενής» ή «τυπικός» προσδέτης ο οποίος βρίσκεται κρυσταλλοποιημένος μαζί με την πρωτεΐνη και αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για την

προτίμηση χρήσης ενός αρχείου, καθώς υποδεικνύει στις περισσότερες περιπτώσεις το ενεργό της κέντρο, συνήθη βασικό στόχο των εξεταζόμενων ενώσεων (ή έστω μια πιθανή θέση πρόσδεσης, αλλοστερική ή άλλη).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, και σύμφωνα με τα παραπάνω, επιλέχθηκαν ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα τα εξής:

- Για την *PARP-1* επιλέχθηκε το αρχείο PDB 3L3L (DOI: 10.2210/pdb3L3L/pdb), αγρίου τύπου βιομόριο σε σύμπλοκο με τον αναστολέα «A906894» ή L3L, ο οποίος για τις ανάγκες της εργασίας θα αναφέρεται ως «3L3L», δηλαδή κατά το όνομα του PDB αρχείου που επιλέχθηκε.
- Ομοίως για την *PARP-2* επιλέχθηκε το αρχείο PDB 4TVJ (DOI: 10.2210/pdb4TVJ/pdb), δομή μόνο του καταλυτικού κέντρου της πρωτεΐνης, σε σύμπλοκο με τον αναστολέα Olaparib, γνωστός PARP αναστολέας με φαρμακευτική χρήση [260]

8.1.2.β Τεχνικές Μοριακής Πρόσδεσης (*In silico* υπολογιστικές τεχνικές)

Με την επιλογή κατάλληλων πρωτεϊνικών δομών *PARP-1/2* από την PDB, οι πρωτεΐνες-στόχοι αλλά και τα μόρια- προσδέτες υπόκεινται στη διαδικασία ελαχιστοποίησης της ενέργειάς τους και ορίζεται η περιοχή της πρωτεΐνης που αποτελεί στόχο των μορίων ως σημείο σύνδεσης κατά την προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης (θέση πρόσδεσης). Τέλος γίνεται επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπου αποδεκτά θέτονται τα σύμπλοκα πρωτεϊνών με τα προσδεδεμένα μόρια με την χαμηλότερη ενέργεια σύνδεσης (που είναι και το επιθυμητό και αποτελεί μέτρο σύγκρισης μεταξύ της ανασταλτικής ικανότητας στην ίδια πρωτεΐνη των διάφορων μορίων) και μπορεί επίσης να καταγράφονται οι δεσμοί μεταξύ του μορίου – προσδέτη και των καταλοίπων αμινοξέων της πρωτεΐνης – στόχου.

8.1.2.γ Προετοιμασία του υποστρώματος πρωτεΐνης - στόχου

Η προετοιμασία των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση του υποπρογράμματος «Protein Preparation Wizard» (Protein Preparation Wizard; Epic, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2014) της πλατφόρμας MAESTRO. Κατ' αρχάς, καθορίστηκαν η κατάλληλη τάξη δεσμού, η κατάσταση ιονισμού και έγινε ρύθμιση φορτίων. Έπειτα ακολούθησε η

απομάκρυνση όλων των μορίων H₂O και η ελαχιστοποίηση της ενέργειας μέσω του OPLS3 “force-field” της πλατφόρμας MAESTRO (Ο όρος “force-field”, ορίζει στα πλαίσια της μοριακής μοντελοποίησης, τη μορφή και τις παραμέτρους των μαθηματικών συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την δυναμική ενέργεια ενός συστήματος σωματιδίων, μορίων ή ατόμων, ενώ η λειτουργικότητά του βασίζεται σε πειραματικές τιμές και υψηλού επιπέδου υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής).

Το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών *PARP-1/2* αποτελεί το στόχο των υποψήφιων αναστολέων στην παρούσα μελέτη, οπότε ο κρυσταλλοποιημένος με την κάθε επιλεγμένη πρωτεΐνη αναστολέας καθορίζει και το σημείο πρόσδεσης, λαμβάνοντας υπόψιν χωροταξικές διαφορές εξαιτίας των διαφορών στις δομές των προσδετών σε σχέση με τα «εγγενή» (κρυσταλλοποιημένα) μόρια, κάτι που καθορίζεται με την αυξομείωση του μεγέθους του grid box (σε κάποιες περιπτώσεις ήταν απαραίτητη η δημιουργία πλαισίου αναγνώρισης στη θέση πρόσδεσης -GRID- στην ίδια θέση, αλλά με δυνατότητα μεγαλύτερης κίνησης και καλύτερης τοποθέτησης του μορίου-προσδέτη μέσω αλληλεπιδράσεων στο σημείο σύνδεσης, για «εύκαμπτα» μόρια-προσδέτες). Τέλος, η προετοιμασία της κάθε πρωτεΐνης, έγινε σε ουδέτερο pH με τη χρήση του προγράμματος PROPKA της πλατφόρμας MAESTRO.

8.1.2.δ Προετοιμασία μορίων- προσδετών

Η διαδικασία προετοιμασίας με τη βοήθεια του LigPrep (LigPrep, Schrodinger, New York, NY, 2014), υπορουτίνας της πλατφόρμας MAESTRO είναι κοινή για όλες τις υβριδικές ενώσεις που συντέθηκαν υπολογιστικά (νέα στεροειδικά μόρια αλλά και τον αλκυλιωτικό παράγοντα PA, το 3L3L και το 3AB). Τα μόρια εν αρχή σχεδιάστηκαν με το εργαλείο 2D Sketcher, μετατράπηκαν σε 3D μορφή και ακολούθησε κατάλληλη προετοιμασία με το Ligprep. Η διαδικασία έχει συνοπτικά τα εξής διακριτά βήματα: ελαχιστοποίηση ενέργειας, διαδικασία προσθήκης ατόμων υδρογόνου, δημιουργία δυναμικών ιονισμού, καθορισμό κατάλληλων δεσμών και γωνιών στρέψης, διόρθωση χειρομορφίας και στερεοχημείας και διαμόρφωση δακτυλίων. Και για τις δύο μελετούμενες πρωτεΐνες-στόχους, όλες οι ενώσεις τέθηκαν σε ουδέτερο pH και μηδενικό ηλεκτρικό φορτίο για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς οι πρωτεΐνες δε φέρουν μέταλλα ή άλλα σημαντικά στοιχεία που να απαιτούν προσαρμογή του pH ή του ιονισμού.

Η μονάδα επαγόμενης προσαρμογής πρόσδεσης (induced fit docking, IFD) Glide (Grid-based ligand docking with energetics) της σουίτας προγραμμάτων Schrodinger-Maestro χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των μελετών πρόσδεσης μετά το τέλος των παραπάνω διαδικασιών (προηγήθηκε όμως μετά την προετοιμασία των προσδετών, ο έλεγχος ADME μέσω του QikProp, από όπου απορρίφθηκαν οι ενώσεις ΧΕ2, ΧΕ3, ΧΕ4 πριν το στάδιο του Glide «docking», όπως θα αναλυθεί στα αποτελέσματα).

8.1.2.ε Ανάλυση αποτελεσμάτων - Μοριακή Πρόσδεση με το Glide

Το Glide της εταιρίας Schrödinger είναι ένα πρόγραμμα που εξετάζει τη λειτουργία μοντελικής μοριακής σύνδεσης προσδετών (ligand docking program) και αποτελεί ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα λογισμικά μοριακής πρόσδεσης βιομηχανικά και ερευνητικά. Μέσω μιας διαδικασίας εικονικής/ ψηφιακής διαλογής υψηλής απόδοσης (virtual highthroughput screening) πραγματοποιεί προβλέψεις για τους τρόπους που συνδέεται ένα μόριο-προσδέτης με μια πρωτεΐνη-στόχο (binding modes) και κατατάσει τους εν δυνάμει προσδέτες σύμφωνα με κάποια κριτήρια (ranking). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές λειτουργίες βαθμολόγησης (scoring functions), τις SP, XP και HTVS GlideScore, δημιουργεί σειρά κατάταξης (rank-order) για τις εξεταζόμενες ενώσεις [279].

Το μελετούμενο «σημείο» πρόσδεσης (υποδοχέας) μπορεί να είναι πρωτεΐνη ή ακόμα κι ένα μη πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Η πρόσδεση μπορεί να γίνει με δυο τρόπους: ο προσδέτης να θεωρηθεί άκαμπτο μόριο οπότε προσδένεται στον υποδοχέα χωρίς να τροποποιείται καθόλου η τρισδιάστατη δομή του από πιθανές αλληλέπιδράσεις, ή εύκαμπτο μόριο, οπότε και δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων της 3D δομής του προσδέτη με σκοπό να «ταιριάξει» καλύτερα στο χώρο επαφής, πριν ξεκινήσει η πρόσδεση (πολύπλοκες μαθηματικές εξισώσεις και πεδία ορισμού πλαισιώνουν την όλη διαδικασία, χωρίς όμως να εμπλέκεται ο χρήστης σε αυτό). Ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (σταθερή δομή - επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων) σε όλη τη διαδικασία [280].

Οι διαμορφώσεις που εξάγονται από τη χρήση του προγράμματος αξιολογούνται και ιεραρχούνται με μια σειρά φίλτρων (πολύπλοκων εξισώσεων και πεδίων δυνάμεων), όπου εκτιμάται η ικανότητα πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο [281].

Στον αλγόριθμο του Glide, πραγματοποιείται εκτεταμένη αναζήτηση διαμορφώσεων (μπορεί να οριστεί μέγιστος αριθμός) όταν είναι δεδομένη η ευκαμψία του προσδέτη και απορρίπτονται οι διαμορφώσεις που δεν προσομοιάζουν δομικά στην πρωτεϊνική κοιλότητα που αποτελεί στόχο πρόσδεσης.

Διαφοροποιήσεις των λειτουργιών βαθμολόγησης GlideScore και Emodel

Το GlideScore αποτελεί μια εμπειρική λειτουργία βαθμολόγησης (scoring function). Προσεγγίζει την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding free energy) μέσω κριτηρίων, όπως το σύνολο των αλληλεπιδράσεων των πεδίων δυνάμεων (force fields), ηλεκτροστατικών και δυνάμεων van der Waals. Έχει ιδιαίτερη χρησιμότητα για την πρόβλεψη της συγγένειας δέσμευσης (binding affinity) καθώς έχει πλούσια βάση δεδομένων και βελτιστοποιημένη ακρίβεια ως προς την πρόσδεση. Στο GlideScore, όσο πιο χαμηλές (δηλαδή περισσότερο αρνητικές) είναι οι τιμές, τόσο πιο ισχυρή θεωρείται η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα, καθώς προσομοιώνει την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, γι αυτό και έχει σημαντική χρήση ως προς την κατάταξη της ικανότητας και του τρόπου (poses) σύνδεσης διαφορετικών προσδετών, σε τεχνικές γρήγορης εικονικής διαλογής (ιδιαίτερα αν είναι κι αυξημένος ο αριθμός των πιθανών προσδετών, οπότε διευκολύνεται η διαλογή τους). Ενώ το XP GlideScore μοιράζεται πολλούς όρους με το SP και το HTVS GlideScore, υπάρχουν σημαντικές διαφορές γιατί ως αλγόριθμοι έχουν βελτιστοποιηθεί ξεχωριστά. Ως αποτέλεσμα, αυτά τα δύο είδη GlideScores δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα (το HTVS χρησιμοποιείται κυρίως για ταχύτατη σύγκριση μεγάλου πλήθους μορίων ως πιθανών προσδετών για μια θέση πρόσδεσης, δηλαδή «virtual screening», γι αυτό και έχει πιο επισφαλή αποτελέσματα).

Το Emodel, αποτελεί ένα άλλο μέτρο σύγκρισης μεταξύ προσδετών. Εν τούτοις, επειδή σχετίζεται με τα επιμέρους δεδομένα των πεδίων δυνάμεων (ηλεκτροστατικών και van der Waals), είναι μάλλον προτιμότερο για τη σύγκριση «διαμορφομερών» (conformers- διαμορφώσεις της τρισδιάστατης δομής) ενός μορίου- πιθανού προσδέτη, και λιγότερο κατάλληλο για τη σύγκριση διαφορετικών χημικών δομών (chemically-distinct species). Το Glide χρησιμοποιεί κατά αυτόν τον τρόπο το Emodel για την επιλογή καλύτερων «στάσεων» (poses) πρόσδεσης ενός προσδέτη και στη συνέχεια συγκρίνονται και κατατάσσονται αυτές μεταξύ τους μέσω του GlideScore. Στο Glide XP, επίσης

χρησιμοποιούνται τα GlideScore και Emodel, όμως η διαδικασία επιλογής στάσης σύνδεσης είναι λίγο πιο περίπλοκη, καθώς εδώ υφίσταται μια ιδιότητα "XP PoseRank" για τις τον καλύτερο τρόπο σύνδεσης, η οποία εμφανίζει πώς το Glide XP έχει κατατάξει τις θέσεις σύνδεσης ενός μορίου-προσδέτη. Το HTVS τέλος, δουλεύει περίπου όπως το SP, με λιγότερο όμως αξιόπιστα αποτελέσματα, λόγω ταχύτητας διαλογής μορίων [281, 282].

Η συνάρτηση βαθμονόμησης στο λογισμικό XP Glide παρέχεται από την παρακάτω εξίσωση: $XP\ Glide\ Score = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty}$.

Οι όροι που προσδιορίζουν μια ευνοϊκή πρόσδεση είναι:

$$E_{bind} = E_{hyd_enclosure} + E_{hb_nn_motif} + E_{hb_cc_motif} + E_{PI} + E_{hb_pair} + E_{phobic_pair}.$$

Οι όροι που παρεμποδίζουν την πρόσδεση είναι:

$$E_{penalty} = E_{desolv} + E_{ligand_strain}$$

Όπου:

$E_{hyd_enclosure}$ = Ενέργεια υδροφοβικού εγκλεισμού (Hydrophobic enclosure reward),

$E_{hb_nn_motif}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από ουδέτερα άτομα,

$E_{hb_cc_motif}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από φορτισμένα άτομα (Chemscore Hbond term),

E_{PI} = Ενέργεια π-κατιονικών αλληλεπιδράσεων (π-cation interactions),

E_{hb_pair} (EH-Bond_Pair) = Ενέργεια ζευγών ατόμων που σχετίζονται με υδρογονικούς δεσμούς.

E_{phobic_pair} = Ενέργεια από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε κυρίως το Glide docking score, ένα ανάλογο των παραπάνω περιγραφόμενων μεγεθών όπως το Glidescore, με εξαγωγή και μετρήσιμη τιμή, για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων πρόσδεσης των υπό μελέτη μορίων στα ενεργά κέντρα των *PARP-1/2* [281]. Κι εδώ η χαμηλότερη τιμή ενέργειας (αρνητικές τιμές, κατά απόλυτο αριθμό η μεγαλύτερη τιμή δείχνει την καλύτερη σύνδεση) δείχνει καλύτερο

βαθμό πρόσδεσης του συμπλόκου πρωτεΐνη-προσδέτη, και είναι ακριβώς ίδιες τιμές με το Glidescore σε περίπτωση απλών μορίων και συνηθισμένων υποστρωμάτων (π.χ. όχι μεταλλοπρωτεΐνες κλπ), όπως συνέβη και στην περίπτωση αυτής της μελέτης. Το Glide docking score, «περιέχει» όλους τους περιγραφείς που αφορούν το Glide και τη μοριακή πρόσδεση όπως υπολογίζεται από αυτό το πρόγραμμα, και ουσιαστικά αποτελεί ένα κατά μέσο όρο ενιαίο μέτρο σύγκρισης μεταξύ των διάφορων μορίων ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους στην πρωτεΐνη-στόχο.

Επίσης, το επίπεδο XP αν και απαιτεί μεγαλύτερη χρονική διάρκεια για παράγει αποτελέσματα, δίνει εν τούτοις υψηλότερης ακρίβειας αποτελέσματα καθώς δύναται να απορρίπτει εσφαλμένες «θετικές» βαθμολογίες (false positives). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου XP, στον αλγόριθμο τοποθετούνται αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και δομείται το μόριο δεσμό προς δεσμό. Τα δομικά αποτελέσματα που προκύπτουν, υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης XP [282].

Για τη δική μας μελέτη (αλλά και όπως συχνά συνηθίζεται λόγω μικρής διάρκειας του συνόλου των διαδικασιών) χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός των μεθόδων SP (standard precision), HTVS (high throughput virtual screening) και XP (extra precision), λαμβάνοντας αρχικά αρκετές διαμορφώσεις προσδεόμενες στο ενεργό κέντρο, μετά επιλέχθηκαν τα ευνοϊκότερα συμπλόκα προσδέτη-υποδοχέα και εφαρμόστηκε σε αυτά η λειτουργία XP docking για βελτίωση των τελικών αποτελεσμάτων.

Maestro properties generated by HTVS and SP docking runs.

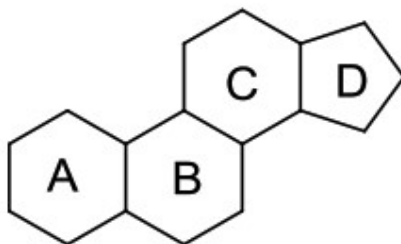
Property	Description
glide lignum	Ligand number
docking score	Docking score, including all additional terms.
glide gscore	GlideScore
glide lipo	Lipophilic contact plus phobic attractive term in the GlideScore.
glide hbond	Hydrogen-bonding term in the GlideScore.
glide metal	Metal-binding term in the GlideScore.
glide rewards	Various reward or penalty terms
glide intrahb reward	Rewards for ligand intramolecular hydrogen bonds. Also included in glide rewards.
glide evdw	Van der Waals energy.
glide ecoul	Coulomb energy.
glide erotb	Penalty for freezing rotatable bonds in the GlideScore.
glide esite	Term in the GlideScore for polar interactions in the active site.
glide emodel	Model energy, Emodel.
glide energy	Modified Coulomb-van der Waals interaction energy
glide einternal	Internal torsional energy
ligand efficiency	GlideScore / (number of heavy atoms)
ligand efficiency sa	GlideScore/ (number of heavy atoms) ^{2/3} . This efficiency metric approximates the effect of surface area.
ligand efficiency ln	GlideScore/(1 + ln(number of heavy atoms))
glide confnum	Conformer index for the pose
glide posenum	Pose index of the pose
glide RMSD to input	RMSD between the docked poses and the input geometries. Only present if Compute RMSD to input ligand geometries was selected in the Output tab.
conssat <i>constraint</i>	Boolean reporting whether the constraint labeled <i>constraint</i> was satisfied. The label includes the name specified for the constraint, and if multiple constraint groups were used, includes a suffix (Group <i>n</i>) to indicate the group in which the constraint was satisfied.

Εικόνα 8.1. Ιδιότητες/ περιγραφείς της μοριακής πρόσδεσης όπως παράγονται από το υπολογίζονται από το Glide (docking) [273]

8.1.3 Σύνθεση νέων ενώσεων

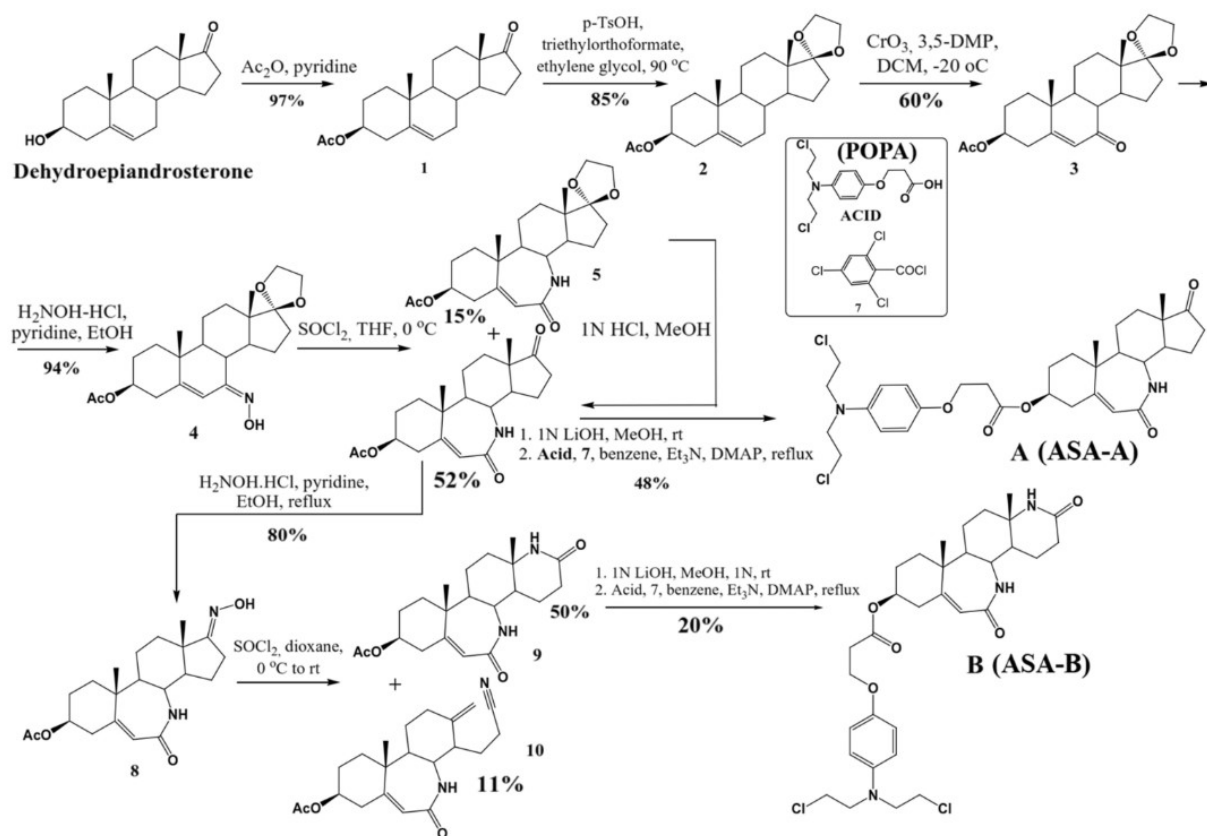
Η χημική μελέτη έγινε με κριτήρια: το εφικτό της χημικής σύνθεσης, την υψηλή συνθετική απόδοση, το κόστος της σύνθεσης. Κατόπιν των προαναφερομένων μελετών ADME-Tox και μοριακής πρόσδεσης, ακολουθώντας τον ορθολογικό σχεδιασμό και για λόγους οικονομίας των υλικών, βάση των παραπάνω περιγεγραμμένων *in silico* διαδικασιών, αποφασίστηκε η χημική σύνθεση τεσσάρων μονολακταμικών εστέρων (A, C, D, E) και μιας διλακτάμης (ένωση B - B,D-bilactam), καθώς οι ενώσεις ΧΕ2, ΧΕ3 και ΧΕ4 (μονολακταμικοί εστέρες του ανδροστανίου, της επανδροστερόνης και της εκογενίνης εστεροποιημένοι με 2-χλωρο-αιθυλ-αμινο-φαινυλοξικό οξύ και 2-χλωρο-αιθυλ-αμινο-φαινυλβουτυρικό οξύ) δεν πληρούσαν σημαντικά κριτήρια εκ των ADMET ιδιοτήτων (όπως θα φανεί παρακάτω στα αποτελέσματα) και «κόπηκαν» ουσιαστικά στα αρχικά στάδια (κατά την *in silico* διαδικασία του «docking» ως υποψήφιοι αναστολείς των PARP).

Η χημική σύνθεση των υβριδικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους της οργανικής χημείας [283–286]. Τα στεροειδή, έχουν έναν γενικό τύπο τεσσάρων δακτυλίων, A, B, C, D (Εικόνα 8.2). Η παρασκευή των υβριδικών ενώσεων A, B, C, D, E πραγματοποιήθηκε από τα εμπορικά διαθέσιμα στεροειδή μόρια και τροποποιημένα παράγωγά τους, τα οποία είναι: τεστοστερόνη, οιστρόνη, (δεϋδροεπι)αδρενοστερόνη και 5-cholesten-3β-ol-7-one. Ύστερα από διάφορες χημικές τροποποιήσεις, όπως η εισαγωγή ατόμου αζώτου (N) στον στεροειδικό δακτύλιο -A ή -B ή/και -D με χημικές αντιδράσεις μεταθέσεως (αναδιάταξης) κατά Beckmann, τελικό βήμα για όλες τις παράγωγες ενώσεις ήταν η εστεροποίηση, δηλαδή η σύζευξη με τον αλκυλιωτικό παράγοντα 3-(4-δισ(2χλωροαιθυλ)αμινο)φαινοξύ (ΡΑ ή ΡΟΡΑ), με γενικές αντιδράσεις απλής εστεροποίησης, όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφικά [247, 287–289].

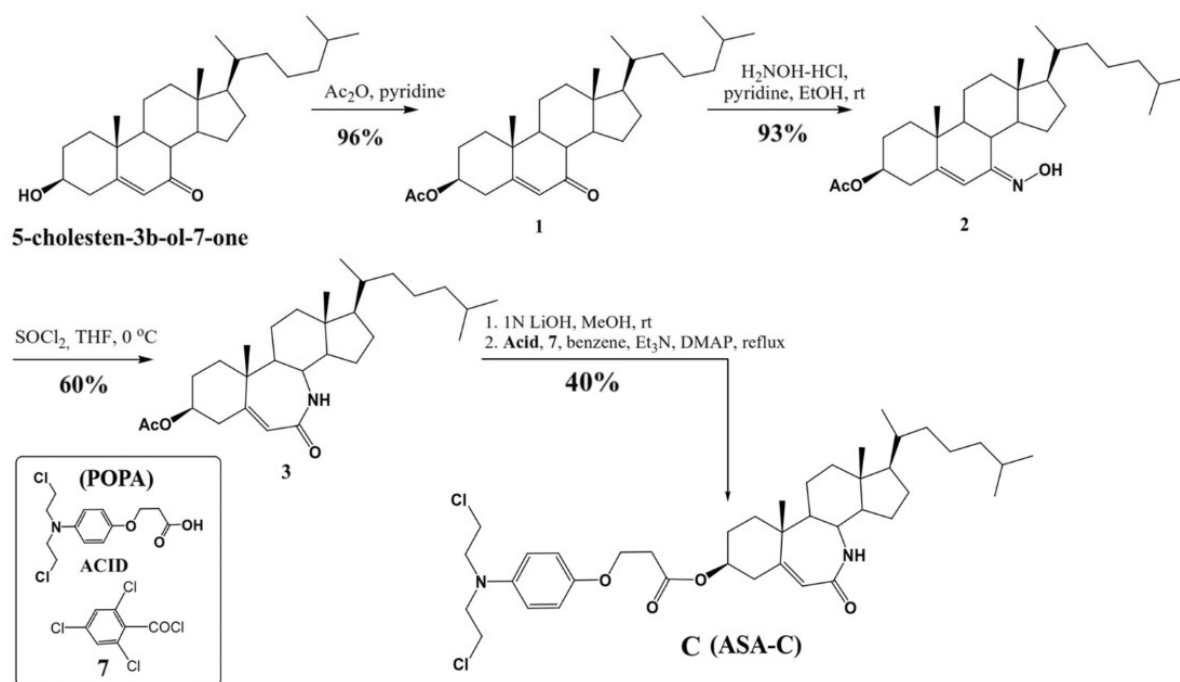


Εικόνα 8.2. Γενική δομή στεροειδών με σήμανση των αντίστοιχων δακτυλίων.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την ολοκλήρωση της σύνθεσης των τριών εκ των πέντε τελικών στόχων (ενώσεις A, B, C) φαίνεται στα παρακάτω 2 σχήματα (Σχήμα 3 και 4). Η σύνθεση για την ένωση A ξεκίνησε από την πρώτη ύλη dehydro-epiandrosterone (δεϋδροεπιανδροστερόνη) (σχήμα 3) και ολοκληρώθηκε σε 7 διαδοχικά στάδια με ~13% ολική απόδοση. Ακολούθησε η σύνθεση για το μόριο B από το ίδιο πρόδρομο μόριο (dehydro-epiandrosterone) (Σχήμα 3) και ολοκληρώθηκε σε 11 διαδοχικά στάδια με ~2% ολική απόδοση. Η σύνθεση για το μόριο στόχο C ξεκίνησε με πρώτη ύλη το 5-cholesten-3β-ol-7-one (Σχήμα 4) και ολοκληρώθηκε σε 5 διαδοχικά στάδια με ~21% ολική απόδοση.

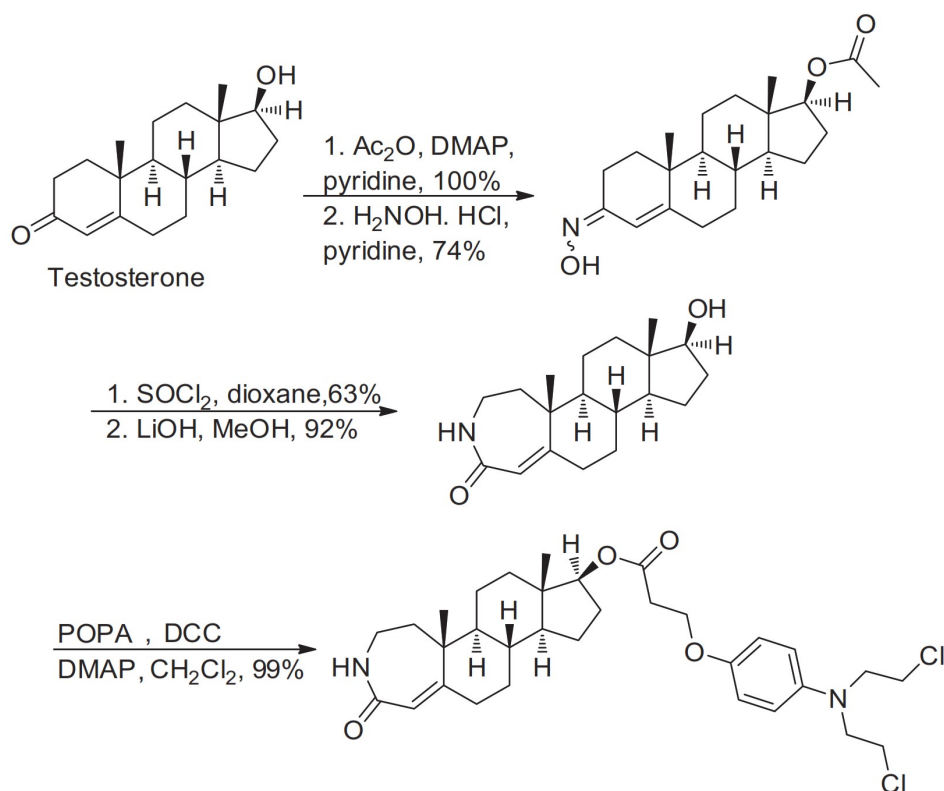


Σχήμα 3. Σύνθεση των τελικών ενώσεων **A** και **B**.

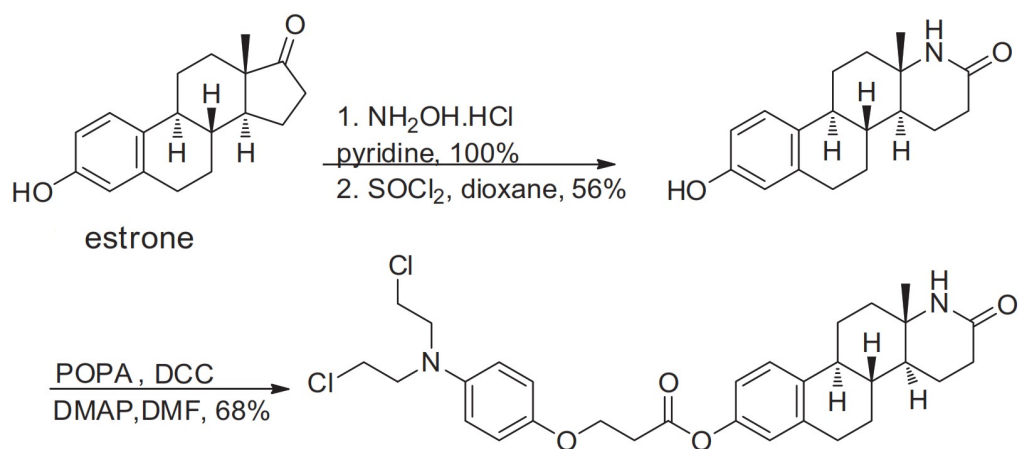


Σχήμα 4. Σύνθεση της τελικής ένωσης **C**.

Η σύνθεση για τα μόρια στόχους D και E έγινε με παρόμοιο τρόπο και περιγράφεται στα σχήματα 5 και 6 [242, 255, 290, 291].



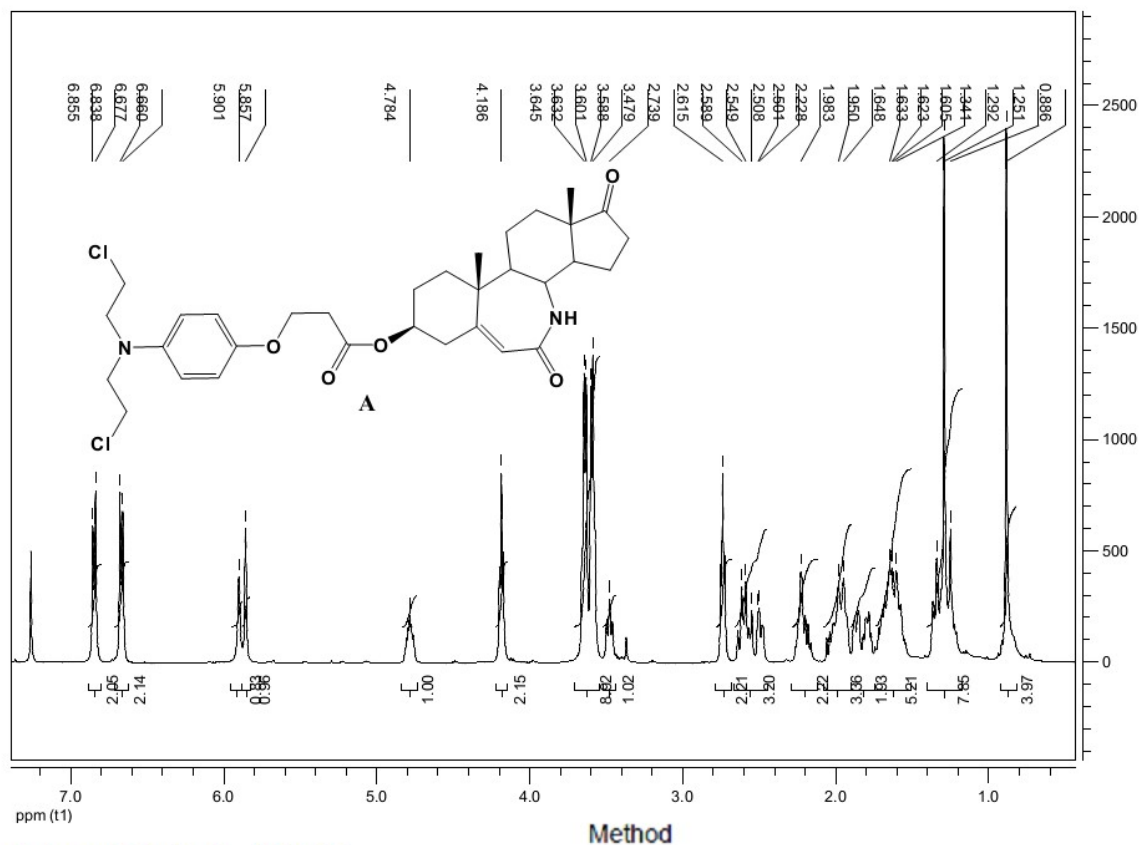
Σχήμα 5. Σύνθεση της τελικής ένωσης «D» (ENGA-L06E)



Σχήμα 6. Σύνθεση της τελικής ένωσης «E» (ENGA-L08E)

Οι νέες ενώσεις ελέγχθηκαν με αναλυτικές τεχνικές φασματοσκοπίας μάζας (Ms) και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) με σκοπό τον προσδιορισμό της δομής του μορίου: του μεγέθους, του μοριακού βάρους και του τρόπου σύνδεσης των ανθράκων με τα υδρογόνα αντίστοιχα.

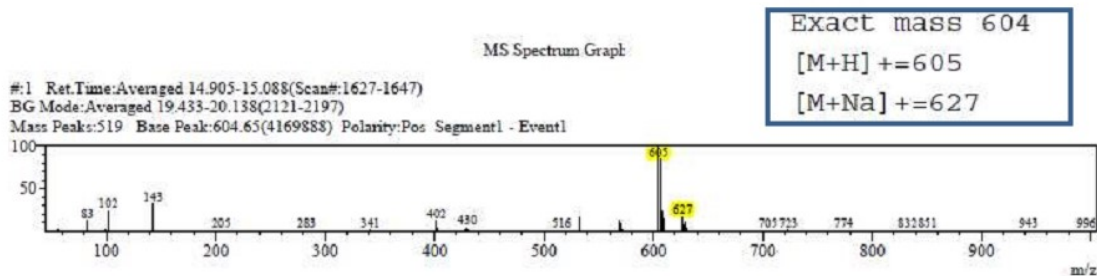
Οι δομές και τα χημικά χαρακτηριστικά φασμάτων NMR και MS των λακταμικών εστέρων A, B και C περιγράφονται στις παρακάτω εικόνες:



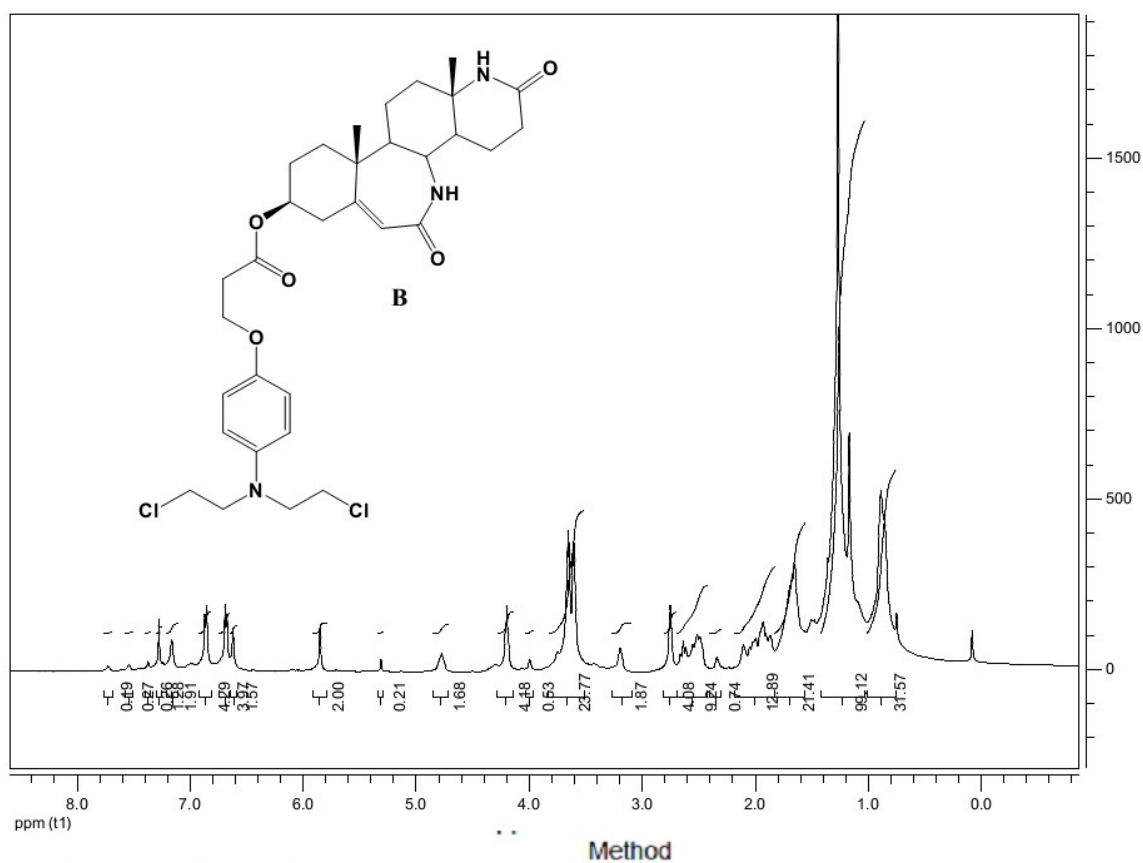
Column: Shim Pack - XR-ODS
 Mobile Phase A: H₂O + 0.9% acetic acid
 Mobile Phase B: ACN
 % Pump B Concentrate: 10.0
 Flow (ml/min): 0.6000

Detector A: SPD-20A
 UV_1.Wavelength: 254
 UV_2.Wavelength: 220
 LC Program

Time	Unit	Command	Value
0.01	Pumps	B.Conc	10
15.00	Pumps	B.Conc	90
30.00	Pumps	B.Conc	90
30.01	Pumps	B.Conc	10
40.00	Controller	Stop	



Εικόνα 8.3.α: Στοιχεία φάσματος ένωσης Α

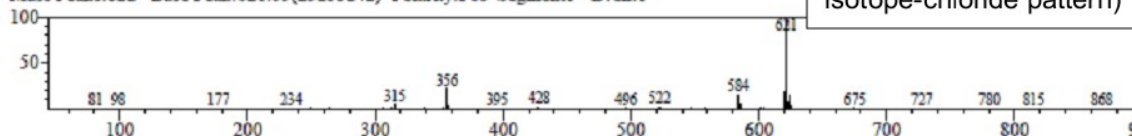


Column: Thermo BDS C18
 Mobile Phase A: H2O
 Mobile Phase B: Acetonitrile
 % Pump B Concentrate: 10.0
 Flow (ml/min): 0.6000

Detector A:SPD-20A
 UV_1.Wavelength: 217
 UV_2.Wavelength: 254
 LC Program

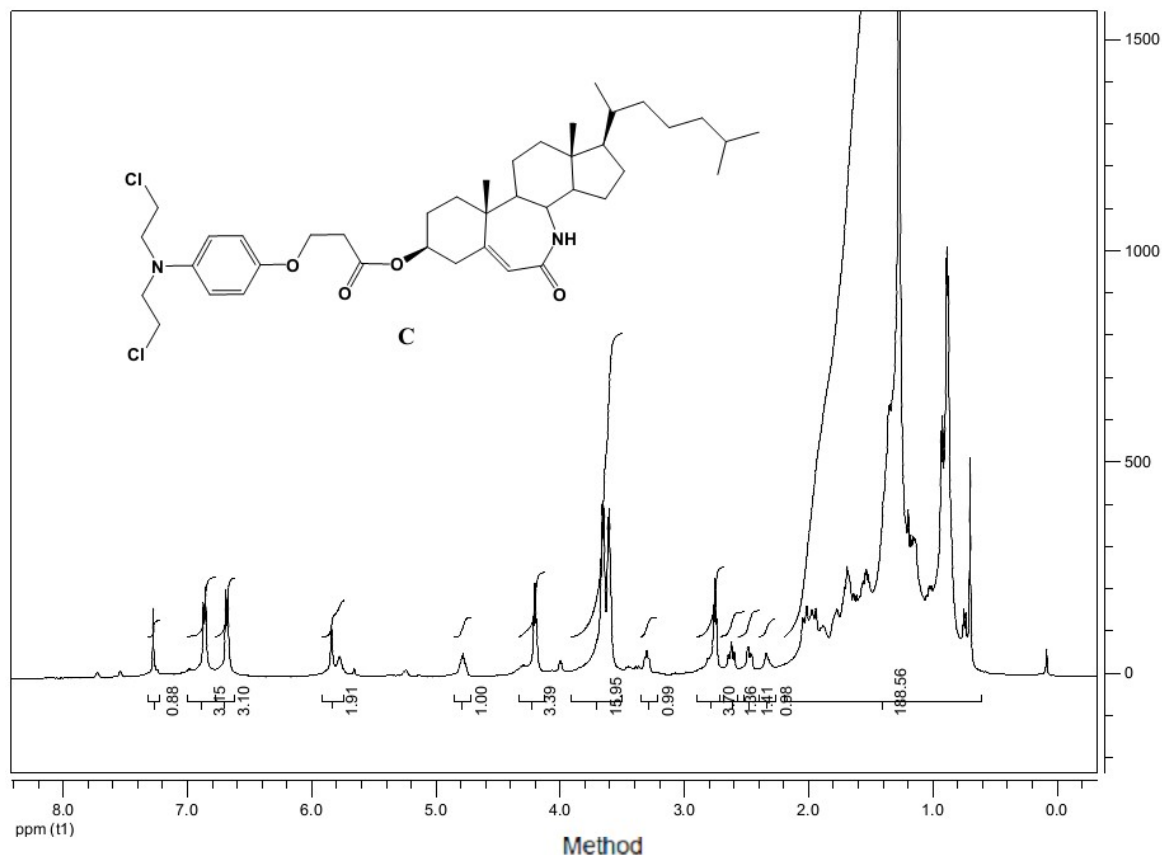
Time	Unit	Command	Value
0.01	Pumps	B.Conc	10
15.00	Pumps	B.Conc	90
30.00	Pumps	B.Conc	90
30.01	Pumps	B.Conc	10
40.00	Controller	Stop	

#1 Ret.Time:Averaged 15.838-16.380(Scan#:1463-1513)
 BG Mode:Averaged 13.433-13.968(1241-1291)
 Mass Peaks:822 Base Peak:621.05(25253242) Polarity:Pos Segment1 - Event1



Exact Mass 619
 $[M+H]^+ = 621$ (chloride
 isotope-chloride pattern)

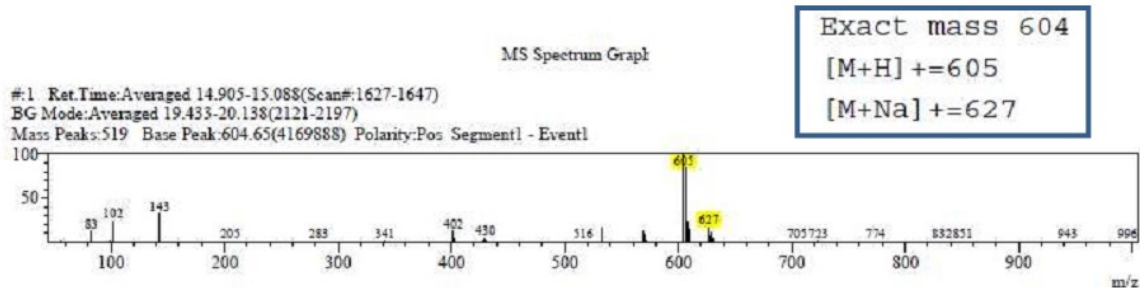
Εικόνα 8.3.β: Στοιχεία φάσματος ένωσης B



Column: Shim Pack - XR-ODS
 Mobile Phase A: H₂O + 0.9% acetic acid
 Mobile Phase B: ACN
 % Pump B Concentrate: 10.0
 Flow (ml/min): 0.6000

Detector A: SPD-20A
 UV_1.Wavelength: 254
 UV_2.Wavelength: 220
 LC Program

Time	Unit	Command	Value
0.01	Pumps	B.Conc	10
15.00	Pumps	B.Conc	90
30.00	Pumps	B.Conc	90
30.01	Pumps	B.Conc	10
40.00	Controller	Stop	



Εικόνα 8.3.γ: Στοιχεία φάσματος ένωσης C

Οι τιμές των φασμάτων NMR και MS των λακταμικών εστέρων E και D [242]:

Ένωση D (HRMS m/z for C₃₂H₄₅Cl₂N₂O₄ [M+H]⁺ calcd 591.2756, found 591.2760)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.72 (s, 1H), 4.66 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.63 (m, 4H), 3.59 (m, 4H), 3.32 – 3.04 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.48 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 2.15 (m, 2H), 1.50-1.98 (m, 10H), 1.33 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.05 (m, 1H), 0.80 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 170.4, 161.3, 151.3, 140.8, 118.8, 116.3, 114.4, 82.7, 64.4, 54.2, 53.2, 50.2, 44.5, 42.7, 41.9, 40.7, 36.7, 36.2, 35.3, 33.8, 33.1, 27.5, 25.6, 24.9, 23.4, 21.3, 12.1.

Εικόνα 8.4.α: Τιμές φασμάτων NMR ένωσης D

Ένωση E (HRMS m/z for C₃₁H₃₉Cl₂N₂O₄ [M+H]⁺ calcd 574.2287, found 574.2289)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 4.30 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.62 (dt, *J* = 29.2, 6.6 Hz, 8H), 2.97 (dd, *J* = 15.1, 9.0 Hz, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.58 – 2.36 (m, 4H), 2.23 – 2.00 (m, 2H), 1.92 – 1.66 (m, 3H), 1.60 – 1.29 (m, 4H), 1.19 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171.7, 169.8, 151.3, 148.5, 141.0, 137.8, 137.2, 126.1, 121.3, 118.7, 116.5, 114.5, 64.4, 54.4, 54.2, 46.6, 43.4, 40.7, 39.9, 38.9, 34.9, 30.5, 29.5, 26.5, 25.9, 22.1, 19.8.

Εικόνα 8.4.β: Τιμές φασμάτων NMR ένωσης E

8.2 *In vitro* μελέτη της δράσης των ενώσεων-στόχων

Κατά την *in silico* μελέτη επιλέχθηκαν πέντε ενώσεις προς σύνθεση: A, B, C, D, και E για την *in vitro* ανάλυση και εκτίμηση της δράσης τους, καθώς και οι χημικές ενώσεις ASE, PA, 3AB και Olaparib, ως ενώσεις αναφοράς στις κυτταρικές σειρές SKOV-3, OVCAR-3, UWB1.289 και UWB1.289+BRCA1. Σημειώνεται ότι εμπορικά αποκτήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι γνωστές ενώσεις/ αναστολείς PARP Olaparib και 3AB για περαιτέρω σύγκριση με τα υπό μελέτη υβριδικά λακταμικά στεροειδή μόρια.

8.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Τα κύτταρα φυλάσσονται σε δοχείο αζώτου μέσα σε κρυοφιαλίδια των 2,5 ml (Corning-Costar, Cambridge, MA), από όπου και ανακαλλιεργούνται. Η καλλιέργεια των κυττάρων σε

μονοστρώματα γίνεται σε φλάσκες T-75 (Corning-Costar, Cambridge, MA), μέσα σε επωαστικό κλίβανο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) 5% v/v, σε θερμοκρασία 37°C και με 100% σχετική υγρασία.

Το θρεπτικό μέσο για τα SKOV-3 κύτταρα είναι το McCoy's 5a Medium, εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό νεογέννητου βοός (fetal bovine serum, FBS, Gibco) και με μείγμα αντιβιοτικών (100 IU/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη), τα οποία αποστειρώνονται με διήθηση (φίλτρα Corning-Costar, διάμετρος 0,2 µm). Αντίστοιχα, για τα κύτταρα UBWB1.289 και UBWB1.289+BRCA1 το θρεπτικό μέσο είναι 50% RPMI-1640 (Catalog No 30-2001) και 50% Mammary Epithelial Growth Medium (MEGM), επίσης εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό νεογέννητου βοός (fetal bovine serum, FBS, Gibco) και με μίγμα αντιβιοτικών (100 IU/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη). Τέλος στα OVCAR-3 κύτταρα χρησιμοποιήθηκε RPMI-1640 (Catalog No 30-2001), με FBS και μίγμα αντιβιοτικών όπως τα προαναφερθέντα. Σημειώνεται επιπλέον, ότι καλλιεργήθηκαν και φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, οι ινοβλάστες πνεύμονα MRC-5 (CCL-171™) με RPMI 1640 ως θρεπτικό μέσο, για χρήση στην *in vitro* μελέτη ως κύτταρα αναφοράς ως προς την εκλεκτικότητα των μελετούμενων μορίων έναντι των κυττάρων του καρκίνου των ωοθηκών. Το θρεπτικό μέσο των κυττάρων στο υγρό άζωτο δεν περιέχει αντιβιοτικά και είναι εμπλουτισμένο με 10% DMSO v/v (Sigma, Chemical Co). Το DMSO εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων, που θα κατέστρεφαν τα κύτταρα. Η ανακαλλιέργεια γίνεται κάθε 3-4 ημέρες ως εξής: οι φλάσκες ξεπλένονται με αποστειρωμένο PBS (Phosphate buffered saline): 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ και 0,2 g/l KH₂PO₄. pH:7,4), προστίθενται 2-3 ml διαλύματος 0,05% τρυψίνης (Gibco 1:250) και 0,02 % EDTA και επάζονται στους 37°C για 5-10 λεπτά. Υπό την επίδραση της τρυψίνης και του EDTA τα κύτταρα αποκολλούνται από τον πυθμένα της φλάσκας και σχηματίζουν εναιώρημα. Στη συνέχεια μετρούνται με πλάκα Neubauer και η ζωτικότητα τους εκτιμάται με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανό του τρυπανίου (trypan blue). Η μέθοδος περιγράφηκε από τον Kaltenbach το 1958 και βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα που έχουν ακέραιες κυτταρικές μεμβράνες αποκλείουν χρωστικές, όπως το κυανό του τρυπανίου, η εωσίνη και η ερυθροσίνη B, ενώ χρωματίζονται μόνο τα νεκρά κύτταρα, οι μεμβράνες των οποίων έχουν χάσει τη διαφορά δυναμικού και την ακεραιότητά τους [292, 293].

8.2.2 Χορήγηση των ενώσεων στα κύτταρα – Μέθοδος αξιολόγησης δράσης στην κυτταρική επιβίωση (MTT)

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε μικροπλάκες καλλιέργειας (MTP) 96 θέσεων («πηγαδίων»), 10.000 κυττάρων/ πηγάδι και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες σε κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂, ώστε να επανακτηθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης. Η επιλογή αρχικού αριθμού κυττάρων έγινε με γνώμονα τον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Έπειτα από 24 ώρες προστέθηκαν 100 μl θρεπτικού μέσου, στο οποίο περιέχονταν με προηγούμενη προσθήκη οι διαδοχικές αραιώσεις των προς εξέταση χημικών ενώσεων και μορίων αναφοράς (A, B, C, D, E, PA, 3AB, ASE και Olaparid) (0,1-300 μmol/l) και παρέμειναν στον κλίβανο για 48 ώρες ακόμα. Η όλη διαδικασία διήρκεσε 72 ώρες και τα κύτταρα παρέμειναν σε επωαστή. Η κάθε συγκέντρωση μελετήθηκε σε εξαπλά δείγματα των μικροπλάκων καλλιέργειας, ώστε να είναι εφικτή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Αξιολόγηση κυτταροαστικής/ κυτταροτοξικής δράσης

Η εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ένα κίτρινο τετραζόλιο), όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες [294], και στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νεκρά κύτταρα δε μπορούν να μεταβολίσουν άλατα του τετραζολίου. Το MTT (Sigma, St Louis, Missouri, USA) διαλυτοποιήθηκε με PBS σε συγκέντρωση 5mg/ml, προστέθηκε σε όγκο 200 μl σε κάθε πηγαδάκι και κατόπιν ακολούθησε επώαση σε κλίβανο για 3 ώρες στους 37°C και 5% CO₂, έτσι ώστε να επιτραπεί ο μεταβολισμός του από τα κύτταρα. Στο τέλος ακολούθησε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540nm σε φωτόμετρο ELISA, ανάγνωσης πλακών 96 θέσεων (BioTek, Winooski, Vermont, USA) [295] (Το κίτρινο τετραζόλιο MTT -ευαίσθητο στο φως-, στο τέλος του πειράματος μετασχηματίζεται σε ενδοκυτταρική φορμαζάνη -με χρώμα ως το σκούρο μπλε/ μωβ-, μεταβολή που είναι ανάλογη ποσοτικώς των ζώντων κυττάρων, δηλαδή της βιωσιμότητας των κυττάρων, και μπορεί να διαλυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί μέσω φασματοφωτομετρίας).

Οι μέσες τιμές και οι σταθερές διακυμάνσεις καταγράφηκαν αυτομάτως και η

φαρμακευτική δραστηριότητα των ενώσεων υπολογίστηκε ως ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης, με βάση τις προδιαγραφές του National Cancer Institute (NCI) ως εξής [295]:

$$(Tt72x) - (Ct24)/(Ct72)-(Ct24) \times 100 \text{ όταν } Tt72x > Ct24 \text{ και}$$

$$(Tt72x) - (Ct24)/(Ct24) \times 100 \text{ όταν } Tt72x < Ct24$$

Όπου:

Tt72x = οπτική πυκνότητα (optical density-OD) των θέσεων/ πηγαδιών με την κάθε συγκέντρωση των υπό εξέταση ουσιών

Ct24= οπτική πυκνότητα (optical density-OD) των θέσεων/ πηγαδιών- μαρτύρων στις 24 ώρες επώασης

Ct72= οπτική πυκνότητα (optical density-OD) των θέσεων/ πηγαδιών- μαρτύρων στις 72 ώρες επώασης

Συντομογραφίες (έννοιες) υπολογιζόμενων τιμών

GI50: Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (Growth Inhibition 50%). Ο υπολογισμός της τιμής γίνεται με βάση τον τύπο:

$$(Tt72x) - (Ct24)/(Ct72)-(Ct24) \times 100 = 50$$

TGI: Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί 100% διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης (Total Growth Inhibition). Ο υπολογισμός της τιμής γίνεται με βάση τον τύπο:

$$(Tt72x) - (Ct24)/(Ct72)-(Ct24) \times 100 = 0$$

IC50: Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί θανάτωση του 50% των κυττάρων (Inhibition Concentration 50%). Ο υπολογισμός της τιμής γίνεται με βάση τον τύπο:

$$(Tt72x) - (Ct24)/(Ct24) \times 100 = 50$$

8.2.3 Χρωματομετρική μέθοδος αξιολόγησης αναστολέων των *PARP-1/ PARP-2*

Η πολυμεράση της πολυαδενοφωσφορικής ριβόζης (PARP) είναι ένα ένζυμο που παράγεται από όλα τα σωματικά κύτταρα και καταλύει τη NAD-εξαρτώμενη-ριβοζυλίωση των πυρηνικών πρωτεϊνών. Η PARP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο εξαντλώντας τα κυτταρικά αποθέματα του NAD⁺ [206]. Η PARP ενεργοποιείται μέσω σύνδεσης με περιοχές κατεστραμμένου DNA και καταλύει την ADP-ριβοζυλίωση τόσο του ίδιου του μορίου της, όσο και πυρηνικών πρωτεϊνών όπως είναι οι ιστόνες. Η αυτο-ριβοζυλίωση της PARP ενισχύει την απελευθέρωσή της από το DNA, επιτρέποντας την πρόσβαση επιδιορθωτικών ενζύμων στις κατεστραμμένες περιοχές. Κατά την απόπτωση, το μόριο της PARP υφίσταται διάσπαση από πρωτεάσες, με αποτέλεσμα το εναπομένον τμήμα του μορίου να μην εμφανίζει δυνατότητα ενεργοποίησης από το κατεστραμμένο DNA. Φαίνεται πως η διάσπαση της PARP αποτελεί ένα μηχανισμό παρεμπόδισης της επιδιόρθωσης του DNA των κυττάρων προς απόπτωση, με συνέπειες στη ρύθμιση της καρκινικής ανάπτυξης [296].

Αρχή Μεθόδου: Η διαδικασία μετρά την ενεργότητα της PARP στα 450nm. Δηλαδή την ενσωμάτωση της βιοτινυλιωμένης πολυαδενοφωσφορικής ριβόζης σε πρωτεΐνες (ιστόνες) που βρίσκονται προσκολλημένες σε πλάκα 96 θέσεων. Η μελέτη της αναστολής του ενζύμου με διαφορετικούς αναστολείς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση έτοιμου kit (Universal PARP Colorimetric Assay Kit, R&D Systems, Trevigen® Inc., Gaithersburg, MD, USA), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

1. Αρχικά η πλάκα ELISA 96 θέσεων (wells) επώαζεται μισή ώρα με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) προς ενυδάτωση των προσκολλημένων ιστονών.
2. Προκειμένου να σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη δράσης του ενζύμου προστίθενται, στην πλάκα ELISA 96 θέσεων, γνωστές συγκεντρώσεις του ενζύμου PARP και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος (buffer). Οι ενζυμικές ενεργότητες που περιελήφθησαν ήταν: 0.1 units/well, 0.05 units/well, και 0.01 units/well εις διπλούν.
3. Εν συνεχεία, προστέθηκε στα «πηγάδια» (wells) της πλάκας ένζυμο PARP συγκέντρωσης 0,6 units/well. Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του αναστολέα του kit, 3-αμινοβενζαμίδης (3-AB), προστέθηκαν σειριακές αραιώσεις. Οι συγκεντρώσεις που

εξετάστηκαν ήταν 300 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, και 1 μ M.

4. Παράλληλα προστέθηκαν οι προς μελέτη αναστολείς σε διαδοχικές αραιώσεις. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν για κάθε ένωση ήταν 300 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M. Η δράση κάθε αναστολέα σε κάθε συγκέντρωση μετρήθηκε εις τριπλούν.

5. Τέλος προστέθηκαν δύο θετικά (έλεγχος της 100% ενζυμικής ενεργότητας) και δύο αρνητικά (εκτίμηση απορρόφησης υποβάθρου) δείγματα ελέγχου. Ο τελικός όγκος αντίδρασης για όλα τα δείγματα ήταν 50 μ L.

6. Η πλάκα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησαν ξεπλύματα με διάλυμα 1X PBS + 0.1% Triton X-100, προσθήκη Strep-HRP και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για άλλη μία ώρα. Ακολούθησαν ξεπλύματα με διάλυμα 1X PBS + 0.1% Triton X-100, προσθήκη TACS-Sapphire και επώαση στο σκοτάδι για μισή ώρα.

7. Στο τέλος με προσθήκη 5% φωσφορικού οξέως σταμάτησε η αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο και παρήχθη το αντίστοιχο με την πρότυπη καμπύλη διαγράμμα για την κάθε μελετούμενη ένωση, έτσι ώστε να φαίνεται η συσχέτιση ανασταλτικής δράσης στην PARP και συγκέτρωσης της ένωσης.

8.2.4 Μεθοδολογία της μεταγραφικής ανάλυσης: *PARP-1* και *PARP-2*

8.2.4.α Απομόνωση RNA

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε μικροπλάκες καλλιέργειας (MTP) 12 πηγαδίων και ακολούθησε η επώαση για 24 ώρες σε κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂, ώστε να επανακτηθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης που συνεπάγεται 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι. Μετά από 24 ώρες προστέθηκε 1 ml θρεπτικού μέσου που περιείχε 2 διαδοχικές αραιώσεις των προς εξέταση παραπάνω χημικών ενώσεων (20 και 40 μ mol/l) και παρέμειναν στον κλίβανο για ακόμα 48 ώρες. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και η κάθε συγκέντρωση μελετήθηκε σε διπλά δείγματα των μικροπλακών καλλιέργειας, ώστε να είναι εφικτή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Ακολούθησε απομόνωση RNA με βάση τις προδιαγραφές του κιτ (Macherey Nagel), ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA σε γέλη αгарόζης 2% και φωτομέτρηση στα 260 nm αντίστοιχα. Η καθαρότητα του RNA σε σχέση με τις πρωτεΐνες προσδιορίστηκε με βάση το λόγο 260/280 nm.

8.2.4.β Σύνθεση cDNA

Για κάθε δείγμα εις διπλούν έγινε σύνθεση cDNA από 1 µg RNA. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης από MMLV (M-MLV RT, Invitrogen) και 100pmol/µl τυχαίων εξαμερών εκκινητών (hexamer random primers) (Invitrogen) ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που παρέχονται. Η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C για 50min. Η απόδοση της σύνθεσης cDNA, αξιολογήθηκε μετά από αραίωση 1:10, με κανονική PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές της β-ακτίνης (β-ACT). Δεν ανιχνεύθηκε επιμόλυνση DNA.

8.2.4.γ Σχεδιασμός εκκινητών της qRT-PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την *PARP-1* και *PARP-2* καθώς και για το γονίδιο αναφοράς (β-ακτίνη), έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi, του πανεπιστημίου της Μασσαχουσέτης (University of Massachusetts, USA), χρησιμοποιώντας τις mRNA ακολουθίες που παρέχονται από την βάση δεδομένων του NCBI, GenBank. Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται στον Πίνακα 6.

Ο σχεδιασμός και των δύο εκκινητών του κάθε ζεύγους ανά γονίδιο, παρήχθη σε ξεχωριστά εξώνια για την αποφυγή του πολλαπλασιασμού λόγω πιθανής επιμόλυνσης του γενωμικού DNA και για την πρόληψη φαινομένων ψευδο-εκκίνησης που αναδεικνύουν ανιχνεύσιμο σήμα για την PCR σε πραγματικό χρόνο (QPCR). Η ειδικότητα των εκκινητών και η μοναδικότητα της περιοχής που περιλαμβάνουν επαληθεύτηκε με τα λογισμικά του NCBI Blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> και <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start> αντίστοιχα. Επίσης οι εκκινητές του γονιδίου αναφοράς της ακτίνης (ACTB) και των *PARP-1* και *PARP-2* επιλέχθηκαν σε περιοχές κοινές στις διαφορετικές ισομορφές του εκάστοτε γονιδίου.

Genes	GenBank cDNA sequence	Amplicon (bp)	Primer Sequence
β -actin	BC014861	224bp	F 5'AGG ATG CAG AAG GAG ATC ACT G 3' R 5'GGG TGT AAC GCA ACT AAG TCA TAG 3'
<i>PARP-1</i>	NM 001618.3	94bp	<i>PARP-1_F</i> 5'CCTGATCCCCCAGACTTT 3' <i>PARP-1_R</i> 5'GCAGGTTGTCAAGCATTTTC 3'
<i>PARP-2</i>	NM_005484.3	229bp	<i>PARP-2F</i> 5'TCCTCCACTAATCCGGACA 3' <i>PARP-2R</i> 5'GTGTGGGAGCATGGGTAGAT 3'

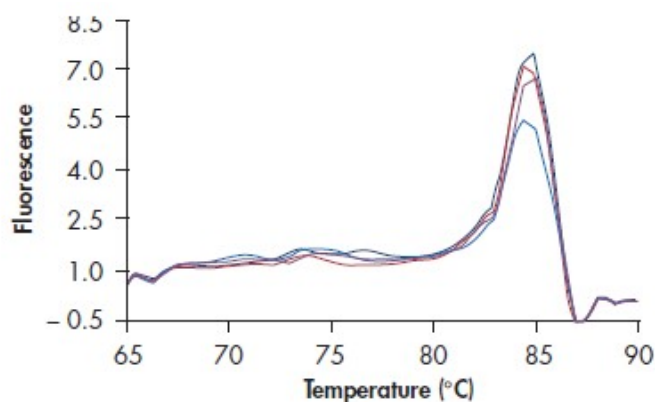
Πίνακας 6. Αλληλουχία εκκινητών όπως σχεδιάστηκαν για PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR).

8.2.4.6 PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR)

Η εκτίμηση της μεταγραφικής αναστολής των γονιδίων *PARP-1* και *PARP-2* έγινε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR, Q-PCR) με φθορίζουσα SYBR GREEN σε κυκλοποιητή BIORAD CFX96. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε μεμονωμένο γονίδιο κάθε δείγματος και όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές μέσω του συστήματος ανίχνευσης χρωστικής φθορισμού SYBR-Green (Molecular Probes, Oregon, USA) σε θερμοκυκλικό- BIORAD CFX96 (Biorad). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μ l: 1 μ l CDNA, 0,4 μ l εκκινητή Forward (5 pmol/ μ l), 0,4 μ l εκκινητή Reverse (5 pmol/ μ l), 10 μ l ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 2x (QIAGEN). Πραγματοποιήθηκαν σαράντα κύκλοι ενίσχυσης PCR με 95°C για 15 λεπτά (ενεργοποίηση του ενζύμου Taq hot start), 95°C για 5 δευτερόλεπτα (αρχική αποδιάταξη), 59°C για 15 δευτερόλεπτα (πολλαπλασιασμός). Τα προϊόντα PCR παρακολουθήθηκαν άμεσα με μέτρηση της αύξησης του φθορισμού λόγω της δέσμευσης του SYBR Green στο δίκλωνο DNA. Τα πειράματα της καμπύλης τήξης είχαν προηγουμένως αποδείξει ότι το

σήμα φθορισμού για κάθε αμπλικόνιο προήλθε μόνο από τα προϊόντα, και όχι από διμερή.

Για κάθε πολλαπλασιαζόμενη περιοχή (amplicon) σχεδιάζεται η καμπύλη τήξης της 20°C έως 40°C υπό του σημείου τήξης (Tm) του PCR προϊόντος. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR προχωράει συλλέγοντας δεδομένα φθορισμού με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 58°C στους 95°C για ένα κύκλο (Melting curve). Μέσω του φθορισμού που προέρχεται από τον προϊόν (και όχι από διμερή των εκκινητών) ελέγχουμε την ειδικότητα της αντίδρασης (Εικόνα 8.5).



Εικόνα 8.5. Ανάλυση της καμπύλης τήξης και ειδικότητα της αντίδρασης με το «pic» του φθορισμού στους 85°C για το γονίδιο της *PARP-1*.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης 2-ΔCT (Relative Quantification) των γονιδίων στόχων *PARP-1* και *PARP-2* ως προς το γονίδιο αναφοράς που είναι το γονίδιο της β-ακτίνης (*ACTB*). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη άμεση σύγκριση του αριθμού κύκλων (fractional cycle number) CT σε κάθε δείγμα. Ο αριθμός των κύκλων CT εκφράζει το σήμα φθορισμού πάνω από το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης (threshold). Αρχικά το ΔCT, και εν συνεχεία το ΔΔCT για κάθε δείγμα καθορίζονται, υπολογίζοντας για το τελευταίο τη διαφορά του μέσου όρου του αριθμού κύκλων CT των γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς της β-ACT.

$$\Delta C_T = C_T (\text{γονίδιο στόχος}) - C_T (\text{ενδογενές γονίδιο αναφοράς})$$

$$\Delta \Delta C_T = \text{μέσο } \Delta C_T (\text{εξεταζόμενο δείγμα}) - \text{average } \Delta C_T (\text{δείγμα αναφοράς})$$

Λόγο της λογαριθμικής φύσης της PCR το ΔΔCT αλλάζει σε γραμμική φόρμουλα με $2^{-\Delta \Delta C_T}$

Κανονικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στόχου στο δείγμα (Normalized target gene expression level in sample) = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Η σχετική γονιδιακή έκφραση μεταξύ κυττάρων που έχουν υποστεί επίδραση και μη υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το 2- ΔCT . Οι τιμές έκφρασης mRNA κυττάρων που δεν υποβλήθηκαν σε επίδραση χημικών ενώσεων ορίστηκαν ως 1 για όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν, και η έκφραση των κυττάρων με επίδραση υπολογίστηκε αναλόγως στη συνέχεια, παρέχοντας λεπτή σύγκριση [297, 298].

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν δείγματα RNA από κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών του ανθρώπου με διαφορετικές συγκεντρώσεις επίδρασης των νέων χημικών ουσιών. Οι τιμές των επιπέδων έκφρασης mRNA των κυττάρων χωρίς επίδραση χημικής ουσίας και επώασης 72 ωρών ορίστηκαν ως η τιμή 1 για τα γονίδια της μελέτης, και εν συνεχεία έγινε υπολογισμός των επιπέδων έκφρασής τους υπό επιδράσεις.

Υπολογίστηκε η εγκυρότητα των υπολογισμών και η συμβατότητα ανάμεσα στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

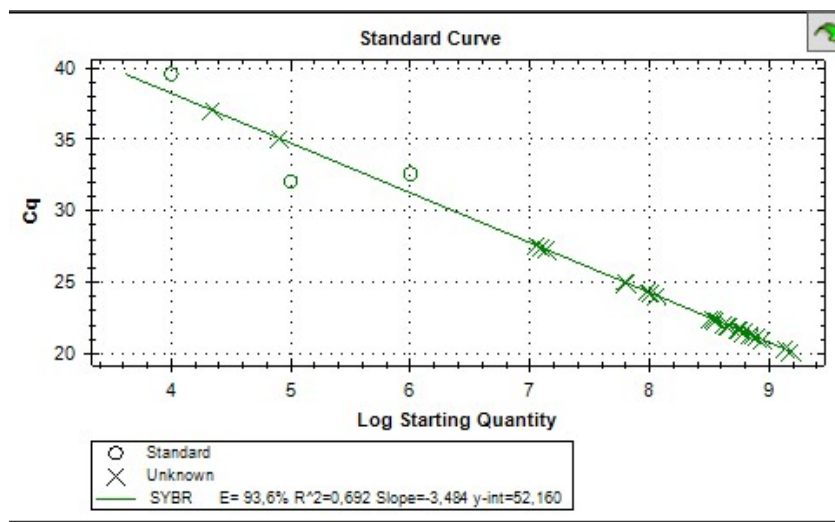
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Εικόνα 8.6). Επιβεβαιώθηκε ότι όλες οι αντιδράσεις PCR, του γονιδίου στόχου *PARP-1* και *PARP-2* καθώς και του γονιδίου αναφοράς της β -ACT, σε αυτή την μελέτη, είχαν την ίδια αποδοτικότητα (efficiencies). Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς 10-φορών (10-fold) διαδοχικών διαλύσεων cDNAs της K562 λευχαιμικής κυτταρικής σειράς ποντικού) (Εικόνα 8.6). Η αποδοτικότητα της κάθε qRT-PCR υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης αναφοράς (slope). Οι απόλυτες τιμές που βρέθηκαν ήταν παρόμοιες (<3,3)

$$E = 10(-1/S) - 1, \text{ όπου}$$

E: αποδοτικότητα

S: κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Εάν $S = -3.322$, τότε η αποδοτικότητα της PCR είναι 1, ή 100%,



10 φορές διαδοχικών
διαλύσεων / δείγμα cDNA

Εικόνα 8.6. Καμπύλη αναφοράς β ACT.

Επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση της β-ACT δεν μεταβάλλεται σημαντικά ανάμεσα στα κύτταρα που έχουν υποστεί διαφορετικές επιδράσεις ουσιών. Συγκρίθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης β-ACT ως β-ACT CT τιμές στα κύτταρα αναφοράς 72 ωρών και στις πέντε ενώσεις .

Ο μέσος όρος των τιμών β-ACT CT για τις διαδοχικές επιδράσεις 20 και 40 μM και στις πέντε ενώσεις ήταν στο αποδεκτό όριο του ενός και μισού κύκλου διαφοράς.

Όλα τα δείγματα cDNA συντέθηκαν από την ίδια αρχική ποσότητα RNA (1μg) και διαλύθηκαν στον ίδιο όγκο έτσι ώστε τα αποτελέσματα της μελέτης να είναι συγκρίσιμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (mean values ± sem).

8.2.5 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το «one paired Student-T test» ή με το «two paired Student-T test». Στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα έχουμε για τιμές του $p < 0.05$. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. (mean value ± SE).

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Συνολική εκτίμηση της δράσης των νέων στεροειδών λακταμικών αλκυλιωτικών μορίων

Τα παρακάτω αποτελέσματα αναφέρονται στην σύνθεση και στην εκτενέστερη μελέτη των νέων αζωτούχων στεροειδών μορίων, καθώς και την αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητάς τους. Μελετήθηκαν οι προαναφερόμενοι νεοσυντιθέμενοι μονολακταμικοί (ενώσεις A, C, D, E, XE2, XE3, XE4) και ο (B,D)-δολακταμικός (ένωση B) στεροειδείς εστέρες του 2-χλωροαιθύλ-αμινο-φαινόξυ-προπιονικού οξέος (PA) και επιλέχθηκαν για περαιτέρω χημική ανάλυση 5 από τις παραπάνω ενώσεις, σύμφωνα με τις *in silico* μελέτες. Ωστόσο, η *in vitro* ανασταλτική δράση και η αντινεοπλασματική αποτελεσματικότητα καθορίζουν τον θεραπευτικό δείκτη των εστέρων και την τελική επιλογή των πιο ικανών μορίων.

9.1.1 *In silico* αξιολόγηση των φαρμακολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νέων στεροειδών λακταμικών αλκυλιωτικών μορίων

Στις 8 υπό μελέτη ενώσεις XE2, XE3, XE4, A, B, C, D και E έγινε μελέτη διαλυτότητας, απορρόφησης, βιο-διαθεσιμότητας, βιοκατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης από τον οργανισμό, καθώς και η προβλεπόμενη σχετική τοξικότητα που προκαλούν στον οργανισμό (ADME-Tox). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 7, βάση των περιγραφών του προγράμματος QikProp, ενώ η παραγόμενη τοξικότητα υπολογίστηκε με το “module” “ADMET” από το ACCELRYS Discovery Studio.

Ligands / Derivatives	Lipinski's Rule of Five & Violations (V)					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V)				Veber's Rules & Violations (V)				log Khsa	log BB	Toxicity Warnings
	MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 Å²)	Hbond donor/accept. (≤ 12)	V			
ASE (XE1)	563,606	1	5,5	7,193	2	513,825	-8,947	3	1	6	74,951	6,5	0	1,643	-0,557	Carcinogenic, toxic, rarely skin irritant and ocular irritant
XE2	589,644	1	5,5	9,92	2	464,21	-10	6	1	8	76,645	6,5	0	1,872	-0,82	Carcinogenic, toxic, probable skin irritant and ocular irritant
XE3	591,66	1	5,5	8,909	2	449,738	-9,982		1	8	77,187	6,5	0	1,888	-0,831	Carcinogenic, toxic, probable ocular irritant
XE4	675,734	1	7	8,767	2	725,033	-11,761	4	1	6	88,603	8	0	2,232	-0,525	Carcinogenic, toxic, mutagenic, highly probable to be skin irritant and ocular irritant
A	605,6	1	8,25	6,906	2	530,698	-8,836	5	1	8	104,999	9,25	0	1,5	-1,156	Carcinogenic, toxic, probable skin irritant and ocular irritant
B	620,615	2	8,75	5,912	2	130,362	-8,436	5	1	8	117,86	10,75	0	1,117	-1,505	Carcinogenic, toxic, probable ocular irritant
C	703,831	1	6,25	10,752	2	1381,272	-13,638	4	1	13	77,076	7,25	0	2,891	-1,064	Carcinogenic, toxic, mutagenic, highly probable to be skin irritant and ocular irritant
PA (POPA)	306,188	1	3,75	4,077	0	248,749	-4,523	3	0	7	62,58	4,75	0	0,001	-0,505	Carcinogenic, HIGHLY toxic, mutagenic, highly probable to be skin irritant and ocular irritant
D	591,617	1	6,25	7,158	2	1023,607	-9,342	4	1	8	84,616	7,25	0	1,882	-0,771	Carcinogenic, toxic, skin irritant and ocular irritant
E	573,58	1	6,75	6,819	2	385,108	-8,910	6	1	8	85,959	7,75	0	1,343	-0,929	Carcinogenic, toxic, skin irritant and mild ocular irritant
Range 95% Known Drugs	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

Πίνακας 7. ADMET ιδιότητες μελετούμενων στεροειδών ενώσεων και των μορίων αναφοράς ASE και PA. Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες και με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι προβλεπόμενες ιδιότητες που βρίσκονται εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων.

Στον συγκεντρωτικό πίνακα αποτελεσμάτων και με τη σημείωση ότι το PA είναι ένας πολύ μικρός αλκυλιωτικός παράγοντας με πολύ υψηλή τοξικότητα, που χρησιμοποιείται εδώ ως μόριο αναφοράς και αρνητικός έλεγχος, φαίνεται ότι το PA παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα χωρίς κανένα σφάλμα σε όλες τις άλλες ιδιότητες που μελετήθηκαν και εντός όλων των ορίων των προαναφερθέντων κανόνων. Η ASE εμφανίζει οριακά από τις καλύτερες ιδιότητες (και είναι εκτός αλλά και πιο κοντά στα οριζόμενα όρια των ιδιοτήτων σε σχέση με τις ΧΕ2, ΧΕ3 και ΧΕ4 ενώσεις). Από αυτές ξεχωρίζει η ΧΕ4 που έχει υψηλή διαπερατότητα στα Caco-2 κύτταρα όμως είναι η χειρότερη από όλες λόγω των υπόλοιπων τιμών των ιδιοτήτων της, και κυρίως λόγω της τοξικότητάς της. Οι τρεις αυτές ενώσεις αυτές εμφανίζουν αρκετά υψηλή logK_{hsa}, δηλαδή μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης στην αλβουμίνη του ορού, που σε συνδυασμό με την υψηλή λιποφιλικότητά τους και την τοξική τους δράση, τις θέτει ως πιθανώς ακατάλληλα μόρια για περαιτέρω ερευνητική ανάπτυξη, λόγω πολλών πιθανών αρνητικών επιπτώσεων. Εν κατακλείδι, η φυσικοχημική διερεύνηση των ενώσεων αυτών και σε σύγκριση με το μόριο αναφοράς ASE, καταλήγει σε απορριπτικά συμπεράσματα για αυτές τις 3 ενώσεις.

Τα καλύτερα αποτελέσματα όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται από την ένωση Β, κάτι που αποδίδεται κυρίως στη χαμηλότερη τοξικότητα και στην καλύτερη διαλυτότητα. Με μικρή διαφορά ακολουθούν οι ενώσεις Ε και Α, καθώς και οι δύο εμφανίζουν αρκετά καλές οριακές τιμές ιδιοτήτων, ακόμα και σε σχέση με την ένωση ASE (θετικός μάρτυρας) που είναι η ουσία αναφοράς και όπως προειπώθηκε, εμφανίζεται αρκετά ικανοποιητική ως προς τις ιδιοτήτές της επίσης (αν και είναι καρκινογόνος, καθώς και η Α). Πολύ κοντά με τις Α, Β αναλόγως εξεταζόμενης ιδιότητας είναι η ένωση D (εμφανίζει όμως καρκινογόνο δράση όπως και η Α και Ε). Ωστόσο, δεν μπορεί να εξαχθεί οριστικό συμπέρασμα από τα αποτελέσματα που δείχνονται, καθώς υπάρχει αναμενόμενη γενική τοξικότητα σε όλες τις ενώσεις. Εν τούτοις, φαίνεται χαρακτηριστικά ότι η ένωση C έχει τις χειρότερες τιμές από κάθε άποψη, με τις σοβαρές όμως εξαιρέσεις των ιδιοτήτων διαπερατότητας PSA και Caco-2 (υψηλή διαπερατότητα) να παρουσιάζουν πολύ καλές τιμές, αλλά και αυξημένη logK_{hsa}, δηλαδή μεγάλη πιθανότητα πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του ορού. Τέλος, η ένωση Β αντιστρόφως, είναι ακριβώς πάνω από τα όρια για την Caco-2 διαπερατότητα (ελαττωμένη απορρόφηση, διεισδυτικότητα στους ιστούς), με αρκετά χαμηλή τιμή για να μειώσει πιθανώς τον ρυθμό απορρόφησης της ένωσης *in vivo*, κάτι

όμως που πιθανώς να είναι και οφέλιμο για την παραμονή της ουσίας στον οργανισμό και τη χρονική διάρκεια μιας θεραπείας (εξαρτάται από πολλούς παράγοντες). Οι νέες χημικές ενώσεις δεν προβλέπεται να είναι πιο τοξικές από την ASE ή το PA. Αυτό σε συνδυασμό με τα ADME χαρακτηριστικά τους είναι πιθανό να τις καθιστούν ελάχιστα τοξικές (πιο μεγάλη δόση χορήγησης χωρίς αρνητικά αποτελέσματα).

Την απόρριψη των ενώσεων ΧΕ2, ΧΕ3, ΧΕ4 από την επόμενη φάση των πειραμάτων θα μπορούσαν να ακολουθήσουν εκ πρώτης όψης, κι άλλες εκ των μελετουμένων ενώσεων, όπως η D, που βρίσκεται περίπου στα ίδια επίπεδα με την ASE. Όμως αυτό αίρεται, για παράδειγμα από τις παρακάτω διαπιστώσεις για την D ένωση, η οποία έχει:

- Παρόμοιες ιδιότητες με την ένωση A (logP, logS λίγο «χειρότερες» τιμές).
- Έμφανίζει πολύ καλύτερη CACO-2 κυτταρική διαπερατότητα και PAS (όπως και η ένωση C, που έχει όμως χειρότερους δείκτες διαλυτότητας και απορρόφησης).
- ΙΣΩΣ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ (ΛΟΓΩ ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΩΝ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΩΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.
- Η log K_{hsa} (Serum Protein Binding) είναι αρκετά υψηλή, κάτι που μπορεί να επηρεάσει αρκετά την *in vivo* (ΟΧΙ ΤΗΝ *IN VITRO* ΟΜΩΣ) δραστικότητα, εξαιτίας της μεγαλύτερης πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του ορού.

Βάση των ADMET λοιπόν, η σειρά κατάταξης των επιλεγμένων υβριδικών λακταμικών στεροειδών για την επόμενη φάση των πειραμάτων (docking και πιθανή χημική σύνθεση) είναι: B > A ~ E > D > ASE > C (" $>$ " = «καλύτερο από»).

Εν κατακλείδει, η φυσικοχημική διερεύνηση των ενώσεων αυτών καταλήγει σε θετικά συμπεράσματα, κυριότερα για τις ενώσεις A και B.

Σημειώνεται ότι η ένωση C πέρασε στην επόμενη φάση πειραμάτων (αν και έχει τις χειρότερες ιδιότητες και δεν αναμένεται να έχει καλή δραστικότητα σε κανένα επόμενο επίπεδο) λόγω της διαφορετικότητας της δομής της από τα άλλα μόρια και εν μέρει λόγω

της αυξημένης logK_{hsa} και κάποιων ακραίων τιμών των υπόλοιπων ιδιοτήτων της, ώστε μέσω της ομοιότητας των τιμών αυτών των ιδιοτήτων για τις οποίες αποκλείστηκαν οι ΧΕ2, ΧΕ3 και ΧΕ4, να διερευνηθεί (μέτρο ελέγχου) μαζί με τα αποτελέσματα της ανάλυσης μοριακής πρόσδεσης, αν ήταν εν τέλει σωστή αυτή η απόφαση.

9.1.2 *In silico* αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης των νέων στεροειδών λακταμικών αλκυλιωτικών μορίων

Επιλέχθηκαν και ανακτήθηκαν οι δομές PDB των *PARP-1* (PDB 3L3L) και *PARP-2* (PDB 4TVJ) και η προετοιμασία των πρωτεϊνών και των προσδετών έγινε όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 8.1.2. Τα αποτελέσματα που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη ως μέτρο σύγκρισης μεταξύ των αναστολέων για την ικανότητα σύνδεσης πάνω στα μελετούμενα υποστρώματα PARP, καταγράφονται ως τιμές ελεύθερης ενέργειας (μέσω του docking score του Glide προγράμματος), αποτέλεσμα των συμπλόκων πρωτεϊνών- προσδετών. Όσο μεγαλύτερη η απόλυτη τιμή (δηλαδή πιο μεγάλη αρνητική τιμή ως αριθμός) των καταγεγραμμένων ενεργειών, τόσο μεγαλύτερη είναι και ικανότητα σύνδεσης (και ανασταλτικής δραστηριότητας στην PARP, εφόσον αναφερόμαστε συγκεκριμένα εδώ σε αναστολείς- προσδέτες) του αντίστοιχου προσδέτη στην πρωτεΐνη.

Χρησιμοποιήθηκαν συνοπτικά 2 διαδικασίες του GLIDE για την παραγωγή ενεργειών από το docking:

- Χρήση ακριβούς θέσης πρόσδεσης από ήδη γνωστό αναστολέα των PARP («ανταλλαγή» με τα νέα μόρια στη θέση αυτή) και απλό “standard precision SP docking”
 1. Εύκαμπτα μόρια (δυνατότητα αλλαγής της δομής τους στο χώρο)
 2. Μη εύκαμπτα-σταθερά μόρια (σταθερή 3D δομή, δεν αλλάζει από αλληλεπιδράσεις)

Η χρήση των μορίων ως σταθερές δομές, δεν επέφερε σωστά αποτελέσματα και απορρίφθηκε. Χρήση μορίων ως «εύκαμπτοι» προσδέτες λόγω της μεγάλης δομής των ιδίων αλλά και της θέσης πρόσδεσης στην πρωτεΐνη ήταν η πιο κατάλληλη.

- Δημιουργία πλαισίου αναγνώρισης στη θέση πρόσδεσης – GRID (στην ίδια θέση αλλά με δυνατότητα μεγαλύτερης κίνησης και καλύτερης τοποθέτησης του μορίου μέσω αλληλεπιδράσεων στο σημείο σύνδεσης) για εύκαμπτα μόρια

1. Χρήση πολλαπλής διαλογής “HTVS docking”

2. Χρήση “extra precision XP mode” (πιο αργή διαδικασία, μεγάλη υπολογιστική ισχύς, πιο ακριβή αποτελέσματα)

Η χρήση της πολλαπλής διαλογής “HTVS docking” παρήγαγε τα λιγότερο αξιόπιστα αποτελέσματα και γι’ αυτό εγκαταλείφθηκε. Έτσι παρήχθησαν τελικά SP και XP τιμές ενέργειας για τις μελετούμενες ενώσεις. Τα αποτελέσματα των ενεργειών φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 8.

Χημικές ενώσεις	Ενέργεια σύνδεσης Docking/ Glide score (kcal/mol) <i>PARP-1</i>		Ενέργεια σύνδεσης Docking/ Glide score (kcal/mol) <i>PARP-2</i>	
	SP DOCKING	XP DOCKING	SP DOCKING	XP DOCKING
A	-5.317	-6.520	-4.640	-7.210
B	-5.773	-7.317	-6.758	-6.852
C	-3.661	-4.577	-2.387	-3.718
D	-4.424	-6.937	-4.096	-7.174
E	-5.605	-5.607	-4.566	-7.412
ASE (XE1)	-3.342	-5.732	-3.377	-4.122
XE2	-4.469	-5.065	-6.805	-3.245
XE3	-2.724	-3.517	-3.675	-3.839
XE4	-4.789	-5.193	-2.368	-4.045

PA (POPA)	-5.475	-4.944	-6.547	-5.728
(3)L3L	<u>-9.264</u>	<u>-6.031</u>	-7.692	-5.219
3AB	-6.410	-6.523	-4.526	-6.002
OLAPARIB	-6.752	-7.118	<u>-7.809</u>	<u>-7.506</u>

Πίνακας 8. Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων Docking. Υπογραμμίζονται οι τιμές ενέργειας που αφορούν τον εγγενή προσδέτη με τον οποίο ανακτήθηκε από την ηλεκτρονική βάση PDB αντιστοίχως η PARP-1 και η PARP-2.

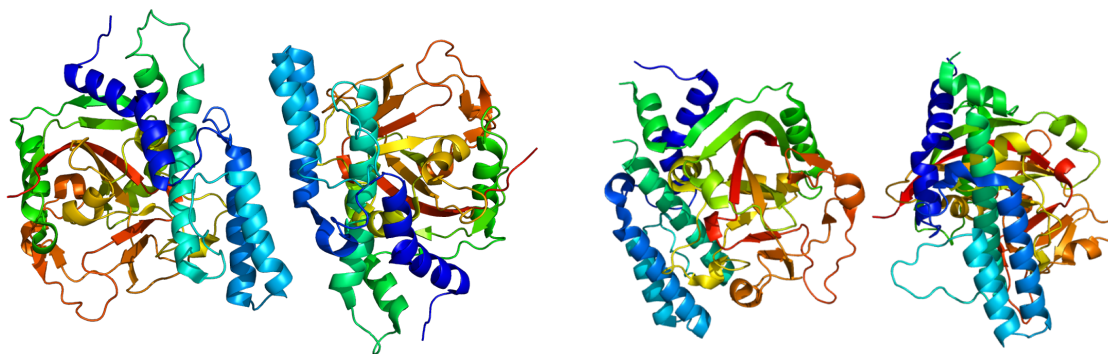
Για να εξάγουμε συμπεράσματα ως προς τα παραπάνω αποτελέσματα ενεργειών, ακολουθήθηκε το σκεπτικό ότι για να υπάρχει ένα πραγματιστικό «μέτρο» ικανότητας σύνδεσης του αναστολέα με κάθε πρωτεΐνη, καλό είναι να συγκρίνεται η ελεύθερη ενέργειά του, με εκείνη του μορίου-προσδέτη με το οποίο ανακτήθηκε η πρωτεΐνη (εγγενή προσδέτη), αφού έγινε docking και σε αυτό φυσικά το μόριο για να παραχθεί η αντίστοιχη τιμή ενέργειας, ή και με άλλα μόρια αναφοράς. Επίσης, τα αποτελέσματα των πειραμάτων docking είναι προφανώς ανεξάρτητα από εκείνα των ADMET, με την εξαίρεση των βασικών στοιχείων των χημικών δομών (όπως το μοριακό βάρος, το ηλεκτρικό φορτίο κ.λ.π που φυσικά συμμετέχουν στα μαθηματικά μοντέλα της μοριακής πρόσδεσης) που αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της φυσικοχημείας των ενώσεων.

Έτσι, συγκριτικά με τις προαναφερθέντα εγγενή μόρια, βλέπουμε ότι όλες οι εξεταζόμενες ενώσεις έχουν κάποια ανασταλτική ισχύ στις PARP-1/2 πρωτεΐνες. Οι εγγενείς προσδέτες έχουν προφανώς τα καλύτερα αποτελέσματα κατά μέσο όρο, με κάποια αντίστοιχη μεγαλύτερη εξειδίκευση ο καθένας για την πρωτεΐνη με την οποία ανακτήθηκε, αφού ούτως ή άλλως αυτοί οι προσδέτες ορίζουν και την περιοχή ουσιαστικά του ενεργού κέντρου που γίνεται η σύνδεση (GRID), ενώ είναι προφανές ότι η συντηρημένη και παρόμοια δομή των PARPs έχει σημαντικό ρόλο κι εδώ. Το μόριο αναφοράς 3AB και γνωστός αναστολέας των PARPs δίνει καλές, αλλά όχι καλύτερες, ενέργειες σύνδεσης σε σχέση με τον κάθε φορά εγγενή προσδέτη (3L3L, Olaparib), ως αναμενόμενο, με μια μικρή ειδικότητα προς την PARP-1. Το μικρό αλκυλιωτικό μόριο PA παρουσιάζει αρκετά καλές τιμές, λόγω προφανώς της μικρής χημικής δομής του και της έλλειψης εξειδίκευσης, όμως η ένωση ASE, εμφανίζει οριακά μέτριες τιμές ενέργειας πρόσδεσης και προς τις δύο

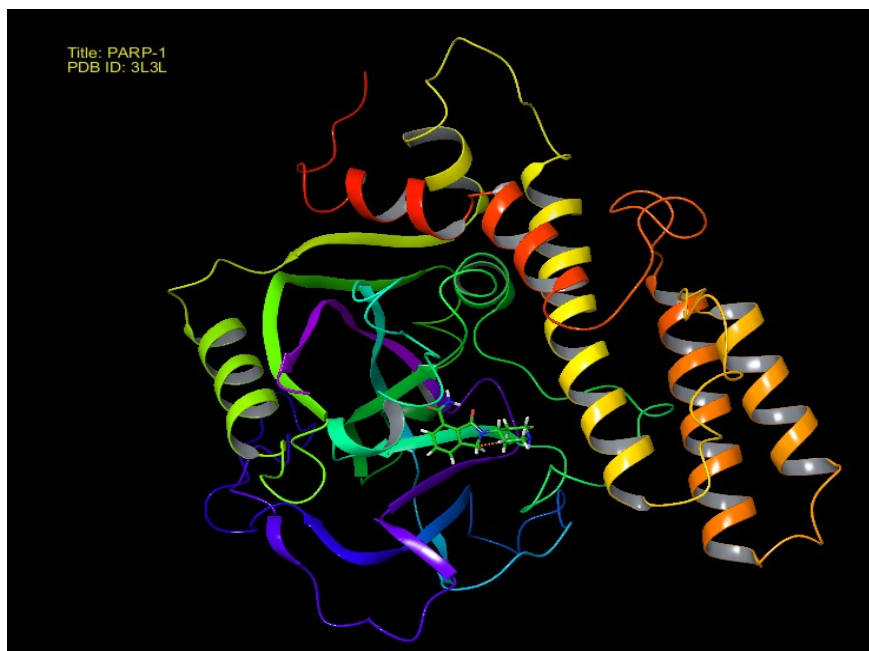
πρωτεΐνες. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί η ASE ως δομικά συγγενικό μόριο με τις νεοσυντιθέμενες λακταμικές στεροειδείς δομές, μας δίνει ένα αρχικό μέτρο της ικανότητας σύνδεσης με τις PARPs, ώστε να διευκρινίσουμε αν τα νέα μόρια αποτελούν καλύτερους προσδέτες, ενώ η σύγκριση των ενεργειών τους με τους ήδη γνωστούς προσδέτες των *PARP-1/2*, διευκρινίζει και αν πρόκειται για ικανούς αναστολείς. Συγκριτικά λοιπόν, η ένωση C έχει τα χειρότερα αποτελέσματα και πάλι, συγκρινόμενη όμως με της ASE σε τιμές ενέργειας. Ομοίως χειρότερα αποτελέσματα έχουμε για την ΧΕ3, ενώ για τις ΧΕ2 και ΧΕ4 τα αποτελέσματα είναι λίγο καλύτερα και συγκρινόμενα με τις ASE, αλλά μέτρια σε σχέση με τα άλλα μόρια αναφοράς και για τις δύο πρωτεΐνες. Έτσι εν τέλει, βλέπουμε ότι οι ενώσεις A, B, D, E είναι οι μόνες με αρκετά ικανοποιητικές τιμές ενέργειας, παραπλήσιες ή και καλύτερες (πιο αρνητικές αριθμητικά) κατα περιπτώσεις από τα εγγενή μόρια και τα μόρια αναφοράς, άρα με συγκρίσιμη ανασταλτική ισχύ με αυτά (και σίγουρα πιο ισχυρή ανασταλτική δράση από την ASE και πιθανότατα του PA, κατά τον μέσο όρο των ενεργειακών τιμών).

Προφανώς από τα πειράματα docking δεν μπορούν να εξαχθούν τελικές αποφάσεις μεμονωμένα, πιθανότατα και λόγω της ομοιότητας των δύο πρωτεϊνών, ειδικά στο καταλυτικό κέντρο κατά 69% [299], αλλά και της εξαιρετικής συγγένειας των χημικών δομών των εξεταζόμενων λακταμικών στεροειδών ενώσεων, που προφανώς δεν «ευνοούν» το πρόγραμμα να παρουσιάσει ικανοποιητικά «μεγάλες» διαφορές των ενεργειών μεταξύ τους (αρκετές ώστε να αποκλείσουν ή να προάγουν κάποια εξ αυτών περαιτέρω). Έτσι, δεν έχει νόημα να αναλυθεί, ποια από τις τελευταίες εμφανίζει μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές ενέργειας πρόσδεσης, καθώς είναι πολύ κοντινές μεταξύ τους οι τιμές αυτές, ενώ έχουν πολύ κοντινά δομικά χαρακτηριστικά ως ενώσεις, και κάτι τέτοιο θα ξεπερνούσε την ισχύ αυτού του πειράματος. Ως δεδομένο αξιολόγησης όμως, μπορούμε να κρατήσουμε ότι οι A, B, D, E με βάση τα δεδομένα των ενεργειών σύνδεσης της μοντελικής προσομείωσης μοριακής πρόσδεσης στις *PARP-1/2* (και με φαινομενικά ισχυρότερη τη διλακτάμη B), προκρίθηκαν στην επόμενη φάση προς χημική σύνθεση και διεξαγωγή πειραμάτων *in vitro*, κάτι που προτάθηκε και από την προηγούμενη φυσικοχημική μελέτη. Σε αυτές, και σε σύνδεση με τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα των ADMET μοντελικών δεδομένων, προστέθηκε και η ένωση C (η οποία όπως φάνηκε και παραπάνω έχει παρόμοια ανασταλτική ικανότητα με την ASE).

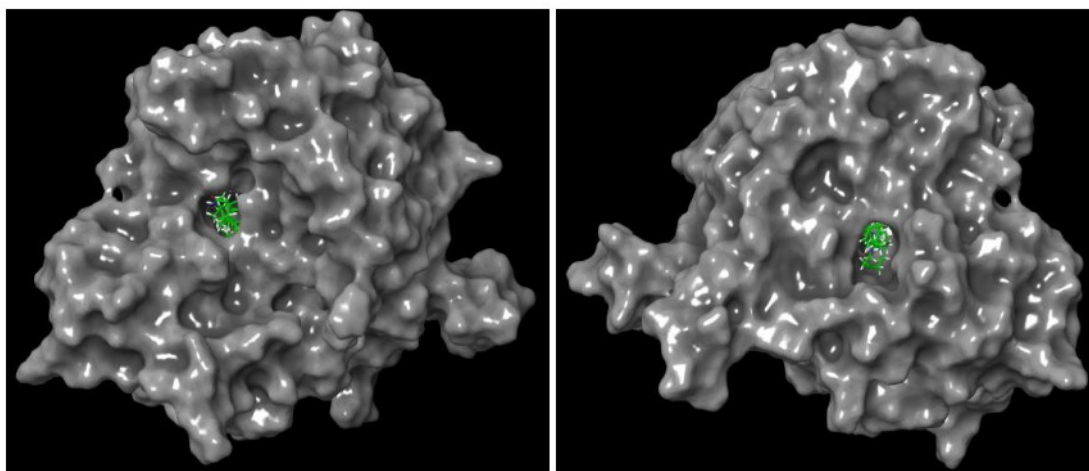
Παρακάτω φαίνονται διάφορες εικόνες από την πλατφόρμα του Maestro με τη μορφολογία και τη δομή με την οποία εμφανίζονται οι πρωτεΐνες και τα μόρια- προσδέτες κατά τη διάρκεια των διεργασιών μέχρι και τη μοριακή πρόδεση με το Glide για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 9.1. Βασικός δομικός σκελετός της PARP-1 (αριστερά) και της PARP-2 (δεξιά) με απεικόνιση των PDB αρχείων 1uk0 (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_PARP-1_PDB_1uk0.png) και 1gs0 (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_PARP-2_PDB_1gs0.png) μέσω του προγράμματος PyMOL (<https://pymol.org/2/#download>).



Εικόνα 9.2. Η PARP-1 (δομικός σκελετός) με τον τυπικό της προσδέτη (PDB code: 3L3L) να βρίσκεται στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Στο ίδιο σημείο θεωρούμε ότι προσδένονται και τα νέα μόρια που εξετάζουμε.



front_surface_4TVJ

back_surface_4TVJ

Εικόνα 9.3. Η PARP-2 (πρωτεΐνη σε πλήρη μοριακή απεικόνιση) με τον τυπικό της προσδέτη *Oloparib* από το PDB αρχείο 4TVJ να βρίσκεται στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου.

Alignment PARP_1 & PARP_2



Εικόνα 9.4. Η PARP-1 με την PARP-2 σε υπέρθεση (*superposition*- αλληλεπικάλυψη) και με προσδέτη στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Παρατηρείται η ομοιότητα των συντηρημένων βασικών δομικών σκελετών των πρωτεϊνών.

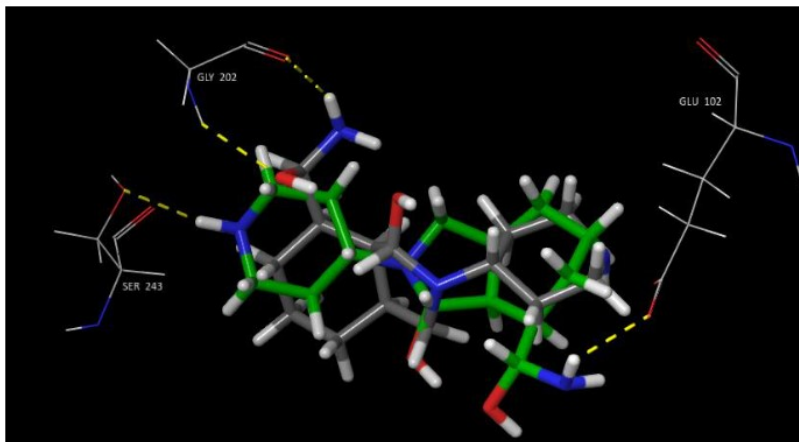
SP_validation_of_3L3L_PARP_1

Grey: crystal's ligand (molecule A906894)

Green: docking validation ligand

Ligand's docking score: **-6,031**

Ligand's glide emodel: **-51,397**



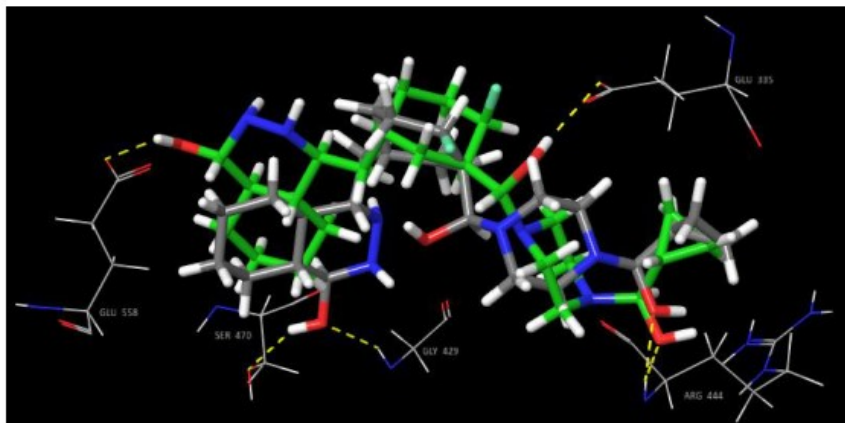
SP_validation_of_4TVJ_PARP_2

Grey: crystal's ligand (**Olaparib**)

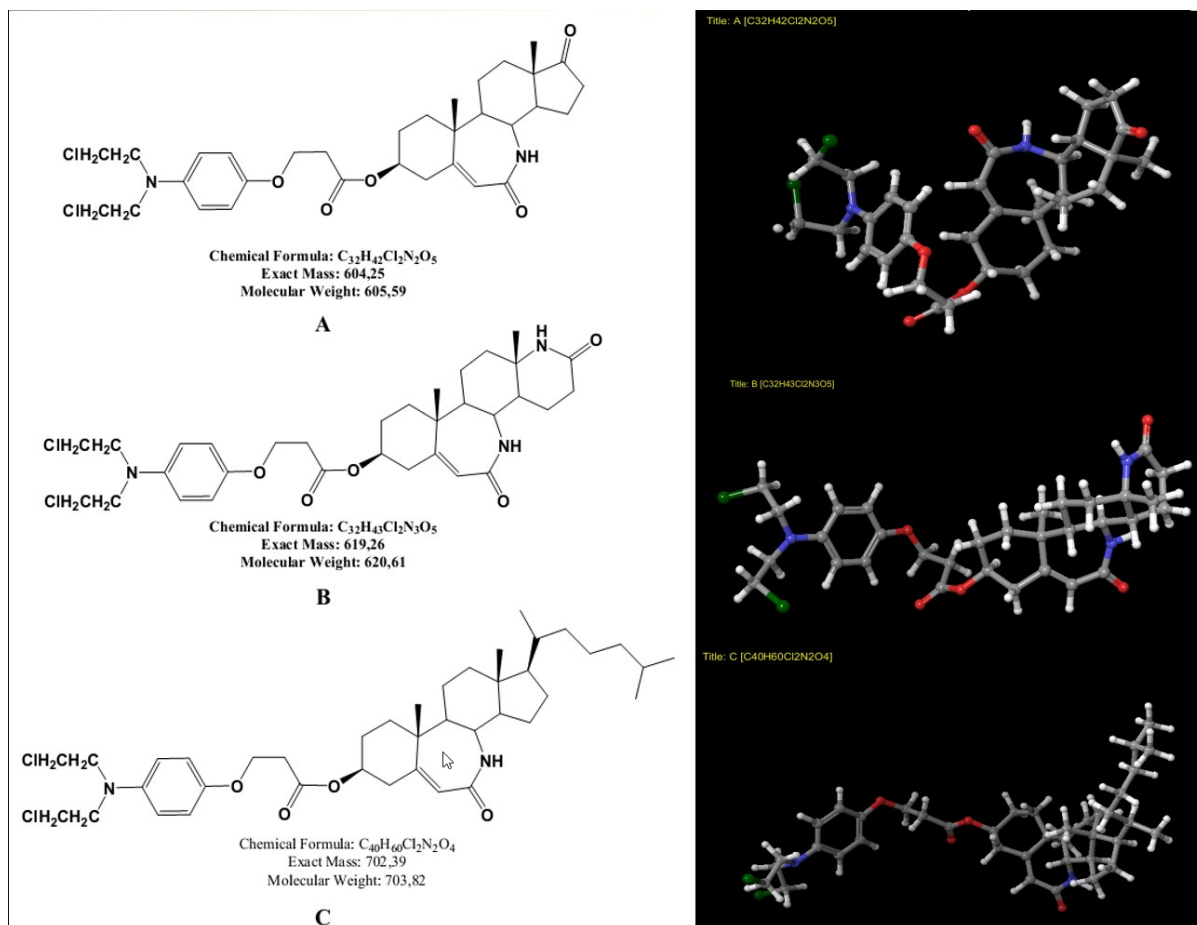
Green: docking validation ligand

Ligand's docking score: **-7,506**

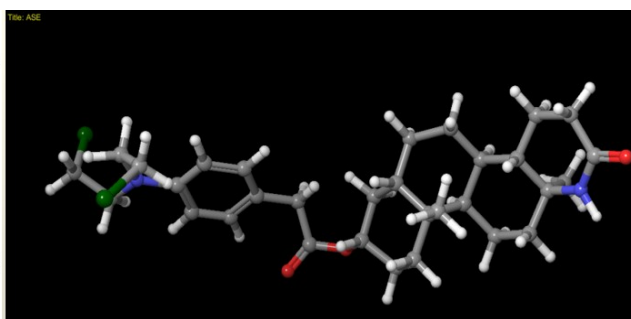
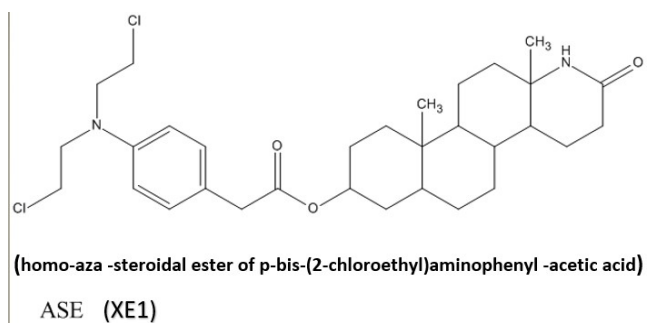
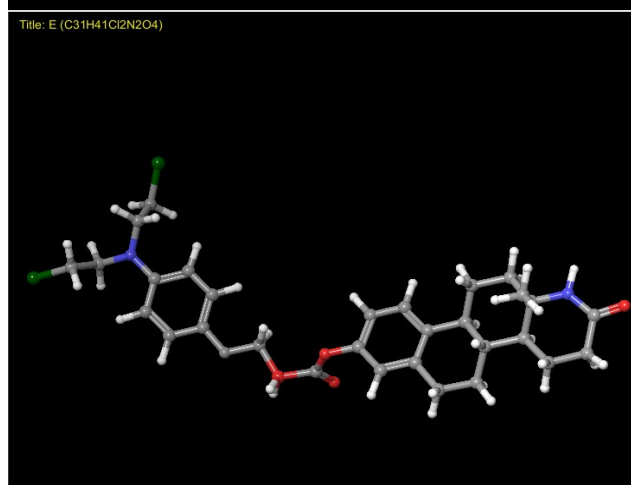
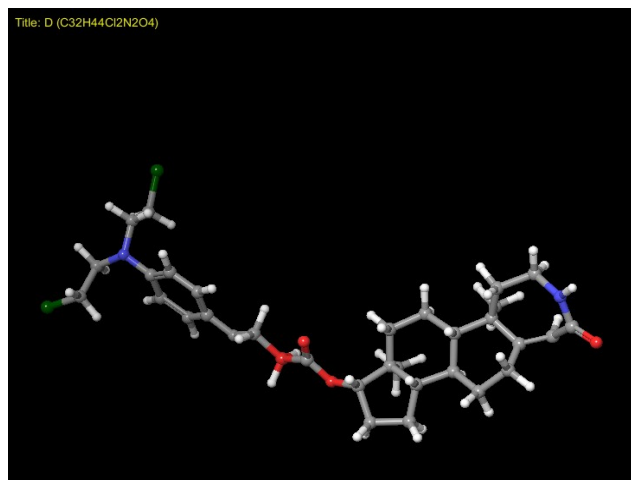
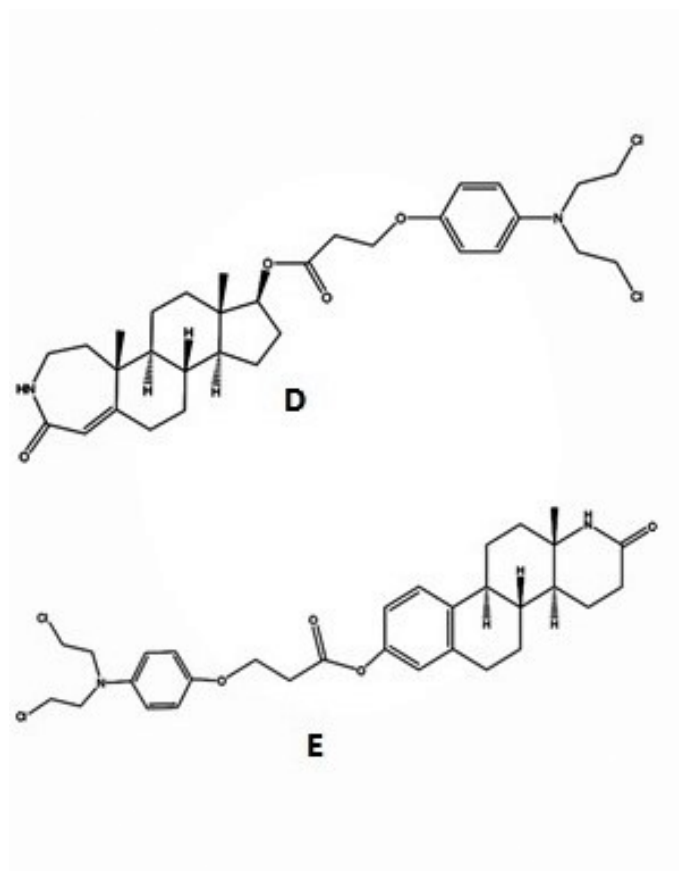
Ligand's glide emodel: **-73,373**



Εικόνα 9.5. Εμφανίζονται: α. ο εγγενής προσδέτης A906894 (3L3L) στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου της PARP-1 και β. ο εγγενής προσδέτης Olaparib (4TVJ) στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου της PARP-2 και η δεσμοί τους με διάφορα αμινοξέα των ενζύμων.

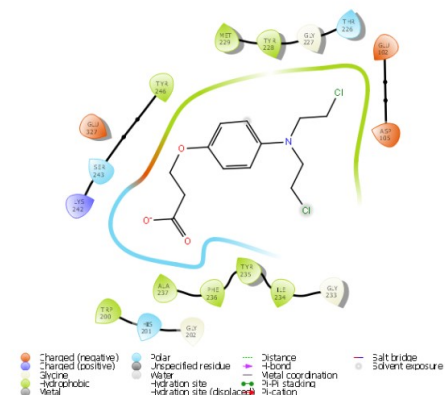
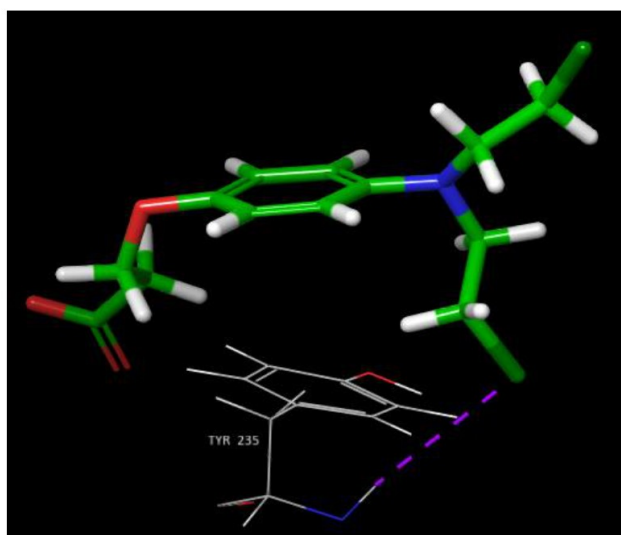


Εικόνα 9.6.α. Οι δομές χημικά και μοντελικά για τις ενώσεις A (ASA-A ή B-λακταμικός στεροειδής εστέρας προερχόμενος από δεϋδροεπιανδροστερόνη), B (ASA-B ή B,D-διλακταμικός στεροειδής εστέρας προερχόμενος από δεϋδροεπιανδροστερόνη) και C (ASA-C ή B-λακταμικός στεροειδής εστέρας προερχόμενος από χοληστερόλη).

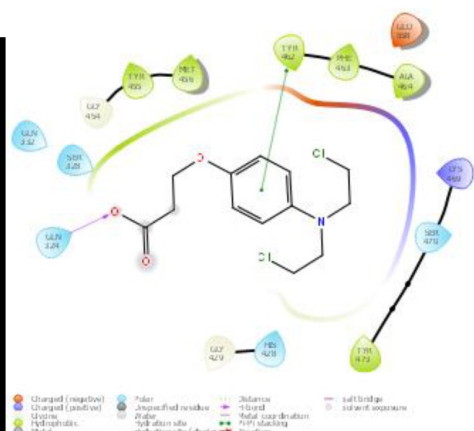
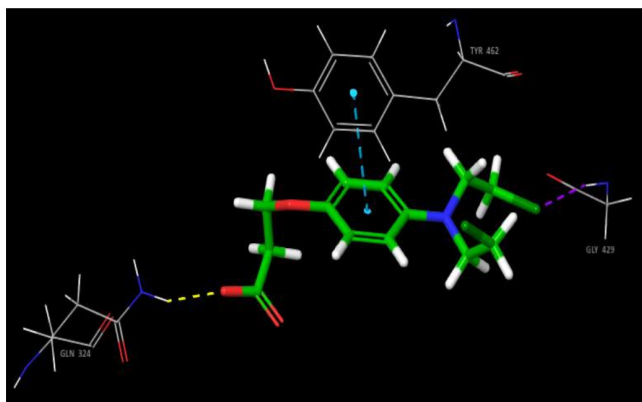


Εικόνα 9.6.β. Οι δομές χημικά και μοντελικά για τις μονολακταμικές ενώσεις D (ENGA-L06E) και E (ENGA-L08E) προερχόμενες από τα πρόδρομα μόρια τεστοστερόνης και οιστρονής αντίστοιχα, καθώς και για το μόριο αναφοράς και λακταμικό στεροειδή αλκυλιωτή ASE.

Mol_propionic



Mol_propionic



Εικόνα 9.7. Εμφανίζεται το αλκυλιωτικό μόριο PA στην κοιλοτητα του ενεργού κέντρου της PARP-1 (πάνω) και της PARP-2 (κάτω) και η δεσμοί του με διάφορα αμινοξέα στο σημείο πρόσδεσης.

9.2 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της *in vitro* δραστηριότητας των ενώσεων-στόχων

Από τις *in silico* (υπολογιστικές) μελέτες όπως εδείχθη, επιλέχθηκαν ως πιο πιθανοί δραστικοί 4 μονολακταμικοί στεροειδείς αλκυλιωτές, της δεϋδροεπιανδροστερόνης, του 5-cholesten-3 β -ol-7-one, της τεστοστρόνης και της οιστρόνης (A, C, D ,E) και η B διλακτάμη της δεϋδροεπιανδροστερόνης εστεροποιημένοι με τον αλκυλιωτικό παράγοντα 2-χλωρο-αιθυλ-αμινο-φαινοξυπροπιονικό οξύ (PA ή POPA).

9.2.1 *In vitro* μελέτη κυτταροστατικής- κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων A, B, C, D, E

Κατά την *in vitro* μελέτη εκτιμήθηκε αρχικά η δράση των χημικών ενώσεων A, B, C, D και E, με επίδραση για 48 ώρες στις καρκινικές κυτταρικές σειρές SKOV-3, OVCAR-3, UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, συγκριτικά με την φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC-5 και σε σχέση με τις ενώσεις αναφοράς 3AB, PA και Olaparid. Η όλη διαδικασία διήρκησε 72 ώρες και τα κύτταρα παρέμειναν σε επωαστή. Εξέταστηκαν διαδοχικές συγκεντρώσεις των παραπάνω χημικών ενώσεων (0.1-100 $\mu\text{mol/l}$) σε τριπλά δείγματα των κυτταρικών σειρών σε μικροπλάκες καλλιέργειας, έτσι ώστε να είναι εφικτή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η εκτίμηση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές **GI50** (Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης) (Growth Inhibition 50%), **TGI** (Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί 100% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης) (Total Growth Inhibition) αναδεικνύοντας τη κυτταροστατική δράση των ενώσεων και **IC50** (Η μέση συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων) (Inhibition Concentration 50%) αναδεικνύοντας την κυτταροτοξική δράση των ενώσεων. Τα αποτελέσματα ανα κυτταρική σειρά (UWB1.289, UWB1.289 + BRCA1, OVCAR-3, SKOV-3 και MRC-5) συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Κυτταρική σειρά	ASA-A (A)			ASA-B (B)			ASA-C (C)		
	GI50(	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	19 ± 1.83	52 ± 4.61	71 ± 7.01	10 ± 0.81	35 ± 3.63	54 ± 5.11	73 ± 7.58	>100	>100
UWB1.289+BRCA1	22 ± 2.01	54 ± 4.33	76 ± 6.66	20 ± 1.86	72 ± 6.71	95 ± 9.03	>100	>100	>100
SKOV-3	15 ± 1.26	33 ± 2.79	67 ± 7.11	24 ± 2.42	51 ± 4.46	98 ± 8.97	>100	>100	>100
OVCAR-3	29 ± 3.04	38 ± 2.95	47 ± 4.82	44 ± 5.04	81 ± 7.82	>100	>100	>100	>100
MRC-5	69 ± 7.13	>100	>100	86 ± 6.95	>100	>100	>100	>100	>100
	ENGA-L06E (D)			ENGA-L08E (E)			ASE (XE1)		
	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	3.5 ± 0.42	8 ± 0.83	20 ± 1.10	8 ± 0.90	20 ± 1.54	45 ± 3.30	60 ± 3.81	93 ± 9.12	>100
UWB1.289+BRCA1	12 ± 0.74	28 ± 1.92	40 ± 3.54	18 ± 1.04	76 ± 7.21	88 ± 8.14	80 ± 6.83	>100	>100
SKOV-3	18 ± 1.90	52 ± 1.98	76 ± 2.39	10 ± 1.29	76 ± 1.62	>100	16 ± 1.42	28 ± 1.93	56 ± 1.85
OVCAR-3	22 ± 1.34	32 ± 1.58	43 ± 1.00	30 ± 1.69	40 ± 1.25	56 ± 2.32	32 ± 3.45	54 ± 3.76	65 ± 3.38
MRC-5	59 ± 3.20	>100	>100	63 ± 1.41	>100	>100	93 ± 3.87	>100	>100
	3AB			POPA (PA)			Olaparib		
	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	92 ± 12.98	>100	>100	64 ± 6.72	>100	>100	14 ± 1.78	85 ± 9.34	>100
UWB1.289+BRCA1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
SKOV-3	>100	>100	>100	77 ± 7.54	>100	>100	>100	>100	>100
OVCAR-3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	32 ± 4.64	>100	>100
MRC-5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

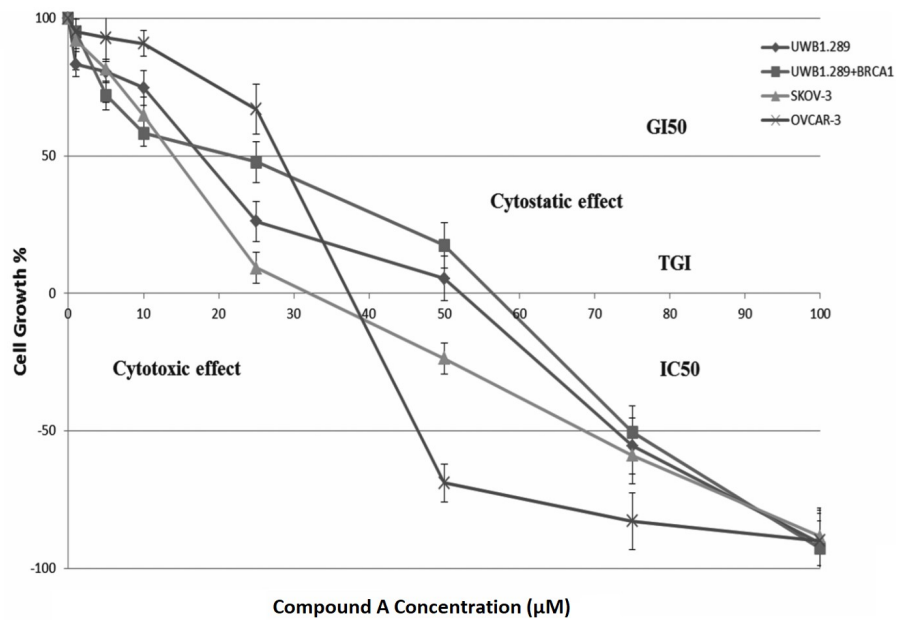
Πίνακας 9. *In vitro* κυτταροστατικές (IG50 και TGI ±SEM) (μM) και κυτταροτοξικές (IC50±SEM) (μM) δράσεις των ενώσεων ASA-A, ASA-B, ENGA-L06E (D), ENGA-L08E (E), ASA-C, PA (POPA), 3AB και Olaparib σε όλες τις κυτταρικές σειρές της μελέτης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν πειράματα εις τριπλούν με στατιστική σημαντικότητα $p < 0.01$.

Όλες οι νεοσυντιθέμενες υπό μελέτη ενώσεις προκάλεσαν δόσοεξαρτώμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Οι ενώσεις A, B, D, και E παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική και κυτταροτοξική δραστηριότητα σε σύγκριση με τη C και τα μόρια αναφοράς PA, 3AB και Olaparid, αλλά και την συγγενικής λακταμικής δομής ASE, έναντι των 4 μελετηθέντων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών του καρκίνου των ωοθηκών (UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3) ($p < 0,001$, Student's t-test). Η ένωση C και το PA παρέμειναν σχεδόν εντελώς αναποτελεσματικά ακόμα και στη μέγιστη συγκέντρωση των

100μM, σε όλες τις διερευνούμενες κυτταρικές σειρές. Στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, η ένωση 3AB παρουσίασε στατιστικά μη σημαντική, μηδαμινή σχεδόν, επίδραση, κάτι που είναι αναμενόμενο βέβαια, καθώς δεν διαθέτει αλκυλιωτικές ιδιότητες. Το Olaparid εν τούτοις, παρότι μόνο μόριο-αναστολέας των PARP, παρουσίασε μια περιορισμένη κυτταροστατική, αλλά όχι κυτταροτοξική, δράση έναντι της κυτταρικής σειράς UWB1.289, και λιγότερο έναντι της OVCAR-3 (η πρώτη είναι στατιστικά και η πιο ευάλωτη κυτταρική σειρά, ανευ BRCA λειτουργικότητας, ενώ και για τη δεύτερη, φαίνεται ότι μάλλον έχει σημαντικό ρόλο κάποιο αναστελλόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, πιθανόν των PARP). Τελικά φαίνεται ότι η ένωση A, παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα δράσης συγκριτικά με την ένωση B σε όλες τις κυτταρικές σειρές εξαιρουμένης της κυτταρικής σειράς UWB1.289 καθώς η ένωση B παρήγαγε καλύτερη κυτταροστατική και κυτταροτοξική δράση, παρουσιάζοντας συνεργιστική θνησιμότητα. Ομοίως μάλλον συνέβη και με την ένωση D, που είχε τα καλύτερα αποτελέσματα από όλες τις ενώσεις, με ιδιαίτερη δράση προς τα UWB1.289 κύτταρα. Επίσης ισχυρή κυτταροτοξική δράση εμφάνισε και στα κύτταρα UWB1.289+BRCA, ενώ για τις SKOV-3 και OVCAR-3 σειρές, ήταν συγκρίσιμη με την ένωση A, η οποία όμως διατηρεί παρόμοιο φαρμακολογικό προφίλ δράσης σε όλες τις σειρές, με ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την κυτταροτοξικότητα, αλλά πιθανώς με μειωμένη συνθετική θνησιμότητα. Η ένωση E, αν και εμφανίζει αντικρουόμενα χαρακτηριστικά ως προς τις σειρές που αναστέλλει με μεγαλύτερη επιτυχία, όπως και η ASE, δρα ικανοποιητικά κυρίως στα UWB1.289 και στα OVCAR-3 κύτταρα, έχοντας τις καλύτερες μετρημένες τιμές κατά μέσο όρο από όλες τις ενώσεις. Τέλος, είναι σαφές ότι, οι ενώσεις A, B, D και E παρουσιάζουν ειδικότητα δράσης ως προς τις καρκινικές σειρές προς διερεύνηση καθώς επιδεικνύουν κυτταροστατική (IG50 και TGI) και κυτταροτοξική (IC50) δράση σημαντικά λιγότερη στη ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοβλαστών του πνεύμονα MRC-5.

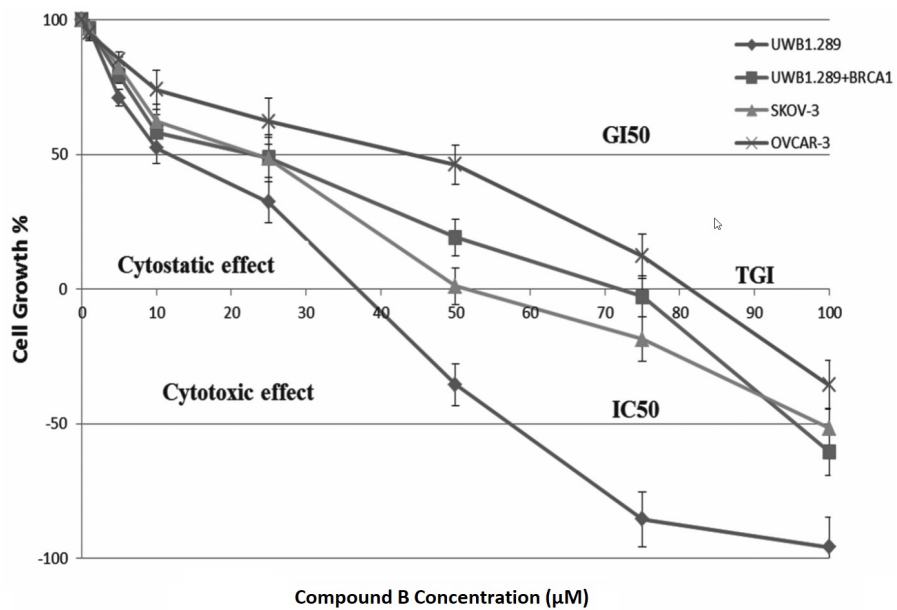
Στα παρακάτω διαγράμματα (1-6) φαίνεται η διαφορετική κυτταρολογική δράση (κυτταροστατικότητα ή κυτταροτοξικότητα) των μορίων A, B, C, D, E και του αλκυλιωτή αναφοράς PA ανάλογα με την κυτταρική σειρά.

Ένωση A



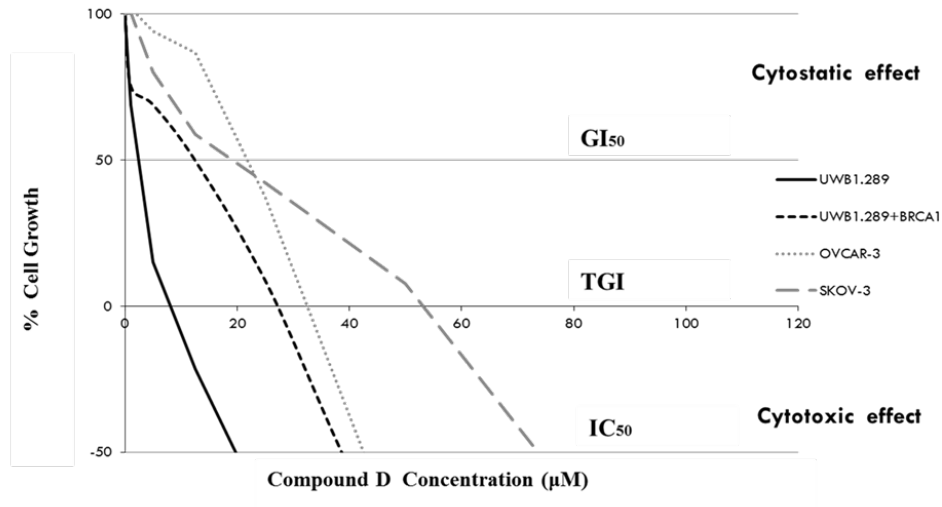
Διάγραμμα 1. Μελέτη της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης της χημικής ένωσης B στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

Ένωση B



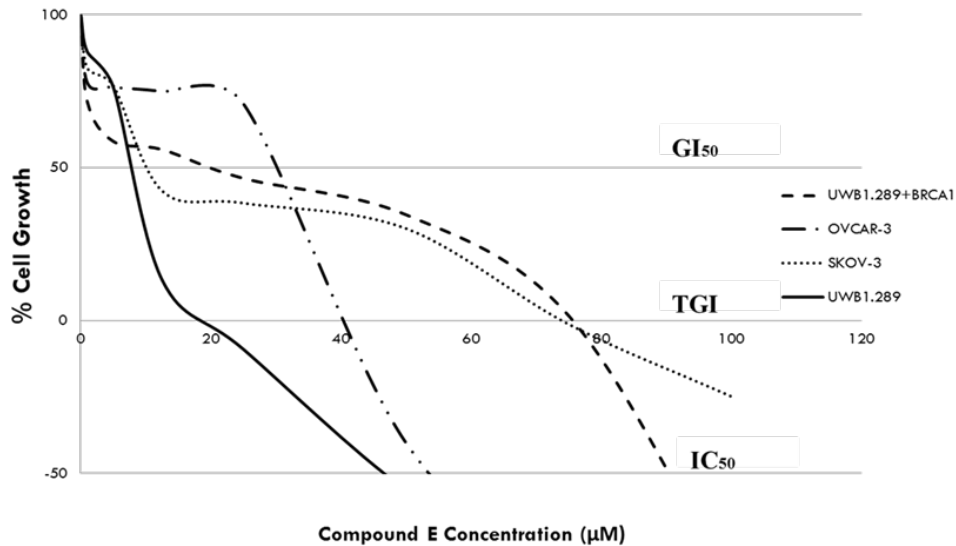
Διάγραμμα 2. Μελέτη της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης της χημικής ένωσης B στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

ENGA-L06E (Ένωση D)



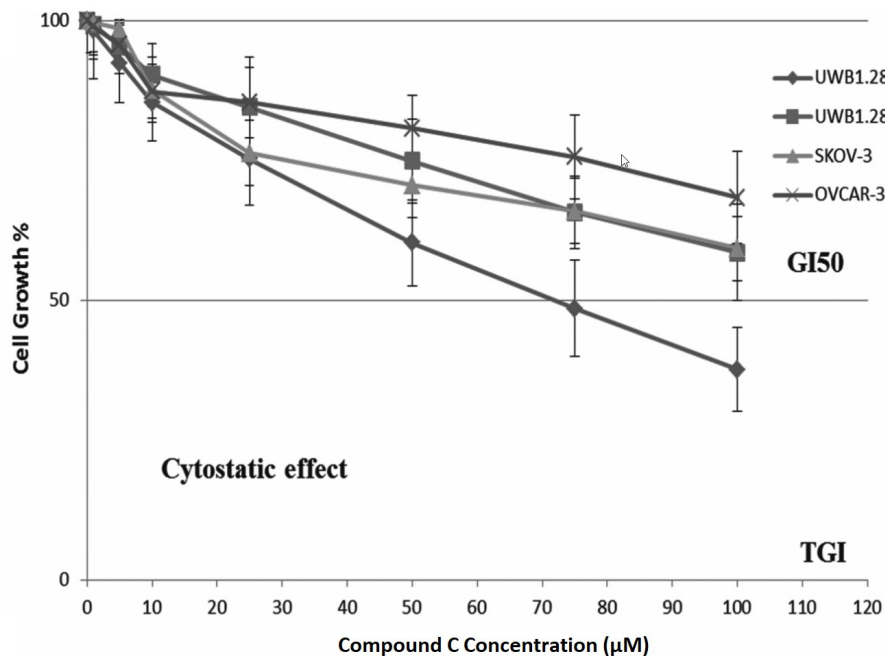
Διάγραμμα 3. Μελέτη της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης της χημικής ένωσης D/ ENGA-L06E στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

ENGA-L08E (Ένωση E)



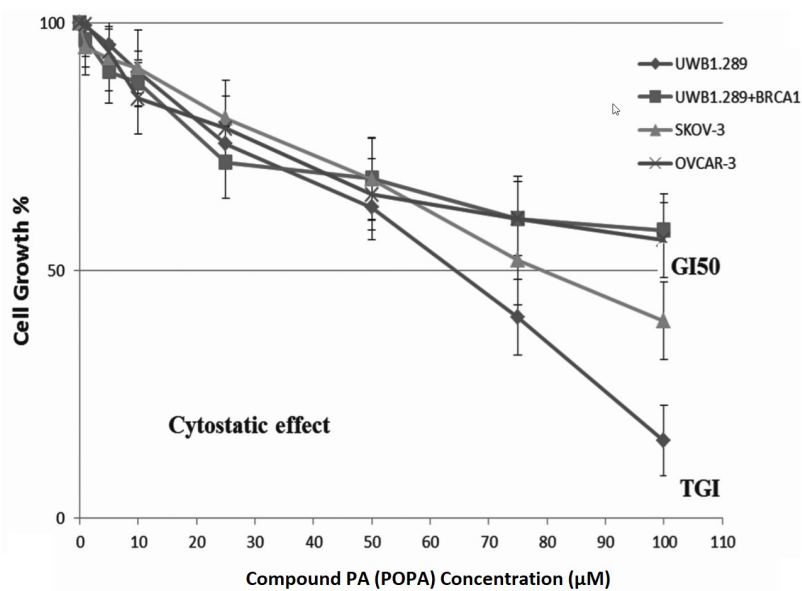
Διάγραμμα 4. Μελέτη της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης της χημικής ένωσης E/ ENGA-L08E σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

Ένωση C



Διάγραμμα 5. Μελέτη της κυτταροστατικής δράσης της χημικής ένωσης C σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

Ένωση PA (POPA)



Διάγραμμα 6. Μελέτη της κυτταροστατικής δράσης της χημικής ένωσης αναφοράς PA (POPA) σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών της μελέτης.

9.2.2 Ανάλυση και αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων στην PARP με χρωματομετρική μέθοδο

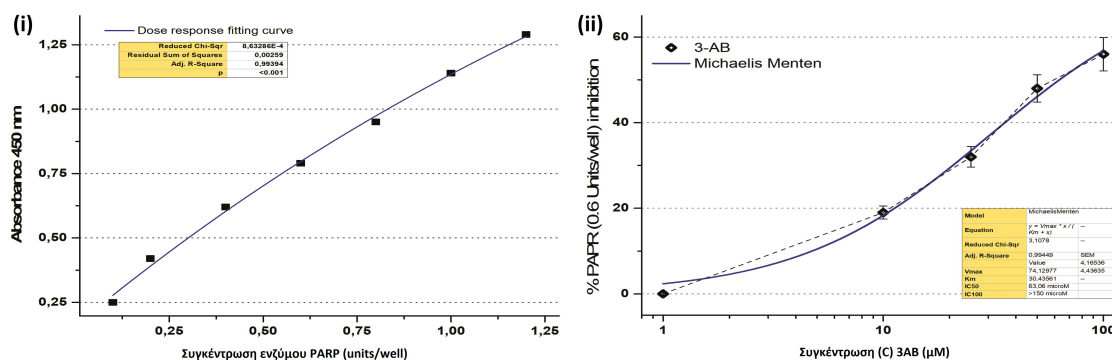
Η δραστηριότητα της πρωτεΐνης *PARP-1* προσδιορίστηκε (R&D Systems) με βάση την ενσωμάτωση της βιοτινυλιωμένης ADP-ριβόζης σε πρωτεΐνες ιστόνης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Ελέγχθηκε και καταγράφηκε η ανασταλτική δράση των χημικών ενώσεων A, B, C, D, E, Olaparib και PA (συγκέντρωση 300 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 1 μM) έναντι του τυπικού αναστολέα της *PARP-1*, 3AB σε διάφορους χρόνους (0 λεπτά, 15 λεπτά, 30 λεπτά, 60 λεπτά). Στον Πίνακα 10.α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μέσων τιμών της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων που μελετήθηκαν, ως προς τις συγκεντρώσεις της κάθε μιας που προκάλεσε 50% αναστολή (IC50) ή ολική αναστολή 100% (TCI ή IC100) της ενζυμικής δραστηριότητας της PARP. Με βάση τα αποτελέσματα μετρήσεων της φασματοφωτομετρικής απορρόφησης στα 450 nm, σχεδιάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες δράσης του PARP και της 3AB (Εικόνα 9.8.α). Κατ' αντιστοιχία προέκυψαν οι καμπύλες αναστολής (στην Εικόνα 9.8.β παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές, με θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα) και η ανάλυση κινητικής των εξεταζόμενων ενώσεων, με βάση το μοντέλο ενζυματικής κινητικής Michaelis- Menten (Εικόνα 9.8 και Πίνακας 10.β).

	IC50 (μM)	(TCI) IC100 (μM)
3AB	63.06 $\pm$ 4.28	>150
ASA-A (A)	59.6 $\pm$ 6.42	>150
ASA-B (B)	35.16 $\pm$ 3.78	145.8 $\pm$ 14.29
ASA-C (C)	165.6 $\pm$ 19.77	>300
ENGA-L06E (D)	28.19 $\pm$ 1.23	>300
ENGA-L08E (E)	44.67 $\pm$ 1.35	>300
POPA (PA)	132.68 $\pm$ 22.15	>300
ASE	50.12 $\pm$ 1.35	>300
Olaparib	0.95 $\pm$ 0.12	13.17 $\pm$ 1.57

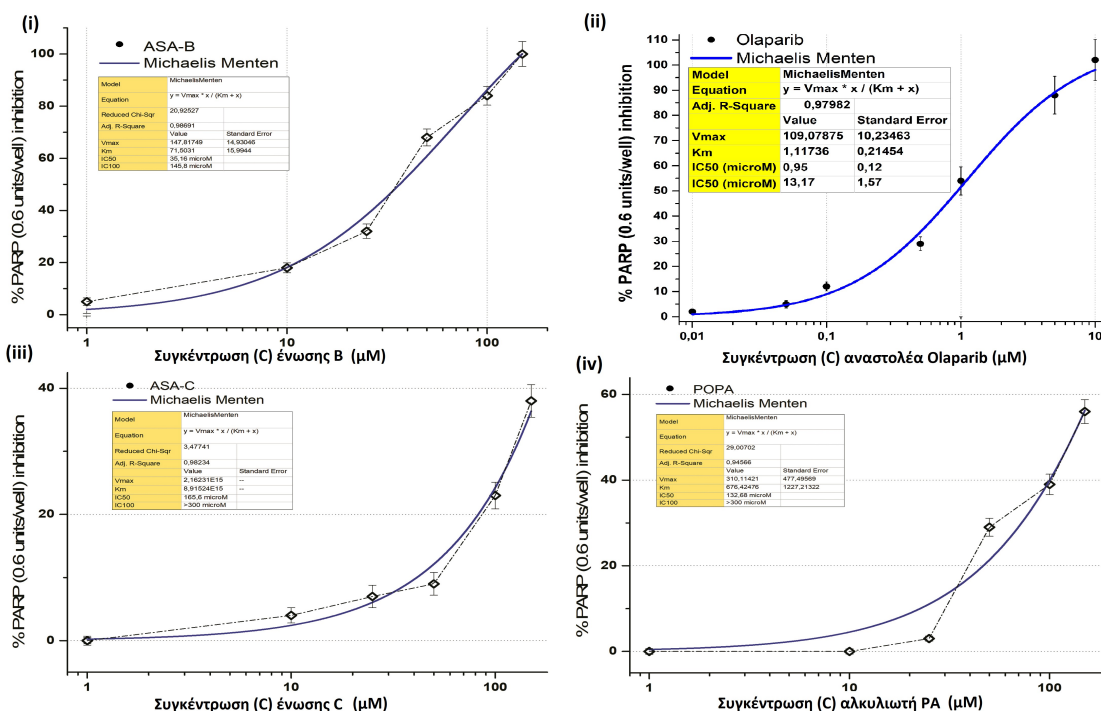
Πίνακας 10.α. Τιμές των συγκεντρώσεων των μελετούμενων ενώσεων που προκαλούν αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας των PARP ενζύμων κατά 50% (IC50) και 100% (TCI/ IC100) μετρημένες στα 450 nm οπτικής πυκνότητας. Οι τιμές αποτελούν μέση τιμή των μετρήσεων της κάθε ένωσης $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (mean $\pm$ SEM).

Ενώσεις	3AB	ASA-A (A)	ASA-B (B)	ASA-C (C)	POPA (PA)	Olaparib
Adj. R-Square	0.99449	0.93059	0.98691	0.98234	0.94566	0.97982
Vmax	74.130 ± 4.16	124.644 ± 60.83	147.817 ± 14.93	2.162 E15 ± 4.18 E15	310.114 ± 447.49	109.079 ± 10.23
Km	30.436 ± 4.43	111.851 ± 88.70	71.5031 ± 15.99	8.915 E15 ± 13.01 E15	676.425 ± 1227.41	1.117 ± 0.214
IC50 (μM)	63.06 ± 4.28	59.6 ± 6.42	35.16 ± 3.78	165.6 ± 19.77	132.68 ± 22.15	0.95 ± 0.12
IC100 (μM)	>150	>150	145.8 ± 14.29	>300	>300	13.17 ± 1.57

Πίνακας 10.β. Δεδομένα της ενζυμικής κινητικής κατά το μοντέλο Michaelis Menten ($\pm$ SEM) της αναστολής της PARP (0.6 units/well), απο τις ενώσεις 3-aminobenzamide (3AB), ASA-A (ένωση A), ASA-B (ένωση B), ASA-C (ένωση C), POPA (PA) και Olaparib.



Εικόνα 9.8.α. (i) Γραφική αναπαράσταση της πρότυπης καμπύλης της PARP χωρίς επίδραση ουσιών (Adj. R-square 0.994, $p < 0.001$); (ii) [PARP (0.6 units/well)] Καμπύλη αναστολής και αντίστοιχη ανάλυση ενζυμικής κινητής με βάση το μοντέλο Michaelis - Menten για τον εμπορικό αναστολέα 3-aminobenzamide (3AB)



Εικόνα 9.8.β. Καμπύλες αναστολής της ενεργότητας της PARP [PARP (0.6 units/well)]. Καμπύλη αναστολής και αντίστοιχη ανάλυση ενζυμικής κινητής με βάση το μοντέλο Michaelis - Menten για (i) την ένωση B (ASA-B), (ii) για τον ευρέως μελετημένο και φαρμακευτικό αναστολέα τρίτης γενιάς της PARP, Olaparib (AZD2281, AstraZeneca Pharmaceuticals). (iii) για την ένωση C (ASA-C), (iv) για την ένωση PA, το αλκυλιωτικό μόριο αναφοράς με το οποίο εστεροποιήθηκαν τα λακταμικά στεροειδή παράγωγα κατά τη χημική σύνθεση.

Οι μελετηθέντες ουσίες A, B, D, E και ASE προκαλούν σημαντική στατιστικά δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ενεργότητας της PARP-1 (t-test, $p < 0.0001$). (Πίνακας 10 και Εικόνα 9.8). Ο αναστολέας αναφοράς 3-AB προκαλεί αναστολή της PARP-1 στα 63,06 μM . Οι ενώσεις B και D είναι οι ισχυρότεροι αναστολείς της PARP-1 συγκριτικά με τον 3AB (t-test, $p < 0.01$), με την B να εμφανίζει και 100% αναστολή στα 145,8 μM . Αυτή η ένωση είναι η μόνη που το πετυχαίνει μετά τον φαρμακευτικό αναστολέα Olaparib, ο οποίος βέβαια δίνει εξαιρετικά ανασταλτικά αποτελέσματα, πολύ καλύτερα από όλες τις άλλες χημικές ενώσεις της μελέτης, παρουσιάζοντας και ολική αναστολή IC100 μόλις στα 13,17 μM . Οι χημικές ουσίες A, E, και ASE προκαλούν 50% αναστολή (IC50) της ενεργότητας της PARP-1 περίπου σε συγκεντρώσεις 59,6 μM , 44,67 μM και 50,12 μM , αντίστοιχα (Πίνακας 10), παρουσιάζοντας μια αρκετά υψηλή ανασταλτική δράση. Επιπλέον, οι A και E λακταμικοί εστέρες εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές αναστολής με το λακταμικό στεροειδές και μόριο

αναφοράς ASE, ενώ η ένωση B αλλά ακόμα και η ένωση A, αναστέλλουν την ενεργότητα της *PARP-1* με καλύτερη κινητική K_m και V_{max} από το μόριο 3AB (t-test, $p < 0.01$). Αντιθέτως η ένωση C δρα ως αδύναμος ανασταλτικός παράγοντας με $IC_{50} > 100 \mu M$ (165,6 μM), και αποτελεί λιγότερο ικανό αναστολέα της *PARP* ακόμα κι από τον αλκυλιωτή PA (132,68 μM). Επιπλέον, το PA φαίνεται να αναστέλλει την ενεργότητα της *PARP-1* μόνο σε υψηλές τιμές IC_{50} με υψηλές τιμές K_m και V_{max} .

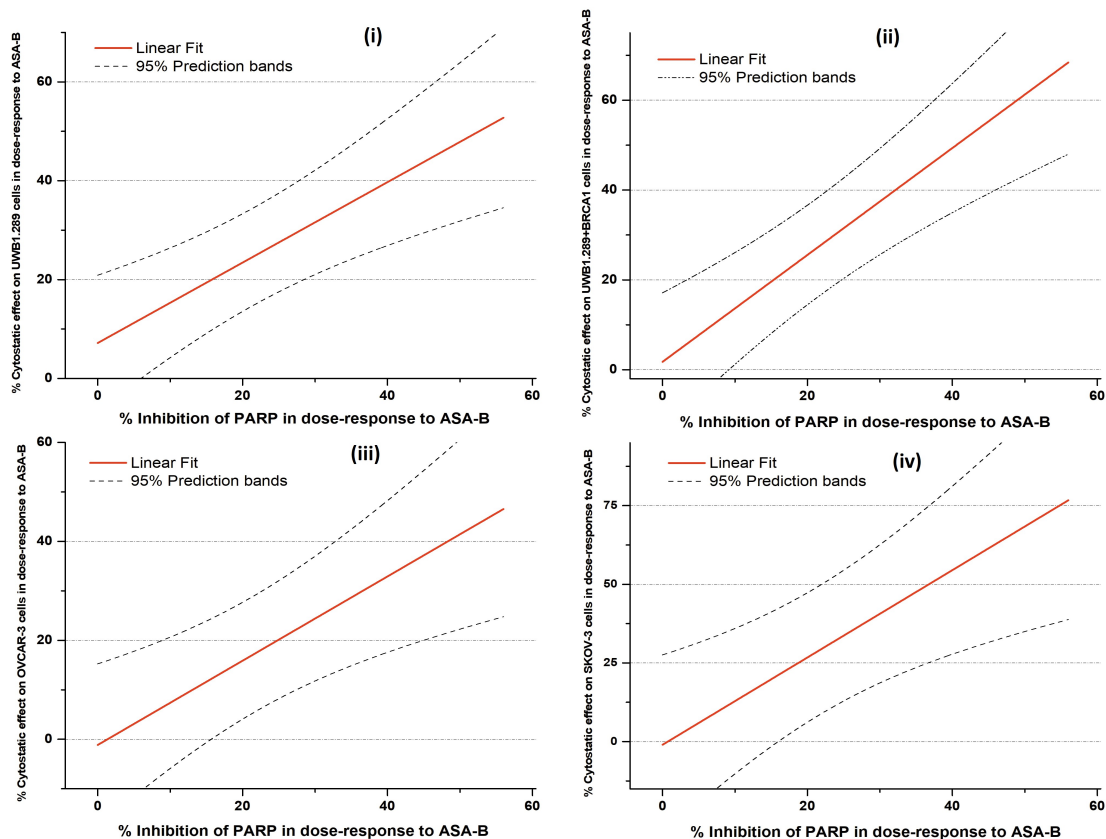
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα προηγούμενα *in vitro* πειράματα κυτταροστατικότητας και κυτταροτοξικότητας, αλλά και με τα *in silico* γενικά, καθώς η μοριακή πρόσδεση μας έδωσε τα ίδια μόρια ως ισχυρούς αναστολείς, χωρίς να εξετάζει σε βάθος την ποιότητα της σύνδεσης αλλά και την απαιτούμενη ποσότητα του προσδέτη. Υπάρχει εν ολίγοις, λίγο διαφορετική σειρά των μορίων, ως προς την αναμενόμενη ανασταλτική ισχύ (π.χ. η D εδώ εμφανίζεται καλύτερος αναστολέας από την B διλακτάμη, όχι όμως με μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση του IC_{50} , και με καλύτερο IC_{100} για την B ένωση). Εξαίρεση και μια βασική διαφορά αποτελεί, η πολύ καλύτερη πραγματική ικανότητα πρόσδεσης του Olaparib σε σχέση με ό,τι εμφανίζεται στο μοντελικό σύστημα. Τέλος, ο αλκυλιωτής PA εμφανίζεται πιο αδύναμος από το αναμενόμενο αναστολέας σε σχέση με τη μοριακή μελέτη πρόσδεσης, χωρίς όμως μεγάλη διαφορά. Όλα αυτά είναι σχετικά αναμενόμενα, περνώντας από το μοντελικό σύστημα σε ένα εργαστηριακό πείραμα, αφού ούτως ή άλλως δεν υπάρχουν μεγάλες διαφοροποιήσεις στα τελικά δεδομένα.

Παρακάτω (Πίνακας 11) φαίνονται μερικά παραδείγματα συσχέτισης της ανασταλτικής δράσης επί της *PARP*, με την κυτταροστατική/ κυτταροτοξική δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές της μελέτης, μέσω δεικτών συσχέτισης κατά Pearson (Pearson's correlation index-«r») (Εικόνα 9.9, Πίνακας 11). Διαπιστώνεται ότι για τις ενώσεις A και B η συσχέτιση αυτή είναι υψηλή, με $(r) > 0,90$, $p < 0,01$. Αντίθετα οι συσχετίσεις για τις ενώσεις C και PA δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η ένωση 3AB παρουσιάζει επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανασταλτικής της δράσης προς την *PARP-1* και της κυτταροστατικής της δράσης, μόνο όμως για την κυτταρική σειρά UWB1.289.

		UWB1.289	UWB1.289+BRCA1	OVCAR-3	SKOV-3
ASA-B	Pearson's r	0.93	0.96	0.93	0.91
	Significance level (<i>p</i>)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
ASA-A	Pearson's r	0.95	0.97	0.91	0.90
	Significance level (<i>p</i>)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
ASA-C	Pearson's r	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
	Significance level (<i>p</i>)	NS*	NS	NS	NS
POPA	Pearson's r	<0.50	<0.50	<0.50	<0.50
	Significance level (<i>p</i>)	NS	NS	NS	NS

* NS: μη σημαντική συσχέτιση ($p > 0.05$).

Πίνακας 11. Συσχέτιση με «Pearson's correlation indexes» και η αντίστοιχη στατιστική σημαντικότητα (*p*) της κυτταροστατικής δράσης και της αναστολής της PARP για τους νεοσυντιθέμενους λακταμικούς στεροειδείς αλκυλιωτές B (ASA-B), A (ASA-A) και C (ASA-C) καθώς και για το αλκυλιωτικό παράγωγο προπανοϊκού οξέως PA (POPA) στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, OVCAR-3 and SKOV-3.



Εικόνα 9.9. Καμπύλες συσχέτισης και 95% προγνωστικές ζώνες μεταξύ της ποσοστιαίας αναστολής της PARP και των ποσοστιαίων κυτταροστατικών επιδράσεων σε απόκριση της αλλαγής συγκέντρωσης της B,D-δολακταμικής ένωσης B (ASA-B) στα (i) UWB1.289, (ii) UWB1.289+BRCA1, (iii) OVCAR-3 και (iv) SKOV-3 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών.

9.3 Μεταγραφική ανάλυση των γονιδίων *PARP-1* και *PARP-2*

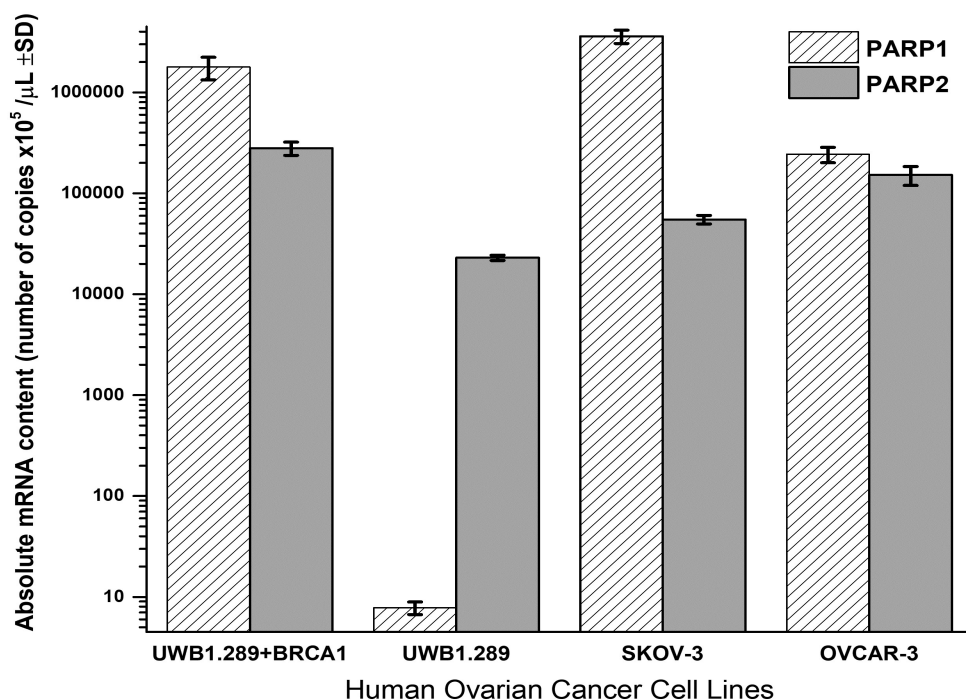
9.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των *PARP-1* και *PARP-2* στις κυτταρικές σειρές

Τα αποτελέσματα της Q-PCR και η ανάλυση απόλυτης ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης mRNA για τα γονίδια των *PARP-1/2* στις κυτταρικές σειρές UWB1.289+BRCA1, UWB1.289, SKOV-3 και OVCAR-3 χωρίς καμία επίδραση παρουσιάζεται στο παρακάτω Διαγράμμα 7 και στον Πίνακα 12. Τα δεδομένα που φαίνονται στο Διάγραμμα 7 είναι τα απόλυτα επίπεδα έκφρασης, υπολογίζοντας το λόγο του αριθμού μεταγράφων των

γονιδίων στόχων προς αυτό του γονιδίου της β ακτίνης που αποτελεί το γονίδιο αναφοράς, *PARP-1,2 / ACTB* (γονίδιο αναφοράς- εσωτερικού ελέγχου). Η απόλυτη ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA των *PARP-1* και 2 σε κύτταρα 72h χωρίς καμία επίδραση έγινε με την βοήθεια «Internal Standards». Κατασκευάστηκε δηλαδή, πρότυπη καμπύλη με βάση την κυτταρική σειρά K562 που χρησιμοποιήθηκε και ως θετικό δείγμα (positive control) εσωτερικού ελέγχου. Η *PARP-1* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική έκφραση στα SKOV-3 κύτταρα ($36,5 \pm 10,9$). Ακολουθώς, παρατηρείται τεράστια διαφορά της μεταγραφικής έκφρασης της *PARP-1* ανάμεσα σε UWB1.289+*BRCA1* και UWB1.289 ($18,6 \pm 4,5$ και $7,8E-05 \pm 1E-05$) (t-test, $p < 0.001$). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά ως προς τη δράση του γονιδίου *BRCA1* και αποτελεί θετικό μάρτυρα ως προς όλες τις περαιτέρω μετρήσεις σχετικής ποσοτικοποίησης που έχουν γίνει. Η έκφραση των κυττάρων OVCAR-3 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά επίπεδα μεταγραφής της *PARP-1*, της τάξης του $2,13 \pm 0,17$. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης mRNA της *PARP-2* παρουσιάζονται με απόλυτες τιμές αντιστρόφως ανάλογες των επιπέδων *PARP-1*. Δηλαδή, η UWB1.289 κυτταρική σειρά υπομεταγράφει την *PARP-1* και υπερ-μεταγράφει την *PARP-2* ($7,8E-05 \pm 1E-05$ vs $2,8 \pm 0,7$) (t-test, $p < 0.001$). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία αφού η ενεργοποίηση του ενζύμου *PARP-2* είναι δευτερεύουσα οδός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

	<i>PARP-1</i> αρ.αντιγράφων/μl	<i>PARP-2</i> αρ.αντιγράφων/μl
UWB1.289	$7,8E-05 \pm 1E-05$	$2,8 \pm 0,7$
UWB1.289+BRCA1	$18,6 \pm 4,5$	$0,2 \pm 0,03$
SKOV-3	$36,5 \pm 10,9$	$0,5 \pm 0,1$
OVCAR-3	$2,13 \pm 0,17$	$1,5 \pm 0,39$

Πίνακας 12. Συγκριτικές τιμές μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των *PARP-1* και *PARP-2* σε όλες τις κυτταρικές σειρές χωρίς επίδραση.



Διάγραμμα 7. Απόλυτη Ποσοτικοποίηση (Q-PCR analysis) των επιπέδων έκφρασης mRNA των *PARP-1* και *PARP-2* στις *UWB1.289+BRCA1*, *UWB1.289*, *OVCAR-3* και *SKOV-3* κυτταρικές σειρές σε εκθετική φάση κυτταρικής ανάπτυξης, χωρίς καμία επίδραση και με δύο ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές για κάθε δείγμα εις τριπλούν εκφράστηκαν σε μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα ($mean \pm SE$) και δείχνουν την απόλυτη έκφραση των επιπέδων mRNA της *PARP-1/ACTB* (*ACTB*:γονίδιο αναφοράς) ως αριθμός αντιγράφων ανα μL .

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι διαφορετικές κυτταρικές σειρές εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα μεταγραφής των ενζύμων *PARP-1* και *PARP-2*. Ενδιαφέρουσα είναι η αντιστρόφως ανάλογη μεταξύ τους μεταγραφική έκφραση, στο πειραματικό και θεωρητικό επίπεδο, κατοχυρώνοντας την επιλογή των κυτταρικών σειρών για τη συγκριτική μελέτη έκφρασης τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Η απόλυτη έκφραση των επιπέδων mRNA των *PARP-1/2* αποτέλεσε απαραίτητη προϋπόθεση της κατανόησης των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης με τη δράση των χημικών ουσιών.

9.3.2 Συγκριτικοί πίνακες αποτελεσμάτων σχετικής ποσοτικοποίησης των *PARP-1* και *PARP-2* με επίδραση των χημικών ενώσεων ανά κυτταρική σειρά

Οι πίνακες (Πίνακες 13-16) και οι ακόλουθες απεικονίσεις διαγραμμάτων (Εικόνες 9.10-9.13) παρουσιάζουν τη σχετική ποσοτικοποίηση του mRNA των *PARP-1* και *PARP-2*, κανονικοποιημένη βάση του mRNA της β ακτίνης, που αποτελεί το γονίδιο αναφοράς, με την επίδραση των ενώσεων A, B, C, D και τα μόρια αναφοράς ASE και PA, ανά κυτταρική σειρά. Η ένωση E δε χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την πειραματική διαδικασία λόγω έλλειψης ικανής ποσότητας της χημικής ένωσης, αλλά και των αποτελεσμάτων στα προηγούμενα *in silico* και *in vitro* πειράματα, που την τοποθετούν ως «μέσης απόδοσης» κατά μέσο όρο ως προς τις μελετούμενες ενώσεις. Η ένωση C τελικά χρησιμοποιήθηκε για την πιθανή επαλήθευση των αρνητικών της αποτελεσμάτων σε όλη την προηγούμενη πειραματική διαδικασία. Ως ομάδα ελέγχου τέθηκε η έκφραση του mRNA των *PARP-1/2* σε κύτταρα 72 ωρών χωρίς καμία χημική επίδραση. Η τιμή της ομάδας ελέγχου είναι η μονάδα ($1 \pm 0,2$) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως στατιστικά σημαντικά ($\text{mean} \pm \text{SE}$) με βάση το two paired t student test, $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα δίνονται συνοπτικά ανα κυτταρική ομάδα.

UWB1.289

Η επίδραση της ένωσης A παρουσιάζει πτώση της μεταγραφής της *PARP-1* συγκριτικά με την έκφραση 1 της ομάδας ελέγχου της τάξης του 99,4% όταν η συγκέντρωσή της είναι 20 μM . Η επίδραση της ένωσης B παρουσιάζει πτώση της μεταγραφής της *PARP-1* της τάξης του 63,8% όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM . Η ένωση ASE παρουσιάζει πτώση της μεταγραφής της *PARP-1* της τάξης του 90,3 % όταν η συγκέντρωσή της φτάσει στα 40 μM . Αντίθετα, η ένωση C δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφραση του mRNA της *PARP-1* σε αυτές τις 2 συγκεντρώσεις. Το PA παρουσιάζει μείωση της έκφρασης του mRNA της *PARP-1* της τάξης του 97,01 % στις αντίστοιχες μεταβολές συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως στατιστικά σημαντικά $p < 0,05$, με εξαίρεση την ένωση C. Η μεταγραφική ανάλυση της *PARP-2* παρουσιάζει την χαμηλότερη έκφραση με επίδραση 20 μM της ένωσης A, αντίθετα με την τεράστια αύξηση από την ένωση B, μεγαλύτερη και από του αλκυλιωτικού μορίου αναφοράς PA. Φαίνεται εν τούτοις, ότι οι B, C, και PA ενώσεις έχουν ανασταλτική δράση σε συγκέντρωση 40 μM στα UWB1.289 μεταλλαγμένα κύτταρα, όμως ως προς την *PARP-2*, το

αντίθετο ισχύει για τις ενώσεις A, D και ASE. Τέλος, σημειώνεται ότι η ένωση D παράγει αρκετά σημαντικά αποτελέσματα με 86,9% αύξηση της *PARP-2* μεταγραφής στη δοσολογία των 40 μ M, ενώ η ένωση B έχει τη συντηρήσιμη και στις δύο δόσεις (με πτώση όμως 69,5% για την *PARP-1* και 75,59% για την *PARP-2* από τα 20 στα 40 μ M), μεγαλύτερη επίδραση στη μεταγραφή αμφότερων των γονιδίων.

Σχετική ποσοτικοποίηση PARP1 and PARP2 στα κύτταρα UWB1.289					
	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	Έκφραση PARP1 mRNA		Έκφραση PARP2 mRNA	
Κύτταρα άνευ φαρμακευτικής επίδρασης (Control)	-	1		1	
Κύτταρα υπό την επίδραση της ένωσης		mean $\pm$	sem	mean $\pm$	sem
A	20 μ M	0,0767	0,004	0,0049	0,03
	40 μ M	7,8847	0,1810	75,5835	1,87
B	20 μ M	31,7528	0,0036	380,038	56
	40 μ M	11,4972	1,8931	92,7323	29
C	20 μ M	2,4279	1,8700	0,75	0,23
	40 μ M	0,6307	0,1627	0,46	0,11
D	20 μ M	2,4893	0,4000	1,75	0,72
	40 μ M	1,88	0,5	13,4	6,9
ASE	20 μ M	9,3286	4,1100	0,2600	0,1
	40 μ M	0,9017	0,1300	126	36
PA	20 μ M	18,1576	1,4956	73,7	17,6
	40 μ M	0,5414	0,1840	0,1	0,06

Πίνακας 13. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) της *PARP-1* στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μ M των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β -ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί σε σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα (mean $\pm$ SE).

Από τα παραπάνω προέκυψε αυξημένη δράση των ενώσεων A, B, D, ASE και PA ενώ η C φαίνεται να μην έχει δράση σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

UWB1.289+BRCA1

Η επίδραση της ένωσης Α παρουσιάζει πτώση της μεταγραφής της *PARP-1* της τάξης του 84,3% όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM . Η επίδραση της ένωσης Β παρουσιάζει πτώση της μεταγραφής της *PARP-1* της τάξης του 82,6% όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM . Εν τούτοις και οι δύο επέφεραν αύξηση του μεταγραφικού περιεχομένου στα 20 μM . Αντιθέτως η ένωση ASE, με σχετική ήπια άύξηση στα 20 μM προκαλεί μεγάλη άνοδο της μεταγραφής της *PARP-1* της τάξης του 92,4% όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM , ενώ οι ενώσεις C και D δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφρασης του mRNA της *PARP-1* σε αυτές τις 2 συγκεντρώσεις. Η *PARP-2* εκφράζεται ελάχιστα στη κυτταρική σειρά UWB1.289 με επίδραση της ASE στα 20 μM ($m.v.20\mu\text{M}=0.05\pm0.01$, $p<0.05$) ενώ η επίδραση της ένωσης Α στην ίδια συγκέντρωση την υπερεκφράζει ($m.v.20\mu\text{M}=6,4\pm1,12$, $p<0.05$) σχετικά. Σε συγκέντρωση 40 μM η ένωση Β προκαλεί ήπια αύξηση της μεταγραφής της *PARP-2* της τάξης του 30% ενώ στην ίδια συγκέντρωση όλες οι άλλες ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (A: $m.v.40\mu\text{M}=3.5\pm0.137$, $p<0.05$) και ASE (ASE: $m.v.40\mu\text{M}=0,05\pm0.01$, $p<0.05$)

Σχετική ποσοτικοποίηση PARP1 and PARP2 στα κύτταρα UWB1.289+BRCA1					
	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	Έκφραση PARP1 mRNA		Έκφραση PARP2 mRNA	
Κύτταρα άνευ φαρμακευτικής επίδρασης (Control)	-	1		1	
Κύτταρα υπό την επίδραση της ένωσης		mean $\pm$	sem	mean $\pm$	sem
A	20 μM	11,8899	0,0063	6,4	1,12
	40 μM	1,8425	0,14	3,5	0,137
B	20 μM	45,8336	0,1374	0,4	0,01
	40 μM	7,9788	1,8566	0,52	0,1
C	20 μM	2,9012	1,8214	0,5	0,07
	40 μM	3,6343	1,678	0,57	0,04
D	20 μM	1,1388	0,987	1,93	0,6
	40 μM	1,1362	0,2000	0,132	0,06
ASE	20 μM	9,138	4,1117	0,07	0,001

	40μM	102,5843	27	0,05	0,01
PA	20μM	1,2357	0,0477	1,95	0,7
	40μM	0,0112	0,0038	0,127	0,06

Πίνακας 14. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) της PARP-1 στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μM των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί σε σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα (mean $\pm$ SE).

Από τα παραπάνω προέκυψε αυξημένη ανασταλτική δράση των ενώσεων A, B και ASE, ενώ οι C, D και το προπιονικό οξύ (PA) φαίνονται να μην έχουν δράση σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Ενδιαφέρον είναι ότι η ένωση ASE, η οποία είναι και η ουσία αναφοράς του πειράματος, εμφάνισε στην αυξημένη δοσολογία, σημαντική μεταγραφική αύξηση της PARP-1 στα κύτταρα με λειτουργία BRCA1 γονιδίου (UWB1.289+BRCA1), ενώ παρουσίασε και σημαντική μεταγραφική μείωση της PARP-1 με ταυτόχρονη αύξηση της PARP-2, στα αντίστοιχα κύτταρα με την έλλειψη (UWB1.289).

SKOV-3

Μόνο η επίδραση της ένωσης A δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή της μεταγραφής της PARP-1 όταν η συγκέντρωσή της αυξάνεται από τα 20 μM στα 40 μM. Η επίδραση της ένωσης B παρουσιάζει αύξηση της μεταγραφής της PARP-1 >100 φορές όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM ενώ κάτι ανάλογο συμβαίνει και με την ένωση C. Αντιθέτως η ένωση ASE παρουσιάζει μείωση της μεταγραφής της PARP-1 της τάξης του 52,2% όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει από τα 20 μM στα 40 μM, με ταυτόχρονη αύξηση της PARP-2, ενώ η ένωση PA παρουσιάζει μόνο στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφραση του mRNA της PARP-1 της τάξης του 99% σε αυτές τις 2 συγκεντρώσεις. Η ένωση D δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες μεταβολές.

Η μεταγραφική ανάλυση της PARP-2 παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης με επίδραση της ένωσης B στα 20μM. Ακολουθεί η χημική ένωση ASE όπου και επιτυγχάνει και τη μεγαλύτερη μεταγραφική αύξηση (σχεδόν 1000 φορές) σε αυτή την κυτταρική σειρά, χωρίς

κάτι σημαντικό από τις υπόλοιπες εξεταζόμενες ενώσεις.

Σχετική ποσοτικοποίηση PARP1 and PARP2 στα κύτταρα SKOV-3					
	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	Έκφραση PARP1 mRNA		Έκφραση PARP2 mRNA	
Κύτταρα άνευ φαρμακευτικής επίδρασης (Control)	-	1		1	
Κύτταρα υπό την επίδραση της ένωσης		mean±	sem	mean±	sem
A	20μM	0,8981	0,136	0,2216	0,0477
	40μM	4,2232	0,277	0,4074	0,1375
B	20μM	5,2054	1,3362	0,0028	0,0317
	40μM	116,7005	61,6673	0,0019	0,0002
C	20μM	0,55063	0,0291	0,29	0,08
	40μM	171,9486	28,648	0,23	0,02
D	20μM	0,043	0,0114	0,17	0,34
	40μM	0,1193	0,0223	0,39	0,34
ASE	20μM	5,938	1,2488	0,005	0,001
	40μM	3,0844	0,2647	4,5	0,3
PA	20μM	4,8277	1,6115	0,1456	0,1029
	40μM	0,04858	0,0235	0,0113	0,0013

Πίνακας 15. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) των PARP-1/ 2 στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μM των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β-ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί σε σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (mean ± SE).

Από τα παραπάνω προέκυψε αυξημένη δραστηριότητα των ενώσεων B και C κυρίως, αλλά και ήπια δράση των ASE και PA, ενώ η A και D φαίνεται να μην έχουν μεταγραφική επίδραση σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

OVCAR-3

Η επίδραση των ενώσεων A και B παρουσιάζει σημαντική πτώση της μεταγραφής της PARP-1 όταν η συγκέντρωσή της αυξάνει απο 20μM σε 40μM. Η ένωση C δεν παρουσιάζει

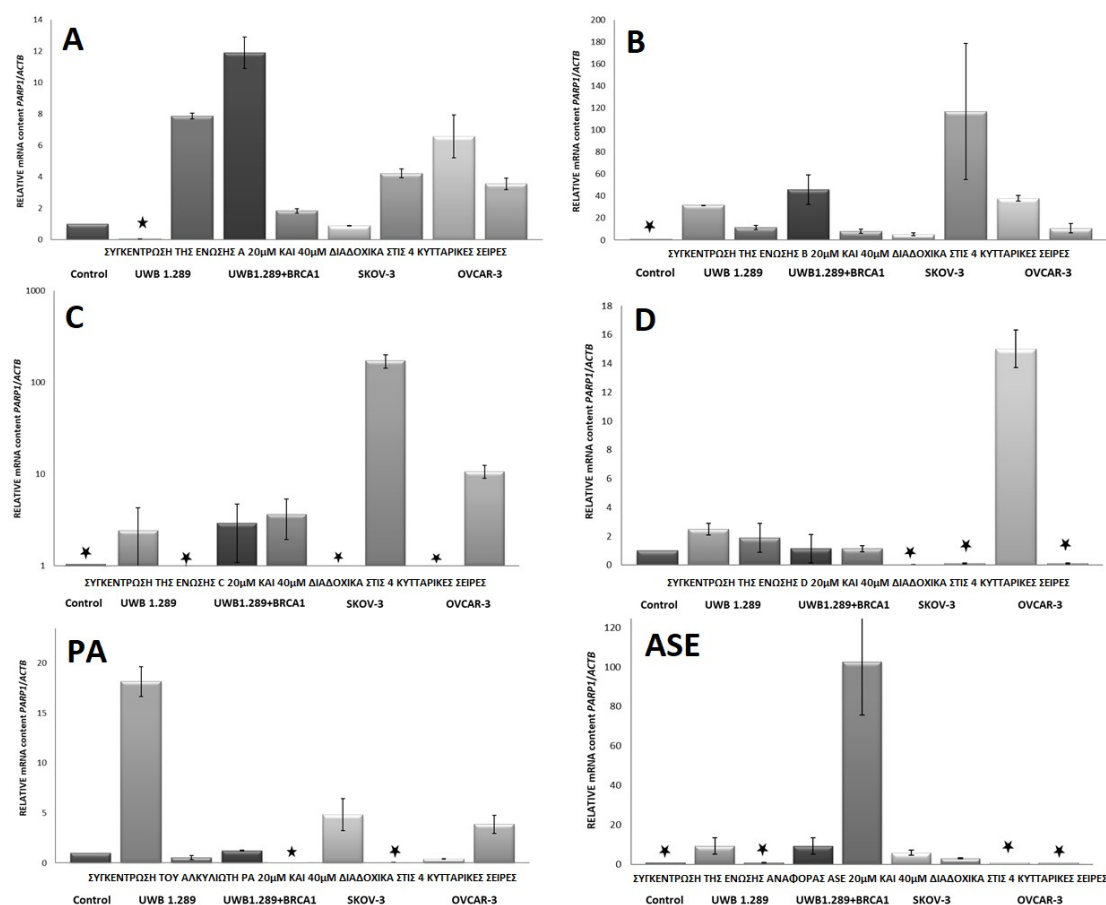
στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφραση του mRNA της *PARP-1* στα 20μM ενώ αυξάνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση της *PARP-1* στα 40μM της τάξης του 44,7%. Αντίστοιχα η PA παρουσιάζει μη στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφρασης του mRNA της *PARP-1* στα 20μM ενώ αυξάνει στατιστικά σημαντικά την έκφραση της *PARP-1* στα 40μM της τάξης του 92,1%. Η ένωση D αντιστρόφως προκαλεί σημαντική άνοδο της μεταγραφικής λειτουργίας της *PARP-1* στα 20 μM, και επιφέρει εξαιρετική μείωση στα 40μM. Τα αποτελέσματα για την ένωση ASE παρουσιάζουν μικρή πτώση της έκφρασης της *PARP-1* στα 40μM.

Η *PARP-2* εκφράζεται ελάχιστα υπό την επίδραση των D, ASE και PA στα 20 και 40 μM. Αντίθετα, η επίδραση της ένωσης A σε όλες τις συγκεντρώσεις φαίνεται να δημιουργεί μια σχετική υπερέκφραση, δρώντας παράλληλα στην *PARP-1*, αλλά με κύρια επίδραση στην *PARP-2*. Το αντίθετο συμβαίνει με την ένωση B, που σε συγκέντρωση 40 μM προκαλεί ήπια μείωση της μεταγραφής της *PARP-2* ενώ διατηρεί μειούμενη αλλά σχετικά αυξημένη την μεταγραφή της *PARP-1*. Στην ίδια συγκέντρωση όλες οι άλλες ενώσεις παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης.

Σχετική ποσοτικοποίηση PARP1 and PARP2 στα κύτταρα OVCAR-3					
	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	Έκφραση PARP1 mRNA		Έκφραση PARP2 mRNA	
Κύτταρα άνευ φαρμακευτικής επίδρασης (Control)	-	1		1	
Κύτταρα υπό την επίδραση της ένωσης		mean±	sem	mean±	sem
A	20μM	6,5744	1,3646	18,6271	6,7396
	40μM	3,5558	0,3652	35,8193	3,4822
B	20μM	37,8405	2,598	9,7147	1,4149
	40μM	10,6727	4,2092	2,5910	0,6074
C	20μM	0,4815	0,0915	4,3	3,7
	40μM	8,756	0,0034	0,44	0,07
D	20μM	15,017	1,3	0,0923	0,0223
	40μM	0,205	0,0038	0,034	0,0011
ASE	20μM	0,5421	1,2488	0,09	0,02
	40μM	0,4682	0,2647	0,03	0,001
PA	20μM	0,3888	0,0267	1,1	0,4
	40μM	3,8684	0,9000	0,4	0,09

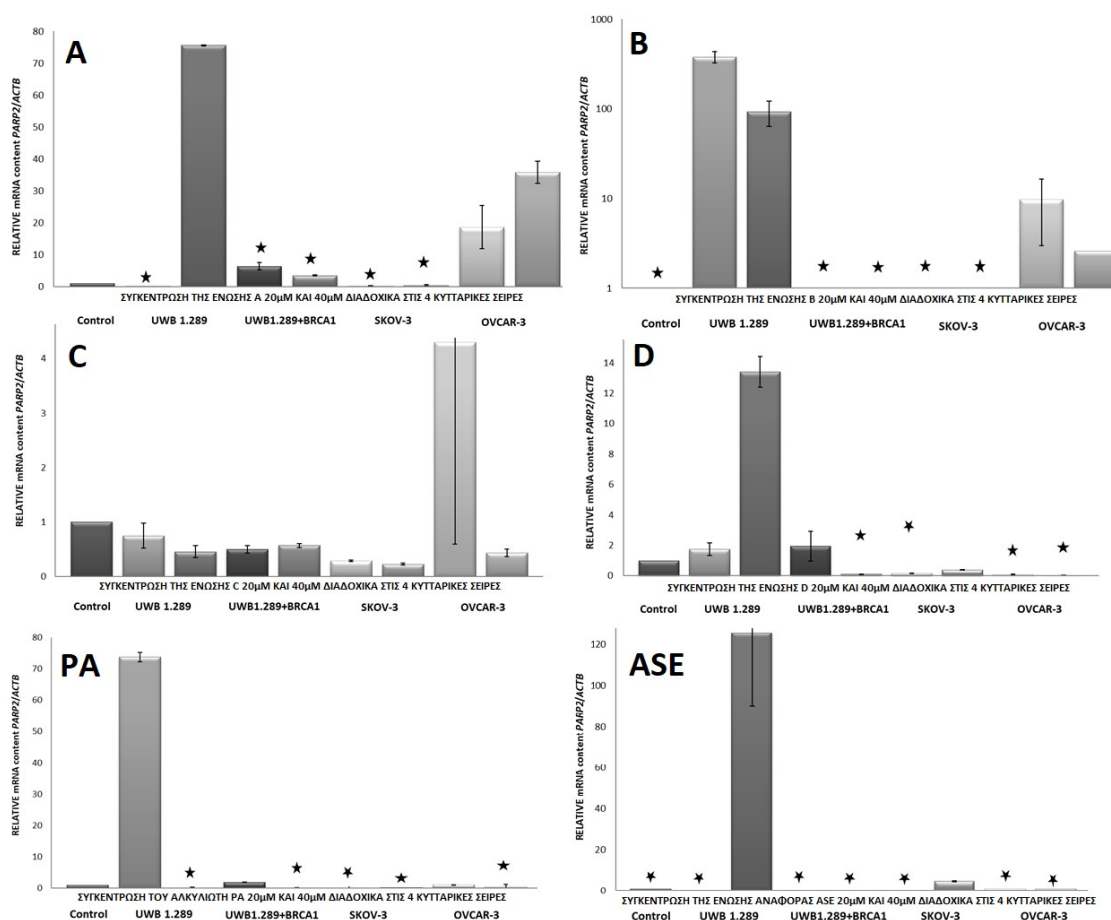
Πίνακας 16. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) των PARP-1/ 2 στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μ M των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β -ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί σε σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα (mean $\pm$ SE).

Από τα παραπάνω προκύπτει αυξημένη δραστηριότητα των ενώσεων κυρίως A και B αλλά και ήπια δράση των D και PA.



Εικόνα 9.10. Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) της PARP-1 στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μ M των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE

συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β -ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί σε σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως $mean \pm SE$ για κάθε δείγμα εις διπλούν. Η κάθε ένωση απεικονίζεται σε ξεχωριστή κλίμακα μέτρησης λόγω του εύρους των τιμών στις μετρήσεις όπως φαίνονται στους πίνακες 14-16. Ο αστερίσκος δηλώνει τιμές πολύ χαμηλές για να απεικονιστούν σωστά στην εκάστοτε χρησιμοποιούμενη κλίμακα.



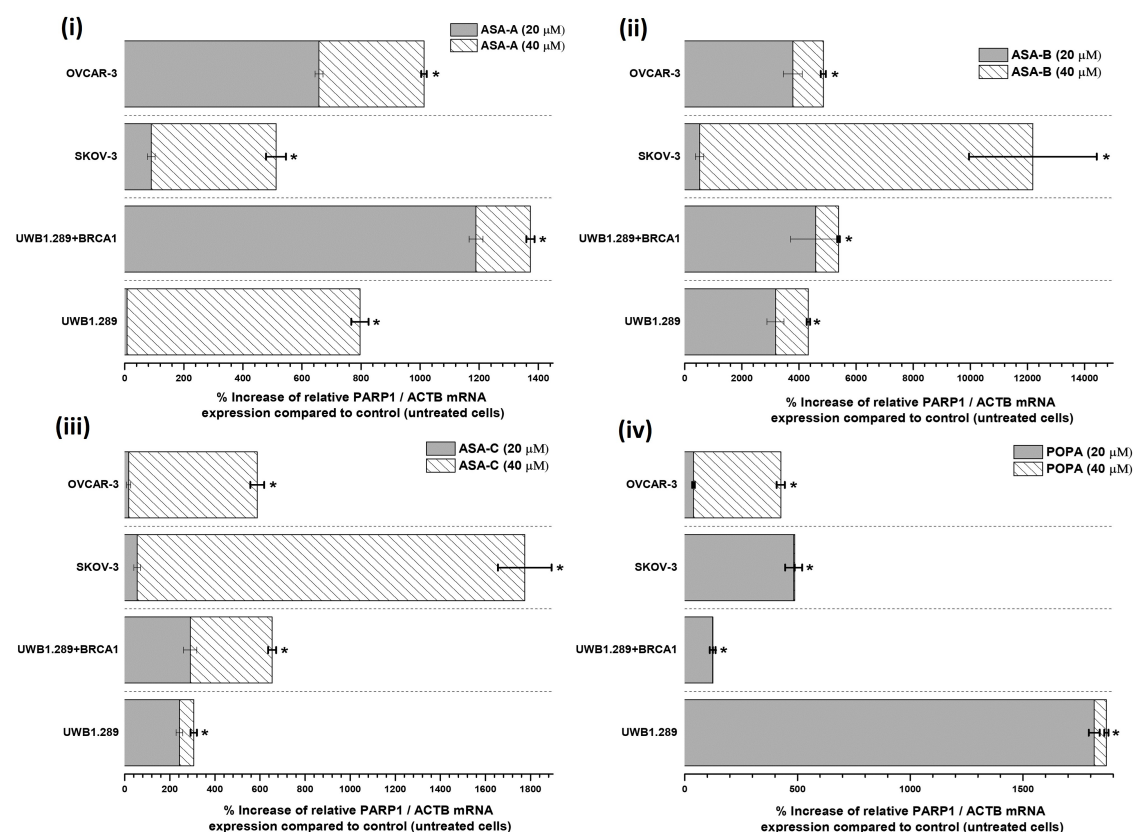
Εικόνα 9.11. Διαγραμματική απεικόνιση της σχετικής ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης mRNA (Q-PCR analysis) της PARP-2 στις κυτταρικές σειρές UWB1.289, UWB1.289+BRCA1, SKOV-3 και OVCAR-3 με επίδραση συγκέντρωσης 20 και 40 μ M των χημικών ενώσεων A, B, C, D, PA και ASE συγκριτικά με κύτταρα χωρίς επίδραση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Η κανονικοποίηση της σχετικής ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων στόχων έγινε με το γονίδιο της β -ακτίνης. Τα κύτταρα χωρίς επίδραση έχουν τεθεί ως η σχετική έκφραση 1. Ως πρότυπη καμπύλη και εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η K562 κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται ως $mean \pm SE$ για κάθε δείγμα

εις διπλούν. Η κάθε ένωση απεικονίζεται σε ξεχωριστή κλίμακα μέτρησης λόγω του εύρους των τιμών στις μετρήσεις όπως φαίνονται στους πίνακες 14-16. Ο αστερίσκος δηλώνει τιμές πολύ χαμηλές για να απεικονιστούν σωστά στην εκάστοτε χρησιμοποιούμενη κλίμακα.

9.3.2.α Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), με εξαίρεση τις συγκεντρώσεις 20 μ M των ενώσεων C και PA. Από τα παραπάνω προέκυψε αυξημένη ανασταλτική δράση των ενώσεων B και A σε αυτή τη σειρά, πιο ήπια δράση για την ASE αλλά και τον αλκυλιωτή PA, ενώ οι ενώσεις C και D, φαίνεται να έχουν περιορισμένη και μεμονωμένη μεταγραφική δραστηριότητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

Παρακάτω περιγράφεται η ανάλυση της σχετικής ποσοτικοποίησης της έκφρασης mRNA *PARP-1/ACTB* για τις ενώσεις A, B, C (που λειτουργεί σαν αναφορά της υψηλής δράσης των δύο πρώτων) και του αλκυλιωτή PA σε ένα ενιαίο επιπλέον ιστόγραμμα (Εικόνα 9.12). Επίσης παρουσιάζεται και η επίδραση του αναστολέα των PARP 3AB σε συνδυασμό με τις A, B ή και C ενώσεις, σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές της μελέτης (Εικόνα 9.13).



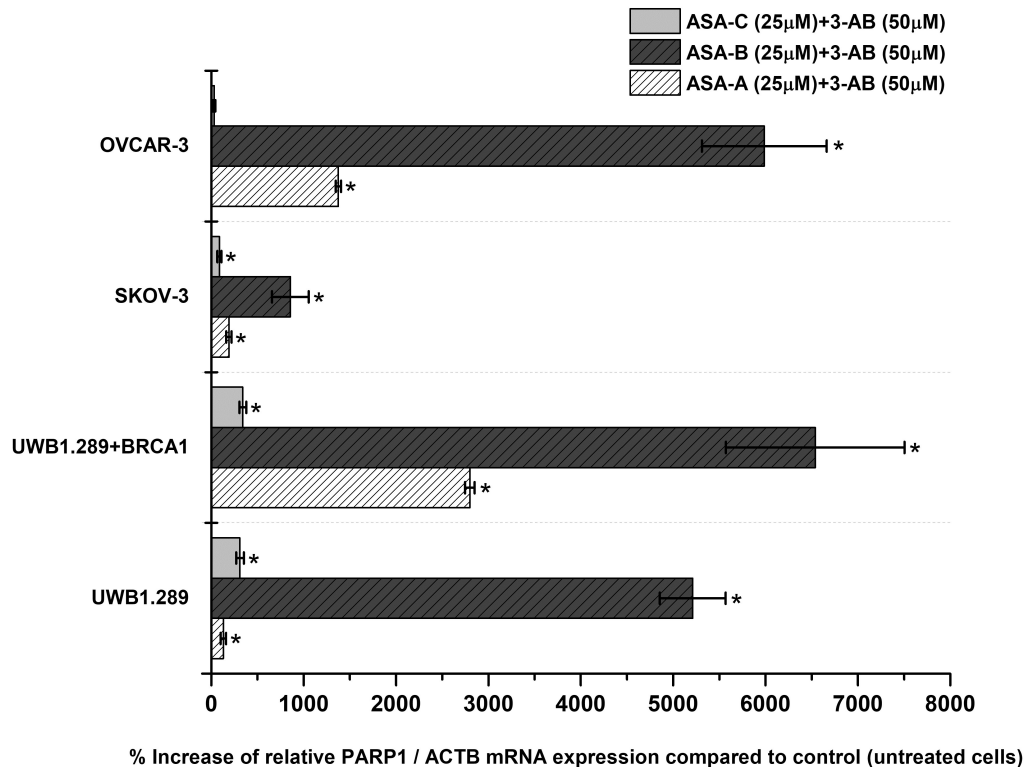
Εικόνα 9.12. Ποσοστιαία αύξηση (%) της σχετικής περιεκτικότητας mRNA *PARP-1/ACTB* ($\pm$ Standard Error, $\pm$ SE) σε όλες τις κυτταρικές σειρές της μελέτης με επίδραση των ενώσεων A (i), B (ii), C (iii) και PA (iv) στα 20 και 40 μ M για 72 ώρες, συγκριτικά με κύτταρα χωρίς καμία επίδραση

(*) Στατιστική σημαντικότητα $p < 0.001$ (two-tail paired t-test).

Γενικά φαίνεται από τα παραπάνω ότι η σχετική κυτταρική περιεκτικότητα mRNA *PARP-1/ACTB* (αλλά και της *PARP-2/ACTB*) είναι αυξημένη (t-test, $p < 0,001$) στις περισσότερες περιπτώσεις για όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές της μελέτης. Ειδικά υπό την επίδραση των λακταμικών αλκυλιωτικών στεροειδών εστέρων ASA-A (ένωση A) και ASA-B (ένωση B). Ωστόσο, υπάρχει προφανής διαφοροποίηση ανάλογα με το είδος των κυττάρων και την ποσότητα των ενώσεων ως προς την αύξηση αυτή. Κατά συνέπεια, λόγω της διαφορετικής κυτταρικής ευαισθησίας, όσο πιο ευπαθής είναι μια καρκινική κυτταρική σειρά από τις κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις μιας εκ των μελετούμενων ενώσεων, τόσο μεγαλύτερη είναι η και αύξηση της σχετικής κυτταρικής περιεκτικότητας mRNA της *PARP-1/ACTB* και της *PARP-2/ACTB*.

Η ένωση B, ένας αρκετά ισχυρός αναστολέας της PARP, προκαλεί υψηλότερες ποσοστιαίες αυξήσεις mRNA *PARP-1/ACTB* και φθάνει έως και πάνω από 50-100πλάσια αύξηση στα εξεταζόμενα κύτταρα. Η ένωση A είναι η δεύτερη πιο ισχυρή ένωση, ενώ το POPA (PA) και το ASE-C ήταν οι λιγότερο ισχυρές. Η υψηλότερη άνοδος του λόγου mRNA *PARP-1/ACTB* επιτυγχάνεται στην κυτταρική σειρά UWB1.289+BRCA1, ενώ αντιστρόφως, η στατιστικώς σημαντικότερη αύξηση του λόγου mRNA της *PARP-2/ACTB* εμφανίζεται στα UWB1.289 παρά στα καρκινικά κύτταρα UWB1.289+BRCA1, με την ένωση B να προκαλεί 140 έως 150 φορές αύξηση της αναλογίας mRNA της *PARP-2/ACTB* σε αυτά τα κύτταρα. Βέβαια αυτό δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 9.3.1 η UWB1.289 σειρά κυττάρων υπομεταγράφει την *PARP-1* και υπερ-μεταγράφει την *PARP-2*.

Σημειώνεται ότι το PA ήταν η ένωση που προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση της σχετικής περιεκτικότητας mRNA *PARP-1/ACTB* στη κυτταρική σειρά UWB1.289.



Εικόνα 9.13. Ποσοστιαία αύξηση (%) της σχετικής περιεκτικότητας mRNA *PARP-1/ACTB* ($\pm$ Standard Error, $\pm$ SE) σε όλες τις κυτταρικές σειρές της μελέτης με συνεπίδραση του παράγοντα 3AB στα 50 μ M και των ενώσεων ASA-A (A), ASA-B (B), ASA-C(C) και POPA (D) στα 25 και 50 μ M για 72 ώρες συγκριτικά με κύτταρα χωρίς καμία επίδραση (*) Στατιστική σημαντικότητα $p < 0.001$ (two-tail paired t-test).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 9.13, η ταυτόχρονη επίδραση της ένωσης 3AB σε συνδυασμό με τις ενώσεις A, B, και C παρήγαγε συνεργική αύξηση της κυτταρικής περιεκτικότητας σε mRNA *PARP-1/ACTB*, κυρίως με την ένωση B, και λιγότερο με τις υπόλοιπες, αναλογικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι η ρύθμιση της μεταγραφής των *PARP-1/2* ήταν διαφορετική και εξαρτώμενη από τον κυτταρικό τύπο, τη συγκέντρωση της ένωσης-αναστολέα και της ίδιας της ανασταλτικής προς την PARP ικανότητας κάθε ένωσης που μελετήθηκε.

10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος είναι μια πολύπλοκη ασθένεια που περιγράφεται από έναν συνδυασμό διαφορετικών χαρακτηριστικών με τη μορφή ποικιλίας γενετικών, επιγενετικών και άλλων τροποποιήσεων, οδηγώντας σε ένα πρότυπο καρκινογένεσης πολλαπλών σταδίων. Ο κάθε τύπος καρκίνου φέρει διαφορετικές αλλοιώσεις και ιδιότητες. Ο καρκίνος των ωοθηκών προκαλεί 140.000 θανάτους ετησίως στην Ευρώπη, αντιπροσωπεύοντας μια από τα πιο θανατηφόρες γυναικολογικές κακοήθειες στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς [300]. Μολονότι δεν είναι σαφής ο αιτιολογικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη του καρκίνου των ωοθηκών, ο κίνδυνος της νόσου έχει συσχετιστεί με διάφορους ορμονικούς, αναπαραγωγικούς, περιβαλλοντικούς και πληθυσμιακούς παράγοντες. Ωστόσο, το γενετικό υπόβαθρο θεωρείται το πιο σημαντικό μεταξύ των παραγόντων κινδύνου [301]. Οι γυναίκες που έχουν κληρονομήσει μια μετάλλαξη στο *BRCA1* ή *BRCA2* γονίδιο και τα άτομα με σύνδρομο Lynch (κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου) έχουν τον υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου των ωοθηκών [12].

Η πολυ-ADP-ριβοζυλίωση είναι μια κυτταρική διαδικασία απόκρισης προς την αποκατάσταση βλάβης του DNA και τους μηχανισμούς διατήρησης της γονιδιωματικής σταθερότητας, ενώ εμπλέκεται σε πολλαπλά στάδια και διαφορετικά μονοπάτια της καρκινογένεσης. Η συμμετοχή της πολυ- και μονο- ADP-ριβοζυλίωσης στην καρκινογένεση έχει μελετηθεί εκτενώς σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, αλλά και σε ζωικά μοντέλα και γενετικές προσεγγίσεις στον άνθρωπο. Αρκετές οδοί επιδιόρθωσης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης εκτομής βάσης και των μονοπατιών αποκατάστασης θραύσης διπλού κλώνου, περιλαμβάνουν λειτουργίες των PARP ενζύμων [302].

Τα δεδομένα μέχρι τώρα, δείχνουν ότι ορισμένα μόρια της οικογένειας PARP εμπλέκονται σε διάφορους καταρράκτες σηματοδότησης εκτός από την επιδιόρθωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων επιγενετικών και μεταγραφικών ρυθμίσεων, της φλεγμονής, της ανοσολογικής απόκρισης και της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης, υποδηλώνοντας ότι η πολυ-ADP-ριβοζυλίωση προάγει ή καταστέλλει την καρκινογόνο δράση κατά περίπτωση. Κατά τη διάρκεια των προκαρκινικών σταδίων, τα κύτταρα εκτίθενται σε

ποικιλία στρεσογόνων ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων αλλοιώσεων στο DNA και μη φυσιολογική ενεργοποίηση οδών σηματοδότησης [137], που μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των PARPs. Τα ενεργοποιημένα PARP ένζυμα PARυλιώνουν και τροποποιούν τις δραστηριότητες διαφόρων στόχων και οδών σηματοδότησης που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες, οδηγώντας σε γονιδιακή μεταγραφική τροποποίηση. Για παράδειγμα, η *PARP-1* δρα ως συν-ενεργοποιητής και συν-κατασταλτικός παράγοντας γονιδίων που είναι σημαντικά για την καρκινογένεση, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα β ρετινοϊκού οξέος [303] και του συμπλέγματος β-κατενίνης-TCF4 [304].

Η *PARP-1* είναι όμως, είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα. Έχει σημαντικό και συγκεκριμένο ρόλο στην επιδιόρθωση βλάβης του DNA, στη νέκρωση, στην απόπτωση και στην εξαρτώμενη από τις βλάβες του DNA εξέλιξη του καρκίνου. Η *PARP-1* αυξάνεται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος των ωοθηκών, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του πνεύμονα, κ.α

Σε κλινικές δοκιμές για ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών, μαστού και προστάτη, οι αναστολείς PARP έδειξαν αποτελεσματικότητα στους φορείς μετάλλαξης *BRCA1* ή *BRCA2*, με λίγες παρενέργειες [305–307]. Οι αναστολείς PARP στόχευαν τα καρκινικά κύτταρα με μεταλλάξεις *BRCA1/2* και προκάλεσαν συγκεκριμένα τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων [202, 204]. Αυτή η ιδέα έχει εφαρμοστεί σε πολλές κλινικές στρατηγικές καθώς η «συνθετική θνησιμότητα» υποδηλώνει τη σημασία των δραστηριοτήτων των PARP ενζύμων για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, που περιέχουν ελαττώματα στην ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA. Η αναστολή λοιπόν των PARP, σε κύτταρα με ανεπάρκεια BRCA οδήγησε στην παραμονή των αλλοιώσεων του DNA, που κανονικά επιδιορθώνονται μέσω του HR, με αποτέλεσμα την καταστροφή του κυττάρου [185].

Με βάση τα παραπάνω, όπου δύο μη «θανατηφόρα» ελαττώματα συνδυάζονται και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, όπως η αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταλλάξεων *BRCA1* ή *BRCA2* και της αναστολής της PARP, η προσέγγιση της συνθετικής θνησιμότητας μπορεί να εφαρμοστεί ευρύτερα στη θεραπεία σποραδικών μορφών καρκίνων με διαταραχές στις οδούς ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) ή με ιδιότητες BRCAness, παρέχοντας μία εξήγηση για την ευαισθησία τους στους αναστολείς της PARP [56, 210]

Τα συνδυαστικά φάρμακα έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν καλύτερη αποτελεσματικότητα στον έλεγχο σύνθετων νοσών όπως ο καρκίνος των ωοθηκών και ότι είναι λιγότερο επιρρεπή στην ανθεκτικότητα στα φάρμακα [308]. Στοχευμένοι αντικαρκινικοί παράγοντες, όπως στεροειδείς αλκυλιωτές εστέρες, συνδυάζουν δύο δραστικές ενώσεις σε ένα μόνο μόριο και ενσωματώνουν στεροειδείς ορμόνες που λειτουργούν ως φορείς κυτταροτοξικών αντικαρκινικών παραγόντων [240, 294, 309]. Αυτά τα μόρια επιδεικνύουν ειδική κυτταροτοξική δράση ενάντια σε καρκινικά κύτταρα, ένα χαρακτηριστικό που αποδίδεται στον χημικό συνδυασμό της κυτταροτοξικής τους μονάδας με τον φορέα στεροειδών που είναι υπεύθυνος για τη στοχευόμενη μεταφορά των μορίων. Επιπροσθέτως, αυτοί οι εστέρες έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα αντικαρκινικής δραστικότητας, ενώ παράγουν μειωμένη συστηματική τοξικότητα. Η δραστηριότητα των στεροειδών εστέρων κατά διάφορων τύπων καρκίνου ενισχύεται, διατηρώντας ταυτόχρονα μειωμένα επίπεδα τοξικότητας, μετά από τροποποιήσεις του στεροειδούς φορέα, συμπεριλαμβανομένης εισαγωγής ομάδων ατόμων αζώτου (-N-) ή λακτάμης (-NH-CO-) στους στεροειδείς δακτυλίους (αζα-στεροειδή). Η χρήση αζα-στεροειδών ως βιολογικών φορέων αζώτου έχει οδηγήσει στη σύνθεση πολύ δραστικών ενώσεων έναντι λευχαιμιών [310, 311] και στερεών όγκων τρωκτικών, συμπεριλαμβανομένων ανθρώπινων ξενομοσχευμάτων, *in vitro* και *in vivo*, καθώς και σε ποικιλία καρκινικών κυτταρικών γραμμών [312, 313]. Έτσι, η παρουσία της χαρακτηριστικής ομάδας λακτάμης των αζα-στεροειδών μορίων έχει αποδειχθεί ζωτικής σημασίας στη μείωση της συστηματικής τοξικότητας και στη βελτίωση της δραστηριότητας, κάτι που οδήγησε στη σύνθεση πολυάριθμων λακταμικών αλκυλιωτικών στεροειδών παραγόντων [242, 294]. Περαιτέρω, η ευαισθησία ορισμένων τύπων καρκίνου όπως του καρκινώματος των ωοθηκών, σε ορμονικό έλεγχο παρέχει μια λογική βάση για φαρμακευτική αντικαρκινική έρευνα, αφού τα αλκυλιωτικά στεροειδή διαφαίνονται ως πολλά υποσχόμενα για την επαγωγή τόσο ορμονικών όσο και κυτταροτοξικών αποτελεσμάτων στα καρκινικά κύτταρα [242, 290, 291].

Όλες οι παραπάνω βιβλιογραφικές διαπιστώσεις, οδήγησαν αλλά και τεκμηριώθηκαν από αυτή την ερευνητική διατριβή. Έτσι, ξεκινώντας από την *in silico* μελέτη, φάνηκε ότι εκτός της ένωσης C που είναι πολύ λιποφιλική και ελάχιστα υδατοδιαλυτή (υψηλό logP και χαμηλό logS), οι υπόλοιπες ενώσεις A, B, D και E (με εξαίρεση τις ΧΕ2, ΧΕ3 και ΧΕ4 που

απορρίφθηκαν γιατί ήταν κατώτερες σε ADMET χαρακτηριστικά από το μόριο αναφοράς και συγγενούς δομής, ASE) εμφάνιζαν σχετικά καλά χαρακτηριστικά για αντικαρκινικά μόρια (που συνήθως είναι και πολύ τοξικά), με καλή διαπερατότητα και βιοδιαθεσιμότητα. Οι νέοι λακταμικοί στεροειδείς αλκυλιωτές παρουσίασαν βελτιωμένα χαρακτηριστικά και πιθανώς δραστηριότητα σε σχέση με την χημική ένωση αναφοράς ASE. Διατηρούσαν επίσης την ικανότητα μοριακής πρόσδεσης με την *PARP-1* σε σχέση με τα μόρια 3AB και «3L3L» (L3L), αν και είναι κατά πολύ μεγαλύτερες και πιο εξειδικευμένες χημικές δομές. Οι νέες χημικές ενώσεις δεν προβλέφθηκε να είναι πιο τοξικές από την ASE. Αυτό σε συνδυασμό με κάποια ADME χαρακτηριστικά τους, όπως μια ικανοποιητική ισορροπία λιποφιλικότητας/ υδατοδιαλυτότητας, έδωσαν την πιθανότητα να είναι πολύ καλύτερα ανεκτές δοσολογικά (πιο μεγάλη δόση χορήγησης χωρίς αρνητικά αποτελέσματα). Με βάση λοιπόν τις μεθοδολογίες της μελέτης ADME ιδιοτήτων και docking, προτάθηκαν και προχώρησαν οι ενώσεις: B, E, A, D, ASE (μόριο αναφοράς) αλλά και η C, με το μόριο αναφοράς και αλκυλιωτή PA να εμφανίζει επίσης πολύ καλά χαρακτηριστικά, αν και τα στοιχεία ήταν αντικρουόμενα στο docking (λόγω της πολύ μεγάλης ομοιότητας των δομών) και με την ένσταση ότι το PA πιθανόν να είναι αρκετά τοξικό. Ξεχώρισε επίσης η D ένωση καθώς αν και είχε πιο μέτρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, εν τούτοις παρουσίασε «κοντινές» με την A ιδιότητες με μικρή διαφορά (οι B και D κατατάχθηκαν πιο ψηλά από τις δύο τελευταίες) και το πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της προβλεπόμενης υψηλής CACO-2 κυτταρικής διαπερατότητας. Το τελευταίο χαρακτηριστικό θα μπορούσε να οδηγεί σε καλύτερη κυκλοφορία μεταξύ των ενδιάμεσων επιθηλίων και κυτταρικών μεμβρανών *in vivo*, όμως η ένωση D, λόγω υψηλής πρόβλεψης για σύνδεση στις πρωτεΐνες του ορού (logK_{hsa}), πιθανόν να έχει μειωμένη δραστηριότητα *in vivo*.

Έπειτα, τα δεδομένα της *in vitro* μελέτης έδειξαν ότι οι υπό διερεύνηση ενώσεις επηρέασαν διαφορετικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η UWB1.289 ωοθηκική καρκινική κυτταρική σειρά βρέθηκε να είναι πιο ευαίσθητη στις κυτταροστατικές επιδράσεις των ερευνούμενων ενώσεων συγκριτικά με την παρόμοια κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών UWB1.289+BRCA1 (t-test, $p < 0,001$) που διαθέτει λειτουργικά BRCA γονίδια και άρα ικανότητα ομόλογου ανασυνδυασμού για τις βλάβες στο DNA. Η UWB1.289 φάνηκε να είναι ιδιαίτερα πιο ευαίσθητη στις κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις των δοκιμασμένων αλκυλιωτικών παραγόντων από όλες τις άλλες κυτταρικές σειρές του

καρκίνου των ωοθηκών που δοκιμάστηκαν, προφανώς σύμφωνα με τον φαινότυπο BRCAness (t-test, $p < 0,001$).

Η ένωση D έδειξε τη μεγαλύτερη *in vitro* αντικαρκινική κυτταροτοξική δράση, γενικά αλλά και έναντι των κυττάρων UWB1.289, (t-test, $p < 0,001$). Τη δεύτερη πιο σημαντική δραστικότητα κατά της UWB1.289 παρουσίασαν οι E και B ενώσεις, με κοντινές τιμές IC50. Τα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών SKOV-3 και OVCAR-3 είναι γνωστό ότι δεν ανταποκρίνονται στην αντικαρκινική δράση αλκυλιωτών όπως η Σισπλατίνη και η Μελφαλάνη, καθώς και στο χημειοθεραπευτικό κυτταροτοξικό παράγοντα Αδριαμυκίνη. Παρόμοια, τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι τα κύτταρα SKOV-3 και OVCAR-3 είναι ανθεκτικά στην αντικαρκινική δράση του PA. Αντιθέτως οι ενώσεις μας, κατά σειρά δραστικότητας, D και A, αλλά και οι B και E, παράγουν εξαιρετικά κυτταροστατικά και κυτταροτοξικά αποτελέσματα σε αυτές τις δύο σειρές, (t-test, $p < 0.001$), όπως και η ένωση ASE με την οποία μπορούν να συγκριθούν.

Και οι τέσσερις καρκινικές κυτταρικές σειρές της μελέτης φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53. Όλες οι νέες ενώσεις εκτός της C, φαίνεται να έχουν αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση ανεξάρτητα από την παρουσία αυτών των μεταλλάξεων στο γονίδιο TP53 (t-test, $p < 0,001$) ή άλλων μεταλλάξεων, όπως το MEK1 στα OVCAR-3. Εν τούτοις, τα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών SKOV-3 που φέρουν μια ενεργή μετάλλαξη στο γονίδιο PIK3CA και παρουσιάζουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-high), σε αντίθεση με τα OVCAR-3 και τα UWB1.289+BRCA1 που είναι μικροδορυφορικά σταθερά (MSS) κύτταρα, δείχνουν μια υψηλότερη ευαισθησία στην αντικαρκινική δράση των A, B και D μορίων, όσον αφορά τις κυτταροστατικές τους επιδράσεις και την 100% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (TGI) (t-test, $p < 0,01$). Τέλος, οι κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές αντικαρκινικές επιδράσεις των τεσσάρων αυτών λακταμικών στεροειδών αλκυλιωτών, παρατηρήθηκαν και στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν και σε αυτές που δεν εκφράζουν (t-test, $p < 0,001$) υποδοχείς στεροειδών (υποδοχείς οιστρογόνων/ προγεστερόνης/ ανδρογόνων).

Όσον αφορά την ανασταλτική ικανότητα των μορίων προς την PARP, από την ενζυμική μελέτη PARP ELISA αποδείχθηκε ότι όλα τα μόρια που δοκιμάστηκαν (A, B, C, D, E) εμφάνισαν κάποια ανασταλτική δράση, αλλά σε σχέση με τα μόρια αναφοράς ASE και 3AB,

οι B και D είχαν καλύτερα αποτελέσματα με πιο ισχυρή αναστολή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, εν αντιθέσει με την ένωση C και τον αλκυλιωτή PA (με $IC_{50} > 100$). Σε σύνδεση και με τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν, είναι γνωστό ότι η *PARP-1* αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, συμπεριλαμβανομένου της p53 (από το προαναφερθέν γονίδιο *TP53*). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, με την παρουσία δίκλωνων θραύσεων του DNA (DSB), προκαλείται διακοπή του κυτταρικού κύκλου εξαρτώμενη από την p53 πρωτεΐνη. Η PARυλίωση της p53 από το *PARP-1* καταστέλλει την πυρηνική εξαγωγή της και μπορεί να οδηγήσει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου [314]. Εν τούτοις, τα μελετούμενα μόρια, αν και ισχυροί αναστολείς της *PARP-1*, δεν παρουσίασαν δράση σχετιζόμενη ή εξαρτώμενη από την p53, καθώς ήταν δραστικά όπως προαναφέραμε, ανεξαρτήτως παρουσίας του γονιδίου ή κάποιας μετάλλαξης του από αυτές που φέρουν οι συγκεκριμένες μελετούμενες καρκινικές σειρές.

Τέλος, από τη μεταγραφική ανάλυση αποτυπώθηκε η επίδραση των ενώσεων A, B, C, και D στη μεταγραφή των γονιδίων *PARP-1/2*, με πιο ισχυρές ποσοτικά επιδράσεις της ένωσης B, αλλά με στατιστικά σημαντικές επιδράσεις για όλες τις μελετούμενες ενώσεις και για τα δύο γονίδια. Υπάρχει μια προφανής βέβαια διαφοροποίηση ανάλογα με το είδος των κυττάρων και την ποσότητα των ενώσεων ως προς την επίδραση αυτή, με έμφαση στη διαφορετική κυτταρική ευαισθησία κάθε μιάς από τις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν, καθώς αναλόγως της ευπάθειας που εμφανίζεται από τις κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές επιδράσεις των μελετούμενων ενώσεων και της ανασταλτικής δράσης στην PARP, τόσο μεγαλύτερη είναι η και αύξηση της σχετικής κυτταρικής περιεκτικότητας mRNA της *PARP-1/ACTB* και της *PARP-2/ACTB*. Μερικώς εξαίρεση αποτελεί στο τελευταίο η ένωση D, που δεν εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις των τιμών των παραπάνω λόγων σε σχεδόν σε κάθε κυτταρική σειρά, αν και εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές μεταβολές.

Έτσι, οι A και B ενώσεις εμφανίζουν καλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα, δείγμα της ικανότητας μοριακής πρόσδεσης και της ανασταλτικής δράσης στο ένζυμο της *PARP-1* ή/και της *PARP-2*, με ταυτόχρονη αλκυλιωτική δράση που ενεργοποιεί τους μηχανισμούς της επιδιόρθωσης του DNA (άρα τη μεταγραφή των *PARP-1/2*, ειδικά επί ελλείψεως BRCA λειτουργικότητας). Το ίδιο θα μπορούσε να ειπωθεί και για την ένωση D, καθώς οι ενώσεις αυτές λειτουργούν με παρόμοιους μοριακούς μηχανισμούς όπως αποδείξαμε σε προηγούμενα κεφάλαια, και λόγω της εξαιρετικής κυτταροτοξικής δράσης της ένωσης

αυτής, πλην όμως δεν αποδείχθηκε η συσχέτιση από τα ευρήματα της μεταγραφικής ανάλυσης. Πιθανόν στη δράση της να εμπλέκονται και άλλοι κυτταρικοί μηχανισμοί και βιοχημικές οδοί [290] .

Οι οδοί του κυτταρικού θανάτου είναι σημαντικές για την καταστολή της καρκινογένεσης. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η *PARP-1* διασπάται, καθώς η δραστηριότητά της δεν είναι απαραίτητη για την απόπτωση στις περισσότερες περιπτώσεις. Σε υψηλού βαθμού βλάβες του DNA και ενεργοποίηση της *PARP-1*, ο σχηματισμός PAR επάγει προς τον κυτταρικό θάνατο, με τρόπο που εξαρτάται από τον AIF (παράγοντας απόπτωσης), σε νευρωνικά αλλά και σε καρκινικά κύτταρα [315], ενώ η επαγόμενη μείωση του NAD και η επακόλουθη μείωση του ATP μπορούν επίσης να προκαλέσουν ένα είδος νέκρωσης.

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής και σύμφωνα και με τα παραπάνω δεδομένα, προτείνεται επιπλέον ένας όμοιος συνεργιστικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου, όπως η προαναφερθείσα μορφή επαγόμενης νέκρωσης. Πράγματι, όπως συνάγεται από το σύνολο των πειραμάτων συνδυαστικά, οι νεοσυντιθέμενοι λακταμικοί στεροειδείς αλκυλιωτές, όχι μόνο αναστέλλουν λειτουργικά την *PARP-1* (αλλά και την *PARP-2*), κάτι που αποδεικνύεται από τα *in silico* πειράματα μοριακής πρόσδεσης και από την χρωματομετρική μέθοδο που εφαρμόστηκε, αλλά επηρεάζουν και τα μεταγραφικά επίπεδα του ενζύμου, όπως φαίνεται από τη μεταγραφική ανάλυση. Όπως προειπώθηκε, τα καρκινικά κύτταρα με ανεπάρκεια «BRCAness» που δεν διαθέτουν λειτουργικότητα ομόλογου ανασυνδυασμού, είναι ευαίσθητα στους αναστολείς *PARP-1*, λόγω της συμμετοχής της *PARP-1* στην ανίχνευση και επιδιόρθωση της βλάβης του DNA. Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι και καρκινικά κύτταρα με πλήρη λειτουργικότητα *BRCA1/2* γονιδίων, αποτελούν στόχους των νέων λακταμικών στεροειδών αλκυλιωτών και με αρκετά καλά αποτελέσματα.

Ο συνδυασμός των παραπάνω παρατηρήσεων μπορεί να σημαίνει ότι λόγω της κυτταροτοξικής δράσης των μορίων, τα μεταγραφικά επίπεδα των PARP του κυττάρου αυξάνονται ως απάντηση στην βλάβη του DNA, ευνοείται η μετάφραση και παραγωγή επιπλέον πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα προκαλείται συσσωρευτικά ανασταλτική δράση στην ίδια πρωτεΐνη. Έτσι είναι πολύ πιθανό το κύτταρο να μπαίνει σε ένα «φαύλο» κύκλο προσπάθειας επιδιόρθωσης της προκαλούμενης βλάβης του DNA. Είτε δηλαδή καταναλώνει τους ενεργειακούς του πόρους και οδηγείται προς την νέκρωση, εάν τα

ενεργειακά αποθέματα τελειώσουν πριν την επιδιόρθωση, ή σε απόπτωση, σε περίπτωση που επικρατήσει η ανασταλτική ικανότητα των νέων μορίων, οπότε δεν επιδιορθώνονται οι επαγόμενες κυτταροτοξικές δράσεις στο DNA και επομένως το καρκινικό κύτταρο δεν δύναται να επιβιώσει. Εν τούτοις, ας μην ξεχνάμε ότι το καρκινικό κύτταρο είναι «ένας εξαιρετικός μηχανισμός» διατήρησης λειτουργικότητας, περιλαμβάνοντας πολλές πιθανές μεταλλάξεις γονιδίων/ βιοχημικών οδών που ξεφεύγουν από τα δεδομένα του φυσιολογικού κυττάρου και της ομοιόστασης ενός οργανισμού. Και εν γένει είναι πιθανό να συντηρείται με τρόπους που μπορεί να μην προβλέπονται (όπως για παράδειγμα είναι η αύξηση της μεταστατικότητας ενός όγκου).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. WHO classification.

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarytumorwhoclassif.html>. Accessed 29 Dec 2021.

2. Cancer of the ovary - cancer stat facts. SEER.

<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>. Accessed 29 Dec 2021.

3. <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/OvarianTumOverviewID5231.html>. Accessed 29 Dec 2021.

4. Ellison LF, De P, Mery LS, Grundy PE, Canadian Cancer Society's Steering Committee for Canadian Cancer Statistics. Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children. CMAJ. 2009;180:422–4.

5. Parazzini F, Franceschi S, Vecchia L, Fasoli C. The epidemiology of ovarian cancer. Gynecol Oncol. 1991;43:9–23.

6. Cannistra SA. Cancer of the ovary. N Engl J Med. 2004;351:2519–29.

7. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. Lancet. 2009;374:1371–82.

8. Cho KR, Shih I-M. Ovarian cancer. Annu Rev Pathol. 2009;4:287–313.

9. Barnes MN, Grizzle WE, Grubbs CJ, Partridge EE. Paradigms for primary prevention of ovarian carcinoma. CA Cancer J Clin. 2002;52:216–25.

10. Sueblinvong T, Carney ME. Current understanding of risk factors for ovarian cancer. Curr Treat Options Oncol. 2009;10:67–81.

11. Wong AS, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1.

12. Russo A, Calò V, Bruno L, Rizzo S, Bazan V, Di Fede G. Hereditary ovarian cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2009;69:28–44.

13. Piver MS. Hereditary ovarian cancer. Lessons from the first twenty years of the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Gynecol Oncol.* 2002;85:9–17.
14. Prat J, Ribe A, Gallardo A, Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Hum Pathol.* 2005;36:97–137.
15. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol.* 2009;3:97–137.
16. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, Burgart LJ, et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med.* 1998;128:896–9.
17. Gorlin RJ. Nevroid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin.* 1995;13:113–25.
18. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet.* 1996;13:114–6.
19. Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol.* 2009;3:138–50.
20. Werness BA, Eltabbakh GH. Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features. *Int J Gynecol Pathol.* 2001;20:48–63.
21. Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:995–1005.
22. Koulouris CR, Penson RT. Ovarian stromal and germ cell tumors. *Semin Oncol.* 2009;36:126–36.
23. Lawrenson K, Gayther SA. Ovarian cancer: a clinical challenge that needs some basic answers. *PLoS Med.* 2009;6:e25.
24. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis. *Am J Pathol.* 2004;164:1511–8.
25. Cho KR. Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice. *Arch*

Pathol Lab Med. 2009;133:1775–81.

26. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for ovarian cancer. JAMA. 2018;319:595.

27. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. 2015;16:928–36.

28. Wilson MK, Pujade-Lauraine E, Aoki D, Mirza MR, Lorusso D, Oza AM, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: recurrent disease. Ann Oncol. 2017;28:727–32.

29. Ganguly B, Dolfi SC, Rodriguez-Rodriguez L, Ganesan S, Hirshfield KM. Role of biomarkers in the development of PARP inhibitors. Biomark Cancer. 2016;8 Suppl 1:15–25.

30. Pharoah PDP, Ponder BAJ. The genetics of ovarian cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2002;16:449–68.

31. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. Int J Gynecol Pathol. 1992;11:180–7.

32. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science. 1990;250:1684–9.

33. Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, Watson P, Conway T, Lynch J, et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. Lancet. 1991;338:82–3.

34. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science. 1994;266:66–71.

35. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science. 1994;265:2088–90.

36. Carvalho MA, Couch FJ, Monteiro ANA. Functional assays for BRCA1 and BRCA2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:298–310.
37. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:665–76.
38. Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:138–48.
39. Williams RS, Green R, Glover JN. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. *Nat Struct Biol.* 2001;8:838–42.
40. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* 2006;25:5864–74.
41. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433–9.
42. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.
43. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002;108:171–82.
44. Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, et al. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res.* 2006;66:2019–27.
45. Meric-Bernstam F. Heterogenic loss of BRCA in breast cancer: the “two-hit” hypothesis takes a hit. *Annals of surgical oncology.* 2007;14:2428–9.
46. Chan KYK, Ozçelik H, Cheung ANY, Ngan HYS, Khoo U-S. Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res.* 2002;62:4151–6.
47. Dworkin AM, Spearman AD, Tseng SY, Sweet K, Toland AE. Methylation not a frequent

- “second hit” in tumors with germline BRCA mutations. *Fam Cancer*. 2009;8:339–46.
48. Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat*. 2005;25:415–22.
49. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12629–33.
50. Sluiter MD, Van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat*;125(2):325–49. *Breast Cancer Res Treat*. 125:325–49.
51. del Valle J, Feliubadaló L, Nadal M, Teulé A, Miró R, Cuesta R, et al. Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122:733–43.
52. Kasprzak L, Foulkes WD, Shelling AN. Forth nightly review: hereditary ovarian carcinoma. *BMJ*. 1999;318:786–9.
53. Gayther SA, Mangion J, Russell P, Seal S, Barfoot R, Ponder BA, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet*. 1997;15:103–5.
54. Sowter HM, Ashworth A. BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis*. 2005;26:1651–6.
55. Thompson D, Easton D, Breast Cancer Linkage Consortium. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 2001;68:410–9.
56. Macedo GS, Alemar B, Ashton-Prolla P. Reviewing the characteristics of BRCA and PALB2-related cancers in the precision medicine era. *Genet Mol Biol*. 2019;42 1 suppl 1:215–31.
57. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: important differences with common interests. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:372–372.

58. Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, Morgan K, Mahon M, Foulkes WD, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1341–51.
59. Tonin PN, Perret C, Lambert JA, Paradis AJ, Kantemiroff T, Benoît MH, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. *Int J Cancer.* 2001;95:189–93.
60. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih I-M. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1007–12.
61. Kurman RJ, Ie S. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011;42:918–31.
62. Szabo CI, King MC. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *The American Journal of Human Genetics.* 1997;60:1013–20.
63. Katabathina VS, Prasad SR. Genetics of Susceptibility to Sporadic Ovarian Cancer, in eLS. Wiley & Sons, Ltd; 2013.
64. Al Bakir M, Gabra H. The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future. *Br Med Bull.* 2014;112:57–69.
65. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol.* 2010;221:49–56.
66. Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69:6565–72.
67. Nam EJ, Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18:1169–82.

68. Dhar KK, Branigan K, Parkes J, Howells RE, Hand P, Musgrove C, et al. Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. *Br J Cancer*. 1999;81:1174–81.
69. Barbieri F, Lorenzi P, Ragni N, Schettini G, Bruzzo C, Pedullà F, et al. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. *Oncology*. 2004;66:310–5.
70. D’Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res*. 2004;10:8132–41.
71. Fujita M, Enomoto T, Murata Y. Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;202:97–9.
72. Christie M, Oehler MK. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc*. 2006;12:57–63.
73. Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag D, Hilpert F, Dimitrov P, Sapinoso LM, Orlowska-Volk M, et al. Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene*. 2005;24:1053–65.
74. Vermeij J, Teugels E, Bourgain C, Xiangming J, in ’t Veld P, Ghislain V, et al. Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2008;8:3.
75. Reibenwein J, Krainer M. Targeting signaling pathways in ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:353–65.
76. Badache A, Hynes NE. A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners. *Cancer cell*. 2004;5:299–301.
77. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev*. 2008;28:954–74.
78. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, et al. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian

carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998;58:5367–73.

79. Issa RM, Lebeau A, Grob T, Holst F, Moch H, Terracciano L, et al. Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. *Mod Pathol.* 2009;22:191–6.

80. Chan KKL, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HYS. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol.* 2008;111:144–51.

81. Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, et al. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:5861–9.

82. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40:179–204.

83. O’Sullivan CC, Moon DH, Kohn EC, Lee J-M. Beyond breast and ovarian cancers: PARP inhibitors for BRCA mutation-associated and BRCA-like solid tumors. *Front Oncol.* 2014;4:42.

84. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:1475–85.

85. Hitomi K, Iwai S, Tainer JA. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:410–28.

86. Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JHJ. Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet.* 2008;24:77–85.

87. Amé J-C, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004;26:882–93.

88. Hass R. Cellular responses to reactive oxygen species induced DNA damage and aging. *Biol Chem.* 2008;:1431–6730.

89. D’Errico M, Parlanti E, Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res.* 2008;659:4–14.

90. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003;421:436–40.

91. Di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *National Review Cancer*. 2008;8:512–22.
92. Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet*. 2014;10:e1004086.
93. Delacôte F, Lopez BS. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: The trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*. 2008;7:33–8.
94. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 2008;18:134–47.
95. Natarajan AT, Palitti F. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res*. 2008;657:3–7.
96. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2011;12:68–78.
97. Paull TT, Lee J-H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle*. 2005;4:737–40.
98. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 2003;300:1542–8.
99. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. 2011;25:409–33.
100. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*. 2008;18:114–24.
101. Lehmann AR, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing JF, et al. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:891–9.
102. Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a012740.

103. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2014;343:1470–5.
104. Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*. 2011;145:993.
105. Schlacher K, Wu H, Jasin M. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*. 2012;22:106–16.
106. Ying S, Hamdy FC, Helleday T. Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res*. 2012;72:2814–21.
107. Chen C-C, Feng W, Lim PX, Kass EM, Jasin M. Homology-directed repair and the role of BRCA1, BRCA2, and related proteins in genome integrity and cancer. *Annu Rev Cancer Biol*. 2018;2:313–36.
108. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997;272:19633–6.
109. Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D’Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*. 2003;85:1053–71.
110. Dodson ML, Lloyd RS. Mechanistic comparisons among base excision repair glycosylases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32:678–82.
111. Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:695–711.
112. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:391–407.
113. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 2006;106:302–23.
114. Tornaletti S, Hanawalt PC. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie*. 1999;81:139–46.

115. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, De Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7:517–28.
116. Eustermann S, Wu W-F, Langelier M-F, Yang J-C, Easton LE, Riccio AA, et al. Structural basis of detection and signaling of DNA single-strand breaks by human PARP-1. *Mol Cell*. 2015;60:742–54.
117. Teicher BA, Cucchi CA, Lee JB, Flatow JL, Frei E. Alkylating Agents: In Vitro Studies of CrossResistance Patterns in Human Cell Lines. *Cancer Res*. 1986;46.
118. Schwartz JL. Monofunctional alkylating agent-induced S-phase-dependent DNA damage. *Mutat Res-Environ Mutag Related Subj*. 1989;216:111–8.
119. O'Donovan A, Davies AA, Moggs JG, West SC, Wood RD. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*. 1994;371:432–5.
120. Goodman LS, Wintrobe MM. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc*. 1946;132:126–32.
121. Bardal SK, Waechter JE, Martin DS. Neoplasia. In: *Applied Pharmacology*. Elsevier; 2011. p. 305–24.
122. De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, et al. Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:7303–7.
123. Miwa M, Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci*. 2007;98:1528–35.
124. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70:789–829.
125. Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci*. 2010;35:208–

19.

126. Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci.* 2008;13:3046–82.

127. Eustermann S, Brockmann C, Mehrotra PV, Yang JC, Loakes D, West SC, et al. Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly (ADP-ribose). *Nature structural & molecular biology.* 2010;17:241–3.

128. Langelier MF, Ruhl DD, Planck JL, Kraus WL, Pascal JM. The Zn³ domain of human poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly (ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *Journal of biological chemistry.* 2010;285:18877–87.

129. Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell.* 2010;39:8–24.

130. Ruf A, De Murcia JM, De Murcia G, Schulz GE. Structure of the catalytic fragment of poly (AD-ribose) polymerase from chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93:7481–5.

131. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-laying” NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* 2005;19:1951–67.

132. Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. ADP-ribose) n participates in DNA excision repair. *Nature.* 1980;283:593–6.

133. Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol.* 2003;31:446–54.

134. Ménissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* 2003;22:2255–63.

135. Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst).* 2008;7:1077–86.

136. Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA repair*. 2008;7:932–40.
137. Prasad R, Lavrik OI, Kim SJ, Kedar P, Yang XP, Berg BJV, et al. DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair: Poly (ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:32411–4.
138. Couto CA-M, Wang H-Y, Green JCA, Kiely R, Siddaway R, Borer C, et al. PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2011;194:367–75.
139. Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, et al. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:6170–82.
140. Heyer BS, MacAuley A, Behrendtsen O, Werb Z. Hypersensitivity to DNA damage leads to increased apoptosis during early mouse development. *Genes Dev*. 2000;14:2072–84.
141. Helleday T, Bryant HE, Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*. 2005;4:1176–8.
142. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol*. 2013;3:113.
143. Maluchenko NV, Nilov DK, Pushkarev SV, Kotova EY, Gerasimova NS, Kirpichnikov MP, et al. Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12127.
144. Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science*. 2008;319:819–21.
145. Krishnakumar R, Kraus WL. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Mol Cell*. 2010;39:736–49.
146. Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding,

- coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:294–302.
147. Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:411–24.
148. Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell.* 2004;119:803–14.
149. Tulin A, Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science.* 2003;299:560–2.
150. Beneke S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation. *Front Genet.* 2012;3:169.
151. Kang HC, Lee Y-I, Shin J-H, Andrabi SA, Chi Z, Gagné J-P, et al. Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:14103–8.
152. Schmid JA, Berti M, Walser F, Raso MC, Schmid F, Krietsch J, et al. Histone ubiquitination by the DNA damage response is required for efficient DNA replication in unperturbed S phase. *Mol Cell.* 2018;71:897-910.e8.
153. Maluchenko NV, Feofanov AV, Studitsky VM. PARP-1-associated pathological processes: Inhibition by natural polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2021;22:11441.
154. Berger NA, Whitacre CM, Hashimoto H, Berger SJ, Chatterjee S. NAD and poly(ADP-ribose) regulation of proteins involved in response to cellular stress and DNA damage. *Biochimie.* 1995;77:364–7.
155. Andrabi SA, Umanah GKE, Chang C, Stevens DA, Karuppagounder S, Gagné J-P, et al. ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 2014. p. 10209–14.
156. Berger NA, Sims JL, Catino DM, Berger SJ. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells.

Princess Takamatsu Symp. 1983;13:219–26.

157. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome-a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12:741–52.

158. Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The “suicide hypothesis” revisited. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:122–9.

159. Zingarelli B, Szabó C, Salzman AL. Blockade of Poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis. *Gastroenterology*. 1999;116:335–45.

160. Fouquerel E, Goellner EM, Yu Z, Gagné J-P, Barbi de Moura M, Feinstein T, et al. ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell Rep*. 2014;8:1819–31.

161. Bano D, Prehn JHM. Apoptosis-inducing factor (AIF) in physiology and disease: The tale of a repented natural born killer. *EBioMedicine*. 2018;30:29–37.

162. Robinson N, Ganesan R, Hegedűs C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*. 2019;26:101239.

163. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*. 2009;218:193–202.

164. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, et al. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2021;296:100046.

165. Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:2545–79.

166. Harrision D, Gravells P, Thompson R, Bryant HE. ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vs. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)-Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer. *Therapy Front Mol Biosci*. 2020.

167. Ying W, Alano CC, Garnier P, Swanson RA. NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res*. 2005;79:216–23.
168. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in bioscience*. 2009.
169. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135:1161–3.
170. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:37–43.
171. Soldani C, Scovassi AI. Apoptosis. 2002;7:321–8.
172. Virág L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM, Oliver FJ. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med*. 2013;34:1153–67.
173. Wang C, Xu W, Zhang Y, Zhang F, Huang K. PARP1 promote autophagy in cardiomyocytes via modulating FoxO3a transcription. *Cell Death Dis*. 2018;9:1047.
174. Rodríguez-Vargas JM, Oliver-Pozo FJ, Dantzer F. PARP1 and Poly(ADP-ribosyl)ation signaling during autophagy in response to nutrient deprivation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2641712.
175. Muñoz-Gámez JA, Rodríguez-Vargas JM, Quiles-Pérez R, Aguilar-Quesada R, Martín-Oliva D, de Murcia G, et al. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy*. 2009;5:61–74.
176. Chen S-Y, Chiu L-Y, Maa M-C, Wang J-S, Chien C-L, Lin W-W. zVAD-induced autophagic cell death requires c-Src-dependent ERK and JNK activation and reactive oxygen species generation. *Autophagy*. 2011;7:217–28.
177. Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA repair: Additional functions of PARP-1 in cancer. *Front Oncol*. 2013;3:290.
178. Schmid G, Wang ZQ, Wesierska-Gadek J. Compensatory expression of p73 in PARP-deficient mouse fibroblasts as response to a reduced level of regularly spliced wild-type p53

protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255:399–405.

179. Wacker DA, Ruhl DD, Balagamwala EH, Hope KM, Zhang T, Kraus WL. The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7475–85.

180. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1999;342 (Pt 2):249–68.

181. Kauppinen TM, Chan WY, Suh SW, Wiggins AK, Huang EJ, Swanson RA. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7136–41.

182. Hassa PO, Haenni SS, Buerki C, Meier NI, Lane WS, Owen H, et al. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2005;280:40450–64.

183. Messner S, Schuermann D, Altmeyer M, Kassner I, Schmidt D, Schär P, et al. ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. Sumoylation of poly. 2009;23:3978–89.

184. Wang T, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Chock PB, Yang DCH. Polyubiquitylation of PARP-1 through ubiquitin K48 is modulated by activated DNA, NAD⁺, and dipeptides. *J Cell Biochem.* 2008;104:318–28.

185. Masutani M, Fujimori H. Poly(ADP-ribosyl)ation in carcinogenesis. *Mol Aspects Med.* 2013;34:1202–16.

186. Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J.* 2001;20:3535–43.

187. Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Matínez-Romero R, et al. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol Biol.* 2007;8:29.

188. Zhou X, Cooper KL, Huestis J, Xu H, Burchiel SW, Hudson LG, et al. S-nitrosation on zinc finger motif of PARP-1 as a mechanism of DNA repair inhibition by arsenite. *Oncotarget*. 2016;7:80482–92.
189. Ding X, Zhou X, Cooper KL, Huestis J, Hudson LG, Liu KJ. Differential sensitivities of cellular XPA and PARP-1 to arsenite inhibition and zinc rescue. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;331:108–15.
190. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:2339–47.
191. Ahel D, Horejsi Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, et al. ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*. 2009;325:1240–3.
192. Ahel I, Ahel D, Matsusaka T, Clark AJ, Pines J, Boulton SJ, et al. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature*. 2008;451:81–5.
193. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19:711–36.
194. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002;20:2429–40.
195. Szabo C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19:287–98.
196. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF- κ B in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 59:1534-1553. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8527-2>.
197. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *FEBS J*. 2021; febs.15716. <https://doi.org/10.1111/febs.15716>.
198. Inaba H, Tsukagoshi A, Kida S. PARP-1 activity is required for the reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *Mol Brain*. 2015;8:63.

199. Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1396–406.
200. Eskander RN, Tewari KS. Beyond angiogenesis blockade: targeted therapy for advanced cervical cancer. *J Gynecol Oncol.* 2014;25:249–59.
201. Sunada S, Nakanishi A, Miki Y. Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Sci.* 2018;109:893–9.
202. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005;434:913–7.
203. Saijo N. Present status and problems on molecular targeted therapy of cancer. *Cancer Res Treat.* 2012;44:1–10.
204. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005;434:917–21.
205. Underhill C, Toulmonde M, Bonnefoi H. A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Ann Oncol.* 2011;22:268–79.
206. Du L, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC, et al. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003;278:18426–33.
207. Franzese E, Centonze S, Diana A, Carlino F, Guerrera LP, Di Napoli M, et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 2019;73:1–9.
208. DelloRusso C, Welcsh PL, Wang W, Garcia RL, King M-C, Swisher EM. Functional characterization of a novel BRCA1-null ovarian cancer cell line in response to ionizing radiation. *Mol Cancer Res.* 2007;5:35–45.
209. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors From Mutation Carriers. *New England Journal of*

Medicine. 2009;361:123–34.

210. Yap TA, Sandhu SK, Carden CP, de Bono JS. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:31–49.

211. Lovato A, Panasci L, Witcher M. Is there an epigenetic component underlying the resistance of triple-negative breast cancers to parp inhibitors? *Front Pharmacol*. 2012;3:202.

212. Wang Y-Q, Wang P-Y, Wang Y-T, Yang G-F, Zhang A, Miao Z-H. An update on poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors: Opportunities and challenges in cancer therapy. *J Med Chem*. 2016;59:9575–98.

213. Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:1383–8.

214. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:110–20.

215. Lee J-M, Hays JL, Annunziata CM, Noonan AM, Minasian L, Zujewski JA, et al. Phase I/Ib study of olaparib and carboplatin in BRCA1 or BRCA2 mutation-associated breast or ovarian cancer with biomarker analyses. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106:dju089.

216. Menear KA, Adcock C, Boulter R, Cockcroft X, Copsey L, Cranston A, et al. 4- 3-(4-Cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl -2H-phthalazin-1-one: A Novel Bioavailable Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51:6581–91.

217. Kumar A, Jha A. Drug development strategies. In: *Anticandidal Agents*. Elsevier; 2017. p. 63–71.

218. Anwar T, Kumar P, Khan AU. Modern tools and techniques in computer-aided drug design. In: *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*. Elsevier; 2021. p. 1–30.

219. Bucher D, Stouten P, Triballeau N. Shedding light on important waters for drug design: Simulations versus grid-based methods. *J Chem Inf Model*. 2018;58:692–9.

220. Ramaswamy A, Balasubramanian S, Rajagopalan M. Biomolecular talks—part 1: A

theoretical revisit on molecular modeling and docking approaches. In: *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*. Elsevier; 2021. p. 31–55.

221. Yu W, MacKerell AD Jr. Computer-aided drug design methods. *Methods Mol Biol*. 2017;1520:85–106.

222. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2011;7:146–57.

223. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44:235–49.

224. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46:3–26.

225. Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;101:89–98.

226. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem*. 1999;1:55–68.

227. Jorgensen WL, Duffy EM. Prediction of drug solubility from structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:355–66.

228. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175:880–5.

229. Artursson; K. Palm P, Luthman ;. K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Adv Drug Deliv*. 2001;46:27–43.

230. Jorgensen WL. The many roles of computation in drug discovery. *Science*. 2004;303:1813–8.

231. QikProp 4.2 User Manual, QikProp User Manual Copyright © 2014 Schrödinger, LLC.

232. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002;45:2615–23.
233. Hewitt M, Cronin MTD, Enoch SJ, Madden JC, Roberts DW, Dearden JC. In silico prediction of aqueous solubility: the solubility challenge. *J Chem Inf Model.* 2009;49:2572–87.
234. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharm Res.* 1997;14:568–71.
235. Lu JJ, Crimin K, Goodwin JT, Crivori P, Orrenius C, Xing L, et al. Influence of molecular flexibility and polar surface area metrics on oral bioavailability in the rat. *J Med Chem.* 2004;47:6104–7.
236. Tomar V, Mazumder M, Chandra R, Yang J, Sakharkar MK. Small molecule drug design. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology.* Elsevier; 2019. p. 741–60.
237. Wall ME, Abernethy GS, Carroll FI, Taylor DJ. The effects of somesteroïdal alkylating agents on experimental animal mammary tumor and leukemia systems. *J Med Chem.* 1969;12:810–8.
238. Brendel M, Ruhland A. Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents, *Mutat. Mutat Res.* 1984;133:51–85.
239. Kohn KW, Hartley JA, Mattes WB. Mechanisms of DNA sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:10531–49.
240. Catsoulacos P, Catsoulacos D. Conjugated system of homo-aza-steroidal esters in cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 1994;14:2525–8.
241. Trafalis DTP, Sambani C, Kapsimali V, Economidou J, Politis G, Catsoulacos P. Effects of homo-aza-steroids on acute non-lymphocytic leukaemia cell proliferation in vitro. *Br J Haematol.* 1995;91:907–14.
242. Trafalis D, Geromichalou E, Dalezis P, Nikoleousakos N, Sarli V. Synthesis and evaluation

- of new steroidal lactam conjugates with aniline mustards as potential antileukemic therapeutics. *Steroids*. 2016;115:1–8.
243. Trafalis DT, Camoutsis C, Dalezis P, Papageorgiou A, Kontos M, Karamanakis P, et al. Antitumour effect of a- and d- lactam androgen nitrogen mustards on non-small cell lung carcinoma. *J BUON*. 2004;9:275–82.
244. Huang Y, Cui J, Zhong Z, Gan C, Zhang W, Song H. Synthesis and cytotoxicity of 17a-aza-D-homo-androster-17-one derivatives, *Bioorg. Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21:3641–3.
245. Geromichalos GD, Geromichalou E, Camoutsis C, Kontos M, Dalezis P, Papageorgiou A, et al. In silico/in vitro study of hybrid D-modified steroidal alkylator anticancer activity using uridine phosphorylase as target protein. *Anticancer Res*. 2011;31:831–42.
246. Trafalis DTP. Hybrid aza-steroid alkylators in the treatment of colon cancer. *Cancer Lett*. 2006;243:202–10.
247. Camoutsis C, Trafalis D, Pairas G, Papageorgiou A. On the formation of 4-[N, N-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl acetic acid esters of hecogenin and aza- homo-hecogenin and their antileukemic activity. *Farmaco*. 2005;60:826–9.
248. Trafalis DT, Geromichalos GD, Koukoulitsa C, Papageorgiou A, Karamanakis P, Camoutsis C. Lactandrate: a D-homo-aza-androsterone alkylator in the treatment of breast cancer, *Breast Cancer Res. Breast Cancer Res Treat*. 2006;97:17–31.
249. Trafalis DTP, Camoutsis C, Papageorgiou A. Research on the anti-tumour effect of steroid lactam alkylator (NSC-294859) in comparison with conventional chemotherapeutics in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2005;15:273–81.
250. Huang Y, Cui J, Zheng Q, Zeng C, Chen Q, Zhou A. 6-hydroximino-4-aza-Ahomo-cholest-3-one and related analogue as a potent inducer of apoptosis in cancer cells. *Steroids*. 2012;77:829–34.
251. Camoutsis C, Trafalis DT. An overview on the antileukemic potential of Dhomo-aza- and respective 17beta-acetamido-steroidal alkylating esters, *Invest. Invest New Drugs*. 2003;21:47–54.

252. Trafalis DTP, Tsavdaridis D, Camoutsis C, Karayiani V, Mourelatos D, Dalezis P, et al. Preclinical studies on NSC290205 aza-steroid alkylator activity in combination with adriamycin against lymphoid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;128:343–50.
253. Zoldakova M, Biersack B, Kostrhunova H, Ahmad A, Padhye S, Sarkar FH. Carboxydiamine)Pt(II) complexes of a combretastatin A-4 analogous chalcone: the influence of the diamine ligand on DNA binding and anticancer effects. *Med Chem Commun.* 2011;2:493–9.
254. Frei E 3rd, Teicher BA, Holden SA, Cathcart KN, Wang YY. Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose. *Cancer Res.* 1988;48:6417–23.
255. Trafalis D, Dalezis P, Geromichalou E, Sagredou S, Sflakidou E, Voura M, et al. Discovery of steroidal lactam conjugates of POPAM-NH₂ with potent anticancer activity. *Future Med Chem.* 2020;12:19–35.
256. PubChem. Propionic acid, 3-(p-(bis(2-chloroethyl)amino)phenoxy)-. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/96080>. Accessed 24 Jan 2022.
257. Gandhi VB, Luo Y, Liu X, Shi Y, Klinghofer V, Johnson EF, et al. Discovery and SAR of substituted 3-oxoisindoline-4-carboxamides as potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20:1023–6.
258. PubChem. 3-Oxo-2-Piperidin-4-yl-2,3-Dihydro-1H-Isoindole-4-Carboxamide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-oxo-2-piperidin-4-yl-1H-isoindole-4-carboxamide>. Accessed 24 Jan 2022.
259. Donà F, Chiodi I, Belgiovine C, Raineri T, Ricotti R, Mondello C, et al. Poly(ADP-ribosylation) and neoplastic transformation: effect of PARP inhibitors. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14:524–36.
260. PubChem. Olaparib. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Olaparib>. Accessed 24 Jan 2022.
261. PubChem. 3B-Hydroxy-5-cholesten-7-one, TMS. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/10543346>. Accessed 24 Jan 2022.

262. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 1970;227:168–70.
263. Yi C, Zhang L, Li L, Liu X, Ling S, Zhang F, et al. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model in nude mice using a drug-resistant human ovarian cancer cell line with a high expression of c-Kit. *Oncol Lett*. 2014;8:2611–5.
264. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1977;59:221–6.
265. Clinton GM, Rougeot C, Derancourt J, Roger P, Defrenne A, Godyna S, et al. Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:316–20.
266. Hernandez L, Kim MK, Lyle LT. Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol*. 2016;142:332–40.
267. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther*. 2004;10:1032–42.
268. Hamilton TC. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res*. 1983;43:5379–89.
269. Hamilton TC. Induction of progesterone receptor with 17beta-estradiol in human ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59:561–3.
270. Rogan AM. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*. 1984;224:994–6.
271. Hamilton TC. Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice. *Cancer Res*. 1984;44:5286–90.
272. Green JA. Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion. *Cancer Res*. 1984;44:5427–31.
273. Schrodinger Software Suite, Schrodinger, LLC, New York, NY.

274. Kola I, Landis ;. J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates ? Nat Rev Drug Discovery. 2004;3:711–6.
275. Artursson; R PT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures : Caco-2 and beyond. Pharm Res. 1997;14:1655–8.
276. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2013-2: QikProp, version 3.7. 2013.
277. Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013.
278. Palm; K. Luthman; A KL, Ungell ;. G., Strandlund ;. P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. J Pharm Sci. 1996;85:32–9.
279. Repasky MP, Shelley M, Friesner RA. Flexible Ligand Docking with Glide. Current Protocols in Bioinformatics. 2007.
280. Cheeseright T, Mackey M, Rose S, Vinter A. Molecular field extreme as descriptors of biological activity: Definition and validation. Journal of Chemical Information and Modeling. 2006;46:665–76.
281. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. J Med Chem. 2004;47:1739–49.
282. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. J Med Chem. 2006;49:6177–96.
283. Beckmann E. Zur kenntniss der isonitrosoverbindungen. Ber Dtsch Chem Ges. 1886;19:988–93.
284. Yao Z, Xu Y, Zhang M, Jiang S, Nicklaus MC, Liao C. Discovery of a novel hybrid from finasteride and epristeride as 5 α -reductase inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21:475–8.
285. Camoutsis C, Catsoulacos P. Beckmann rearrangement of 3-aza-a-homo-4 α -androsten-

4,17-dione oxime and 3-oxo-13 α -amino-13,17-seco-4-androsten-17-oic 13,17-lactam oxime. J Heterocycl Chem. 1983;20:1093–4.

286. Koutsourea AI, Arsenou ES, Fousteris MA, Nikolaropoulos SS. Synthetic approaches for the synthesis of a cytostatic steroidal B-D bilactam. Steroids. 2003;68:659–66.

287. Ringold HJ, Burstein S, Dorfman RI. A biochemical effect of deuterium. Nature. 1961;191:1294–5.

288. Wall ME, Abernethy GS Jr, Carroll FI, Taylor DJ. The effects of some steroidal alkylating agents on experimental animal mammary tumor and leukemia systems. J Med Chem. 1969;12:810–8.

289. Wampler GL, Catsoulacos P. Antileukemic effect of homo-aza-steroidal ester of [p-bis(2-chloroethyl)amino]phenyl]acetic acid. Cancer Treat Rep. 1977;61:37–41.

290. Dalezis P, Geromichalou E, Polonifi A, Sagredou S, Nikoleousakos N, Nikolaou M, et al. Azasteroid Alkylators as Dual Inhibitors of AKT and ERK Signaling for the Treatment of Ovarian Carcinoma. Cancers . 2020;12.

291. Trafalis DT, Polonifi A, Dalezis P, Nikoleousakos N, Katsamakas S, Sarli V. Targeting on poly(ADP-ribose) polymerase activity with DNA-damaging hybrid lactam-steroid alkylators in wild-type and BRCA1-mutated ovarian cancer cells. Chem Biol Drug Des. 2017;90:854–66.

292. Phelan K, May KM. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. Curr Protoc Cell Biol. 2015;66:1.1.1-1.1.22.

293. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. Exp Cell Res. 1958;15:112–7.

294. Trafalis DTP, Camoutsis C, Karamanakos P, Arvanitis A, Tegou E, Ziras N, et al. Preclinical evaluation of the homo-aza-steroid ester 13 β -hydroxy-13 α -amino-13,17- seco-5 α -androstan-17-oic-13,17-lactam-p-bis(2-chloroethyl)aminophenoxy acetate for the treatment of malignant melanoma. J BUON. 2003;8:333–9.

295. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture

- tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995;5:69–84.
296. Kotova E, Tulin AV. High-throughput colorimetric assay for identifying PARP-1 inhibitors using a large small-molecule collection. *Methods Mol Biol.* 2017;1608:299–312.
297. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:209–19.
298. Denman SE, McSweeney CS. Quantitative (real-time) PCR. In: *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 105–15.
299. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24:15–28.
300. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893–917.
301. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:183–203.
302. Kumar M, Jaiswal RK, Yadava PK, Singh RP. An assessment of poly (ADP-ribose) polymerase-1 role in normal and cancer cells. *Biofactors.* 2020;46:894–905.
303. Pavri R, Lewis B, Kim T-K, Dilworth FJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell.* 2005;18:83–96.
304. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, et al. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res.* 2007;67:911–8.
305. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376:235–44.

306. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010;376:245–51.
307. Fong MY, Kakar SS. Ovarian cancer mouse models: a summary of current models and their limitations. *J Ovarian Res*. 2009;2:12.
308. Barber LJ, Sandhu S, Chen L, Campbell J, Kozarewa I, Fenwick K, et al. Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *J Pathol*. 2013;229:422–9.
309. Catsoulacos P. Further studies on the anti-neoplastic activity of 3 beta-hydroxy-13 alpha-amino-13,17-seco-5alpha-androstan-17-oic-13,17-lactam[p--phenyl]acetate (NSC 290205). *Cancer Lett*. 1984;22:199–202.
310. Catsoulacos P, Catsoulacos D. Antitumor activity of homo-aza-steroidal esters of p-[N, N-bis(2-chloroethyl)aminophenoxyacetic acid. *Anticancer Res*. 1993;13:1203–8.
311. Catsoulacos P, Camoutsis C, Wampler GL. Effect of a delta 5-homo-aza-steroidal ester in P388 and L1210 murine leukemias. *Oncology*. 1982;39:59–60.
312. Catsoulacos P. Activity of 3 beta-hydroxy-13 alpha-amino-13,17-seco-5 alpha-androstan-17-oic-13,17-lactam-p-bis(2-chloroethyl)aminophenoxyacetate (NSC 294859) on experimental animal tumor and leukemia systems. *Oncology*. 1983;40:290–2.
313. Catsoulacos P, Wampler GL. Activity of 3 beta-hydroxy-13 alpha-amino-13,17-seco-5alpha-androstane-17-oic-13,17-lactam(p-(bis(2-chloroethyl)amino)-phenyl) acetate(NSC 290205) in murine solid tumors. *Oncology*. 1982;39:109–12.
314. Kanai M, Hanashiro K, Kim S-H, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, et al. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosyl)ation. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1175–83.
315. Yu S-W, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18314–9.