



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στόχευση καρκινικών κυττάρων με τη χρήση απταμερών

Καραμπουτζάκη Βασιλική

Επιβλέπων: Κορδάτος Κωνσταντίνος,
Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2019

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ) υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Κωνσταντίνου Κορδάτου σε συνεργασία με τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του ΙΒΕΑΑ, Γεώργιο Τσέκενη.

Καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Κορδάτο, τόσο για την άψογη συνεργασία, όσο και για την ευκαιρία που μου έδωσε να βρεθώ σε ένα ευρέως αναγνωρισμένο ερευνητικό κέντρο μέσα από αυτή τη διπλωματική εργασία. Η εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου – μη γνωρίζοντάς με ως φοιτήτρια – με την ανάθεση ενός ερευνητικού θέματος σε εξωτερική συνεργασία με το ΙΒΕΑΑ, με τιμά απεριόριστα και ελπίζω να τον έβγαλα ασπροπρόσωπο με την παρουσία και τη δουλειά μου εκεί.

Δευτερευόντως, να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο υπεύθυνο για τη θεμελίωση και διεξαγωγή αυτού του θέματος, κ. Γιώργο Τσέκενη. Πέρα από υποδειγματικός ερευνητικός επιβλέπωντας της εργασίας μου, υπήρξε στήριγμά μου τόσο σε μαθησιακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η διάθεσή του να με εισάγει στον κόσμο της Βιολογίας μέσα από διαρκείς συζητήσεις και επεξηγήσεις, η υπομονή του, η συνεχής παρουσία του σε οποιοδήποτε προβληματισμό ή δυσκολία, αλλά κυρίως η πίστη του σε μένα, αναθέτοντάς μου αρμοδιότητες να φέρω εις πέρας, είναι λίγα από όλα όσα μου προσέφερε. Μέσα από το τελευταίο αυτό έτος ενασχόλησης με τη διπλωματική, όχι μόνο αποκόμισα πληθώρα γνώσεων, αλλά γνώρισα και σημαντική προσωπική εξέλιξη, την οποία οφείλω να αποδώσω στις ευκαιρίες που μου έδωσε ο κ. Τσέκενης και την ενασχόλησή του μαζί μου. Η συνεργασία μου μαζί του υπήρξε υπέρτατη τιμή, αποτέλεσε μεγάλη εμπειρία και με διαμόρφωσε ως επαγγελματία για τη μελλοντική μου πορεία.

Ακόμη, να ευχαριστήσω την κ. Ανδριάννα Παπαδημητροπούλου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του ΙΒΕΑΑ, για την παροχή όλων των καρκινικών κυτταρικών σειρών, αλλά και των απαραίτητων γνώσεων και συμβουλών καλλιέργειας και ανάπτυξής τους. Επίσης, ξεχωρίζω την προθυμία και την ευγένεια της να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα επί των κυττάρων, αλλά και το γνήσιο ενδιαφέρον της για την πρόοδο της εργασίας. Ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ στη μεταπτυχιακή ερευνήτρια Ειρήνη Ταουκτσή, η οποία αφιέρωσε αρκετό από το χρόνο της για να με εκπαιδεύσει σε

μεθόδους κυτταροκαλλιέργειας και μέτρησης των κυττάρων, ενώ παράλληλα είχε την ευγενή πρόθεση να καλύψει όλα τα γνωστικά κενά μου επί των βιολογικών μοριακών μεθόδων. Τέλος, να ευχαριστήσω το Φοίβο Μπορμπόλη, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του ΠΒΕΑΑ για τις πολύτιμες συμβουλές του επί των βιολογικών μεθόδων και την καθημερινή βοήθειά του στη διεκπεραίωση διαφόρων εργαστηριακών πρακτικών.

Βεβαίως, οφείλω να ευχαριστήσω και τον κ. Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α΄ του ΠΒΕΑΑ, που με δέχτηκε στην ομάδα του, αλλά και ολόκληρη την ομάδα για τη βοήθεια σε επιμέρους καθημερινά πράγματα εντός του εργαστηρίου. Ειδική μνεία, στους Βαγγέλη Μπόνη και Ελένη Βασιλάκη για τη βοήθεια στην διεξαγωγή των μοριακών μεθόδων PCR.

Βασιλική Καραμπουτζάκη,

Αθήνα 2019

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια η θεραπεία του καρκίνου προσανατολίζεται στη επιλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είτε για τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είτε για την αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Για τον σκοπό αυτό, παραδοσιακά προκρίνεται η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς και εξειδίκευσής τους στην αναγνώριση και πρόσδεση επί του στόχου τους, συνήθως ενός υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επιλεκτικής στόχευσης του πρωτεϊνικού υποδοχέα ErbB2 της οικογένειας των Επιδερμικών Παραγόντων Ανάπτυξης (EGF), με την χρήση ενός σχετικά νέου είδους τεχνητά επιλεγμένων νουκλεϊκών οξέων, των απταμερών, τα οποία επιδεικνύουν ιδιότητες αντίστοιχες με εκείνες των αντισωμάτων με σημαντικά όμως πλεονεκτήματα έναντι των τελευταίων. Προς αυτή την κατεύθυνση, μελετήθηκαν πέντε διαφορετικά αλληλουχίες απταμερών ως προς την στόχευση του HER2 τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν τον συγκεκριμένο υποδοχέα όσο και σε κυτταρικές σειρές με φυσιολογικά επίπεδα έκφρασής του. Πρώτα, συγκρίθηκε η στόχευση δύο ισογονιδιακών καρκινικών σειρών του μαστού, της αρνητικής ως προς την υπερέκφραση του HER2, MDA-MB-435, και της γενετικά τροποποιημένης έτσι ώστε να τον υπερεκφράζει, 435eb1, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και μη γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές οι οποίες υπερεκφράζουν τον HER2, στις οποίες περιλαμβάνονταν οι MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3, κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού, στομάχου και ωοθηκών, αντίστοιχα. Πέραν αυτών, εξετάστηκε και η κυτταρική σειρά του καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 επίσης αρνητική ως προς την υπερέκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα. Η μοριακή ανάλυση της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου του HER2 μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με την χρήση PCR και qPCR. Όσον αφορά στα απταμερή, διερευνήθηκε τόσο η πρόσδεση τους στον υποδοχέα HER2 στην πλασματική μεμβράνη όσο και η ενδοκυττάρωσή τους, ενώ η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Ακολούθως, τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τη δομή και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν το κάθε απταμερές, αποκαλύπτοντας τη μεγάλη σημασία της δευτεροταγούς και τριτοταγούς διαμόρφωσης που αποκτούν τα απταμερή, στην εξειδικευμένη και επιλεκτική στόχευση, αλλά και στην ενδοκυττάρωσή τους. Πρωτίστως όμως, μέσα από αυτή την εργασία, αναδείχθηκε η επιτακτική ανάγκη περαιτέρω και εις

βάθος μελέτης των απταμερών όσον αφορά στην επιλογή τους, αλλά και την διαμόρφωση που λαμβάνουν στον χώρο κατά την πρόσδεσή τους στον μόριο στόχο. Η βαθύτερη κατανόηση και βελτιστοποίηση της δομής τους θα επιτρέψει να προκύψουν ακριβή και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα των ικανοτήτων τους ως προς την εξειδικευμένη στόχευση και να αποφευχθούν επιφανειακές προσεγγίσεις και πρακτικές που οδηγούν σε περιορισμό της εξειδικευμένης δράσης των απταμερών, μη αναγνωρίζοντας έτσι τις ουσιαστικές δυνατότητές τους ως μέσα θεραπείας.

Abstract

Nowadays, targeted cancer therapy through selective transmembrane protein targeting has been the principal practice for chemotherapeutic drugs administration and inhibition of tumor regulating pathways. Towards this goal, conventional methods employ monoclonal antibodies as targeting ligands of membrane receptor proteins, taking advantage of the high specificity and binding affinity of the former towards their target. Aptamers, on the other hand, are emerging as a new targeting ligand in cancer therapy, which consist of nucleic acids with selectivity and specificity comparable to conventional monoclonal antibodies. In this study, the selectivity and specificity of five different DNA aptamers, selected against the ErbB2 receptor of the Epidermal Growth Factor family (EGF), were investigated by employing HER2 overexpressing cancer cell lines along with cancer cell lines with normal expression levels of this transmembrane protein. Firstly, a comparative study into the binding of these aptamers to two isogenic cancer cell lines, the HER2 negative MDA-MB-435 and the genetically modified HER2 overexpressing 435eb1 took place, while, later on, the binding of the same aptamers to the naturally overexpressing cancer cell lines MDA-MB-453, NCI-N87 and SKOV-3 (breast, gastric and ovarian cancer respectively) was also undertaken. MDA-MB-231 breast cancer cell line that exhibits normal HER2 expression levels was also examined as a control. Molecular biology techniques, such as PCR and qPCR were employed to determine the levels of HER2 expression among the different cell lines. Further to this, the aptamers under investigation were examined both as to their capacity to bind to the plasma membrane receptor as well as to their ability to induce internalization with the use of fluorescence microscopy. The results were analyzed in terms of the 2D and 3D structures and thermodynamic properties of the aptamers, highlighting the importance of the conformation that the aptamer adopts upon target recognition and its impact on the selectivity and endocytosis of the aforementioned. Above all, this study stresses the need for the in-depth investigation into aptamer structural conformation, in order to improve on its selectivity, and endocytosis potential and ability to regulate gene expression through their interference with intracellular pathways. Such studies become imperative to overcome the sub-optimal performance of aptamers thus allowing the latter to realize their full potential as ligands for selective drug delivery and gene expression in cancer treatment.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	10
2. Θεωρητικό υπόβαθρο.....	12
2.1. Υποδοχέας HER2	12
2.1.1. Δομή	13
2.1.2. Λειτουργία των υποδοχέων	15
2.1.3. Διμερισμός υποδοχέα HER2	16
2.1.3.1. HER2 – HER1 διμερές.....	17
2.1.3.2. HER2 – HER2 διμερές.....	17
2.1.3.3. HER2 – HER3 διμερές.....	17
2.1.3.4. HER2 – HER4 διμερές.....	18
2.1.4. Δράση της κινάσης της τυροσίνης.....	18
2.1.5. Σηματοδοτικά μονοπάτια	19
2.2. Στόχευση	21
2.2.1. Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων	21
2.2.2. Πλεονεκτήματα απταμερών	23
2.2.3. Επιλογή απταμερών – SELEX	24
2.2.4. Εφαρμογές απταμερών στον καρκίνο.....	25
2.2.4.1. Απεικόνιση.....	26
2.2.4.2. Θεραπεία	26
2.2.4.3. Βιοαισθητήρες	27
3. Μεθοδολογική προσέγγιση.....	28
3.1. Βασική ιδέα.....	28
3.2. Μελέτη γενετικά τροποποιημένης κυτταροσειράς στον HER2	28
3.2.1. Κυτταρική σειρά MDA–MB–435	29
3.2.2. Κυτταρική σειρά 435eb1	29
3.2.3. Μετασχηματισμός γενετικού υλικού	30
3.2.4. Μελέτη έκφρασης HER2 στην κυτταροσειρά 435eb1	32
3.2.4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	32
<i>Μετουσίωση (Denaturation)</i>	33
<i>Υβριδοποίηση</i>	33
<i>Εκκινητές (Primers)</i>	34
<i>Πολυμεράση Taq</i>	34
<i>Επιμήκυνση</i>	34
3.2.4.2. PCR για την ανίχνευση του πλασμιδίου	35

3.2.4.3.	Ηλεκτροφόρηση gel αгарόζης.....	35
3.2.4.4.	qPCR.....	38
3.3.	Μελέτη φυσικά υπερεκφραζόμενων σειρών στον HER2	39
3.3.1.	Κυτταρική σειρά MDA–MB–453	39
3.3.2.	Κυτταρική σειρά NCI–N87	40
3.3.3.	Κυτταρική σειρά SK–OV–3.....	41
3.4.	Μελέτη μη υπερεκφραζόμενης σειράς στον υποδοχέα HER2	42
3.5.	Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	43
3.6.	Αптаμερή	44
3.6.1.	Αптаμερές Α.....	45
3.6.2.	Αптаμερές Αt.....	45
3.6.3.	Αптаμερές Β	46
3.6.4.	Αптаμερές Γ	46
3.6.5.	Αптаμερές Δ	47
3.7.	Απεικόνιση των κυττάρων.....	47
4.	Πειραματική διαδικασία	49
4.1.	Υλικά.....	49
4.2.	Μέθοδοι.....	50
4.2.1.	Κυτταροκαλλιέργεια	50
4.2.2.	Μέτρηση κυττάρων	50
4.2.3.	Στόχευση κυττάρων με απταμερή.....	53
4.2.3.1.	Σειρές MDA–MB–435 και 435eb1	53
4.2.3.2.	Βελτιστοποίηση των συνθηκών στόχευσης	53
4.2.3.3.	PCR στις σειρές MDA–MB–435 και 435eb1	55
4.2.3.4.	qPCR στις σειρές MDA–MB–435 και 435eb1	56
4.2.3.5.	Σειρές NCI–N87 και MDA–MB–231	58
4.2.3.6.	Μελέτη επιφανειακής πρόσδεσης απταμερών	58
4.2.3.7.	Μελέτη ενδοκυττάρωσης των απταμερών	59
5.	Αποτελέσματα	60
5.1.	Συγκριτική στόχευση κυττάρων 435 και 435eb1	60
5.2.	Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών στόχευσης	62
5.3.	Εντοπισμός γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη.....	64
5.4.	Ποσοτική έκφραση του HER2 στα κύτταρα 435 και 435eb1	65
5.5.	Συγκριτική στόχευση σειρών 435, 435eb1, 231 και N87.....	65
5.6.	Ποσοτική έκφραση του HER2 στις φυσικά υπερεκφραζόμενες σειρές.....	68
5.7.	Στόχευση φυσικά υπερεκφραζόμενων και μη κυτταρικών σειρών	69

5.7.1.	Επιφανειακή πρόσδεση απταμερών.....	69
5.7.2.	Μελέτη ενδοκυττάρωσης των απταμερών	75
5.7.3.	Ποσοτικοποίηση σήματος	80
6.	Συζήτηση.....	83
7.	Μελλοντικοί στόχοι	92
8.	Παράρτημα.....	95
9.	Βιβλιογραφία	99

1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με την αναφορά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, World Health Organization) για τις ασθένειες που δημοσιεύτηκε το 2018, ο καρκίνος αποτελεί την τρίτη σε σειρά αιτία θανάτου παγκοσμίως με ποσοστό θνησιμότητας 16%, αμέσως μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις στην πρώτη θέση και τις μεταδοτικές ασθένειες στην δεύτερη (δεδομένα 2016).¹ Στην Ελλάδα, σύμφωνα με την παραπάνω αναφορά, ο καρκίνος ανέρχεται στη δεύτερη θέση με ποσοστό θνησιμότητας 26%,¹ ενώ στην ίδια θέση κατατάσσεται και σε ολόκληρη την Ευρώπη (δεδομένα 2016).²

Καταγράφοντας τόσα περιστατικά παγκοσμίως, η αντιμετώπιση και οι μέθοδοι θεραπείας των κακοηθών νεοπλασιών έρχονται στο προσκήνιο, με το ενδιαφέρον να επικεντρώνεται στη βελτιστοποίησή τους προς όφελος του ασθενή. Οι συμβατικές θεραπείες περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακτινοβολίες, ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία, με τις δύο τελευταίες να χρησιμοποιούνται και σε περιπτώσεις μεταστατικών καρκίνων, ενώ οι πρώτες μόνο σε τοπικούς όγκους.^{3,4} Ο μηχανισμός δράσης των χημειοθεραπειών βασίζεται στην αναστολή της διαίρεσης των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, όπως τα καρκινικά.³ Ωστόσο, έτσι καταλήγουν να προσβάλλονται και φυσιολογικά κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, όπως για παράδειγμα οι θύλακες των τριχών, ο μυελός των οστών και τα κύτταρα της γαστρεντερικής οδού.³ Έτσι, λόγω της πρόκλησης πληθώρας παρενεργειών^{5,6} και τη γονιδιακή θεραπεία να βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο ερευνών,⁷⁻⁹ οι νέες τεχνολογίες προσανατολίζονται στην στόχευση των καρκινικών κυττάρων τόσο για τη χορήγηση φαρμάκων¹⁰ όσο και για την αναστολή ανάπτυξης των όγκων μέσω της παρεμπόδισης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών.^{11,12}

Τέσσερα από τα συνηθέστερα μονοπάτια που συμβάλλουν στην ογκογένεση, τα RTK–RAS–RAF, PI3K–AKT–mTOR, p53 και ο κυτταρικός κύκλος, έχει βρεθεί ότι υφίστανται μεταλλάξεις στα περισσότερα είδη καρκινογένεσης.¹³ Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι RTK–RAS–RAF φάνηκε να μεταλλάσσεται σε περίπου το 50% των καρκίνων,¹³ μετατρέποντας τα διάφορα επιμέρους τμήματα/μέλη αυτής της οδού σε υποψήφιους στόχους θεραπείας. Όπως έχει αναφερθεί, το σήμα του mTOR απορρυθμίζεται σε ποσοστό 30% των καρκίνων, επηρεάζοντας κυτταρικές δραστηριότητες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και η πρωτεϊνοσύνθεση.¹⁴

Ο πρωτεϊνικός υποδοχέας HER2 που ενεργοποιεί τη δράση της κινάσης της τυροσίνης, μέλος τόσο του σηματοδοτικού μονοπατιού RTK–RAS–RAF¹³ όσο και του mTOR¹⁴, συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον στις εφαρμογές στόχευσης. Με τον υποδοχέα HER2 να υπερεκφράζεται σε αρκετά είδη καρκίνων όπως μαστού, στομάχου, οισοφάγου, ωθηκών, ενδομητρίου και εντέρου^{15,16} δίνεται η δυνατότητα ρύθμισης και αναστολής των μονοπατιών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Οι εγκεκριμένες μέχρι τώρα θεραπείες στόχευσης του HER2 περιλαμβάνουν τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων trastuzumab και pertuzumab, αλλά και τους αναστολείς (inhibitors) της κινάσης της τυροσίνης afatinib, lapatinib, neratinib και dacomitinib.¹³

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετάται η στόχευση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση μιας σχετικά νέας κατηγορίας βιομορίων, των απταμερών, τα οποία αναγνωρίζουν το στόχο με υψηλή εκλεκτικότητα και εξειδίκευση (high selectivity, high specificity), καθιστώντας τα ικανά να συγκριθούν με τη δράση των αντισωμάτων.^{17,18} Τα απταμερή ανακαλύφθηκαν το 1990 με την ανάπτυξη της μεθόδου SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment),¹⁹ ενώ μέχρι σήμερα πολλά έχουν φτάσει σε κλινικές δοκιμές και ένα κυκλοφορεί από το 2004 ως εμπορικό σκεύασμα υπό την ονομασία Macugen.^{20,21} Σε αυτό το πλαίσιο κρίνεται στρατηγικής σημασίας η μελέτη των απταμερών για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εργαλείων ενάντια στον καρκίνο.

Πιο συγκεκριμένα, στόχος αυτής της εργασίας είναι η βαθύτερη κατανόηση της λειτουργίας των απταμερών ως οδηγών στόχευσης καρκινικών κυττάρων μέσα από τη συγκριτική μελέτη της εξειδίκευσής τους στην αναγνώριση του υποδοχέα HER2, κοινού βιολογικού δείκτη στην ανάπτυξη πολλών νεοπλασιών.

2. Θεωρητικό υπόβαθρο

2.1. Υποδοχέας HER2

Η κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου μέσω των μοριακά στοχευμένων θεραπειών βασίζεται στην εύρεση των κατάλληλων βιοδεικτών (biomarkers) που θα αποτελέσουν τα μόρια-στόχους.²² Σε αυτό το πλαίσιο, η εύρεση ενός καρκινικού βιολογικού δείκτη πρέπει να επαφίεται αφενός στη συσχέτιση με βασικά παρεκκλίνοντα μονοπάτια που κατέχουν θέση “κλειδί” στην ανάπτυξη και αφετέρου, στη θεραπεία της ασθένειας.²² Σύμφωνα με τον ορισμό του WHO, ένας βιοδείκτης είναι οποιαδήποτε ουσία, δομή ή διαδικασία, η οποία μπορεί να μετρηθεί στο σώμα η ίδια ή τα προϊόντα αυτής και δύναται να επηρεάσει ή να προβλέψει την εμφάνιση μιας ασθένειας.²³ Πιο συγκεκριμένα, σε κλινικό επίπεδο ένας καρκινικός δείκτης μπορεί να μετρήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε ένα συγκεκριμένο ιστό ή τον κίνδυνο προόδου της ασθένειας ή, τέλος, την πιθανή αντίδραση στη θεραπεία.²²

Ο υποδοχέας HER2 έχει σημαντική θέση στην ανάπτυξη διαφορετικών καρκίνων όπως του στομάχου, των ωοθηκών, του προστάτη και με κυριότερο αυτόν του μαστού,^{24,25} συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της έρευνας πάνω στη μελέτη της δομής του και των διάφορων μονοπατιών που σηματοδοτεί η ενεργοποίησή του. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης – υποδοχέα HER2 οφείλεται είτε στον πολλαπλασιασμό του HER2 γονιδίου εντός του κυττάρου^{24,26–28} οπότε με την δημιουργία πολλών αντιγράφων του ίδιου γονιδίου θα εκφράζεται πολλές φορές η ίδια πρωτεΐνη, είτε σε μετάλλαξη που έχει υποστεί το HER2 γονίδιο,^{27,29} εκφράζοντας έτσι την πρωτεΐνη ανεξέλεγκτα.

Οι καρκίνοι του υποτύπου HER2(+) χαρακτηρίζονται από άκρως επιθετική συμπεριφορά και απαντώνται σε διάφορους τύπου καρκίνου, ενώ έχουν ταυτιστεί με τον καρκίνο του μαστού (20 – 30%^{24–29} είναι HER2+), στον οποίο οδηγούν σε μη ακριβή πρόγνωση της ασθένειας^{24,27,28,30} λόγω της φύσης του συγκεκριμένου υποτύπου, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά την επιλογή κατάλληλης θεραπείας και συμβάλλει στην ταχύτερη επιδείνωση της υγείας του ασθενούς. Ακόμη, σημαντικό ποσοστό υπερέκφρασης του HER2 αναφέρεται και σε 20–30% των γαστρικών καρκίνων, συνιστώντας ένα πολύ σημαντικό βιολογικό δείκτη για τη θεραπεία τους.³¹ Βέβαια, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 εντοπίζεται και σε άλλους καρκίνους, όπως σε 2–45% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), 4–21% των σιελογόνων αδένων, 5–

19% των ωοθηκών, 2–85% του παγκρέατος, 11–73% του ενδομητρίου, 15–39% του οισοφάγου και 2–11% του εντέρου.^{16,32} Όπως γίνεται αντιληπτό, η υψηλή συχνότητα υπερέκφρασης του HER2 σε πολλούς τύπους καρκίνου, καθιστά απαραίτητη τη στόχευση αυτής της πρωτεΐνης.

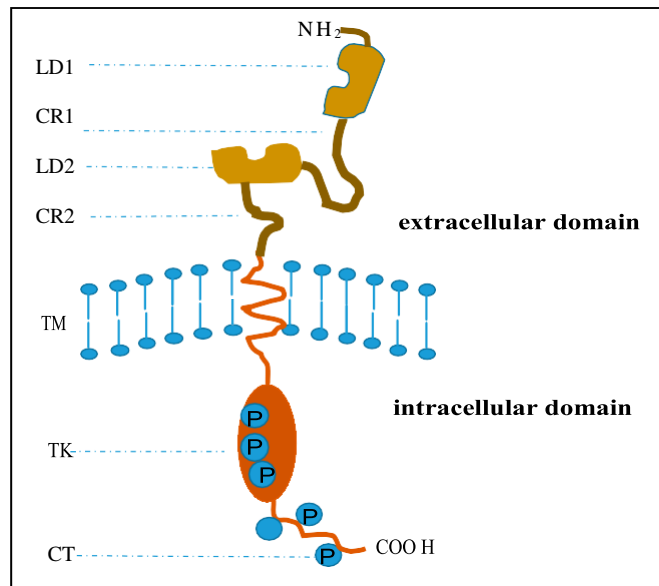
Ο υποδοχέας HER2 (ή ErbB2) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 185 kDa^{24,25,28} που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών ErbB (Erythroblastosis oncogene B – Ογκογονίδιο ερυθροβλάστωσης B)^{25,29} ή γνωστών και ως EGF (Epidermal Growth Factor – Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα) υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει συνολικά τους εξής τέσσερις υποδοχείς: EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ή ErbB1 ή HER1, ErbB2 ή HER2, ErbB3 ή HER3 και ErbB4 ή HER4.^{25,28,29,33,34} Οι τέσσερις αυτές πρωτεΐνες αποτελούν τους επιθηλιακούς²⁶ υποδοχείς της κινάσης της τυροσίνης³⁴ (tyrosine kinase receptors) και ο ρόλος τους είναι –μέσω της φωσφορυλίωσης της κινάσης³⁵ – να ενεργοποιούν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία καθορίζουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μετάσταση και την διαφοροποίηση του κυττάρου.²⁴

2.1.1. Δομή

Η δομή των HER υποδοχέων διακρίνεται σε τρεις βασικές περιοχές:

- A.** μια περιοχή που βρίσκεται εκτός του κυττάρου όπου γίνεται η πρόσδεση του συνδέτη (ligand) και το άκρο της αποτελεί μια αμινομάδα ($-NH_2$),
- B.** μια ενιαία διαμεμβρανικά επεκτεινόμενη περιοχή, αποτελούμενη από περίπου 19–25 αμινοξέα,^{29,34} και τέλος
- Γ.** την ~550 αμινοξέων²⁹ περιοχή της κινάσης της τυροσίνης που βρίσκεται εντός του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα.^{24,27,34,35}

Μια γενική εικόνα της δομής των ErbB πρωτεϊνών δίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2.1).²⁴



Σχήμα 2.1: Βασική δομή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της οικογενείας ErbB υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης.²⁴

Την εξωκυτταρική περιοχή (Α) συνιστούν τέσσερα επιμέρους τμήματα:

- δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές πρόσδεσης του συνδέτη, (LD1) και (LD2), οι οποίες είναι πλούσιες σε λευκίνη²⁹ και υπεύθυνες για την αναγνώριση του συνδέτη,^{24,35} και
- δύο αλληλουχίες πλούσιες σε κυστεΐνη, (CR1) και (CR2), που με τη σειρά τους παρέχουν ένα πλαίσιο προσανατολισμού για τις περιοχές πρόσδεσης (LD1) και (LD2)²⁴, και συμμετέχουν στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών.^{29,35}

Η ενδοκυτταρική περιοχή (Γ) διακρίνεται σε τρία επιμέρους τμήματα:

- την ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα που εφάπτεται στην πλασματική μεμβράνη (juxtamembrane domain),^{34,36}
- την καταλυτική περιοχή της κινάσης της τυροσίνης, η οποία περιλαμβάνει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης, και
- το άκρο του υποδοχέα που τελειώνει σε μία καρβοξυλομάδα ($-COOH$).²⁴

Στο εξής, οι περιοχές LD1, CR1, LD2 και CR2 θα αναφέρονται ως περιοχές I, II, III και IV, αντίστοιχα.

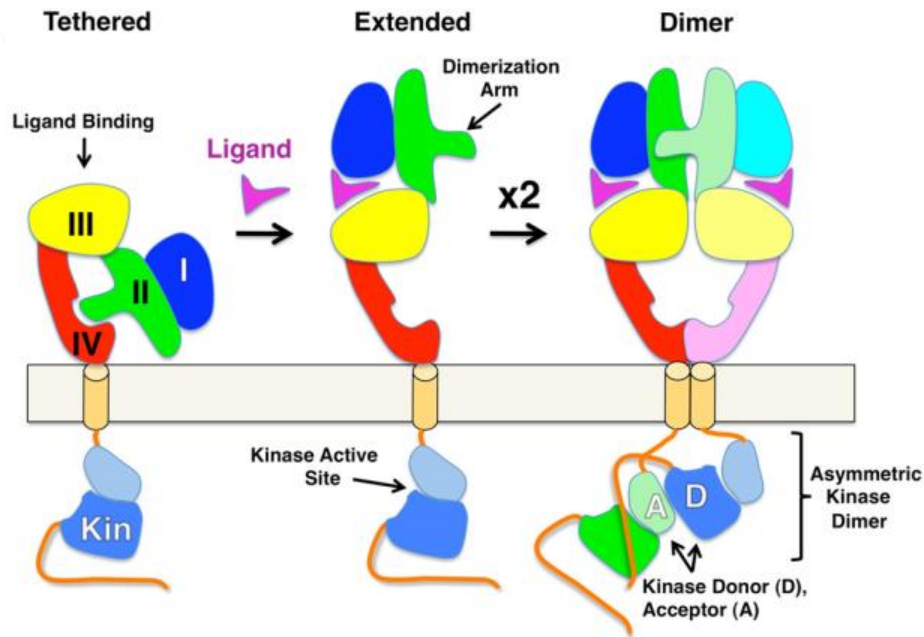
Μεταξύ των τεσσάρων υποδοχέων ErbB1 – ErbB4 παρατηρείται σημαντική ομοιογένεια όσον αφορά στην ενδοκυττάρια περιοχή τους που έχει τον ρόλο της κινάσης

της τυροσίνης (με το ποσοστό ομοιότητας να φτάνει σε τιμές 59–81%), ενώ αντίθετα το καρβοξυλικό άκρο παρουσιάζει μεγάλες διαφορές (με το ποσοστό ομοιότητας να κυμαίνεται από 11 έως 25%).³⁴

2.1.2. Λειτουργία των υποδοχέων

Το δίκτυο των ErbB/HER υποδοχέων είναι αρκετά πολύπλοκο²⁷, με την πρόσδεση των κατάλληλων συνδετών σε κάθε θέση να προωθεί το διμερισμό των πρωτεϊνών/υποδοχέων είτε με έναν άλλον ταυτόσημο υποδοχέα είτε με έναν άλλον από την ίδια οικογένεια.^{24,27} Στη δημιουργία των όμο- και έτερο- διμερών συμμετέχει η περιοχή II του εξωκυτταρικού τμήματος των υποδοχέων μέσω της διαμόρφωσης ενός βρόχου (loop), σχηματίζοντας έτσι ένα προεξέχον άκρο στον υποδοχέα.^{29,35,37,38} Μετά το διμερισμό, ενεργοποιείται η κινάση της τυροσίνης που βρίσκεται ενδοκυτταρικά και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την αυτο-φωσφορύλιωση συγκεκριμένων αποθεμάτων τυροσίνης.²⁴

Ο σχηματισμός του διμερούς οφείλεται αποκλειστικά στη διαμόρφωση που λαμβάνει το ίδιο το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα μετά την πρόσδεση του κατάλληλου συνδέτη.³⁸ Μέσα από τη μελέτη των κρυσταλλικών δομών, έχει παρατηρηθεί πως το εξωκυτταρικό τμήμα λαμβάνει δύο κύριες διαμορφώσεις.³⁸ Η πρώτη χαρακτηρίζεται από μια ανοιχτή – εκτεταμένη μορφή, την οποία λαμβάνει κατά το σχηματισμό ενός διμερούς, ενώ η δεύτερη συνιστά μια πιο κλειστή – παρεμποδιζόμενη διαμόρφωση, στην οποία η περιοχή II (που συμβάλλει στο διμερισμό) έχει αποκλειστεί εντός της δομής του μονομερούς και δεν επιτρέπει την δημιουργία διμερών,³⁸ όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.2:³⁹



Σχήμα 2.2: Μοντέλο των διαμορφώσεων που λαμβάνουν οι ErbB υποδοχείς όντας μονομερή (αριστερά), αλλά και κατά το διμερισμό τους (δεξιά).³⁹

Η αυστηρή θεώρηση πως ο υποδοχέας λαμβάνει μόνο δύο κύριες διαμορφώσεις βασίζεται στους ισχυρούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των περιοχών I και III και αντιστοίχως των II και IV, σχηματίζοντας μια αδιάσπαστη μονάδα στην εκάστοτε περίπτωση.³⁸ Έτσι, το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα λαμβάνει την καθεμία από τις δύο διαμορφώσεις, ώστε να συντάσσεται με τις δύο αυτές ισχυρές αλληλεπιδράσεις.³⁸ Κατά την πρόσδεση του συνδέτη, οι περιοχές I και II περιστρέφονται, διαγράφοντας μία γωνία περίπου 130° ως προς τις περιοχές III και IV, και με αυτόν τον τρόπο προκύπτει η εκτεταμένη διαμόρφωση.³⁸ Το σχηματιζόμενο διμερές αποτελείται από δύο εκτεταμένους υποδοχείς, ενωμένους με τέτοιο τρόπο ώστε οι συνδέτες (ligands) να βρίσκονται αντιδιαμετρικά (“back-to-back”, βλ. Σχήμα 2.2).

2.1.3. Διμερισμός υποδοχέα HER2

Ο υποδοχέας HER2 δεν έχει κάποιο γνωστό συνδέτη,^{25,26,28,35} αλλά αποτελεί το πιο σύνηθες μόριο για διμερισμό,²⁹ καθώς μετά την ενεργοποίησή του παρουσιάζει ισχυρή καταλυτική δράση της κινάσης της τυροσίνης, πράγμα που ορίζει τα διμερή που εμπεριέχουν τον υποδοχέα HER2 ως πιο σημαντικά στον καθορισμό των κυτταρικών διαδικασιών.²⁴ Το σχηματιζόμενο ετεροδιμερές από τους HER2 και HER3 υποδοχείς

αποτελεί το πιο ενεργό σηματοδοτικό σύμπλοκο, σε σχέση με τα άλλα ζευγάρια υποδοχέων της EGF οικογένειας.^{24,29,40}

Με βάση τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα HER2 τόσο σε ποντίκια όσο και σε βακτηριακά συντεθιμένη HER2 πρωτεΐνη, ο υποδοχέας φάνηκε να λαμβάνει την εκτεταμένη διαμόρφωση χωρίς να προηγείται η πρόσδεση κάποιου συνδέτη, γεγονός που τον ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους ErbB υποδοχείς.³⁸

2.1.3.1. HER2 – HER1 διμερές

Για τον σχηματισμό του πρωτεϊνικού διμερούς HER2–HER1, πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας HER1 μέσω του κατάλληλου συνδέτη. Οι προτιμώμενοι συνδέτες του HER1 είναι αυξητικοί παράγοντες όπως ο EGF, ο συνδεόμενος με ηπαρίνη EGF (heparin binding EGF), η αμφιεγκιουλίνη (amphiregulin – AREG)³⁵, η β–cellulin, η επιρεγκιουλίνη (epiregulin–EPG)³⁴ και ο TGF–α (Transforming Growth Factor Alpha – Αυξητικός Παράγοντας Μετασχηματισμού Α).²⁸ Ο υποδοχέας HER1 σταθεροποιεί τη δομή του στο χώρο μετά το σχηματισμό του ετεροδιμερούς με τον HER2, σύμπλοκο το οποίο παρουσιάζει υψηλή σηματοδοτική ενεργότητα, όπως αυτή στην περίπτωση σχηματισμού του HER2–HER3.³⁴

2.1.3.2. HER2 – HER2 διμερές

Έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 οδηγεί στον σχηματισμό ομοδιμερούς, κάτι το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες κρίνεται απίθανο να συμβεί εφόσον αυτός ο υποδοχέας δεν διαθέτει κάποιο συνδέτη για να ενεργοποιηθεί.^{25,27,29}

2.1.3.3. HER2 – HER3 διμερές

Ο υποδοχέας HER3 διαθέτει συνδέτες που τον ενεργοποιούν, αλλά είναι ανενεργός ως προς την κίνηση της τυροσίνης.^{25,27} Έτσι, πρέπει αυτός ο υποδοχέας να σχηματίσει απαραίτητα ετεροδιμερές, ώστε να ξεκινήσουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς τα ομοδιμερή του είναι ανενεργά.³⁴ Βιβλιογραφικά, αναφέρεται πως ενεργοποιείται από τους αυξητικούς παράγοντες ερεγκιουλίνη (heregulin – HRG) ή

νευρεγκιουλίνη 1 και 2 (neuregulins – NRG 1, 2).^{26,28,34} Όπως προαναφέρθηκε, το σχηματιζόμενο διμερές HER2–HER3 αποτελεί ένα πολύ ενεργό σηματοδοτικά σύμπλοκο,²⁶ και παράλληλα η δημιουργία του ευνοείται λόγω μιας αξιοσημείωτης ιδιότητας του HER3. Ο υποδοχέας HER3 μπορεί να φωσφορυλιώνεται και να ανακυκλώνεται συνεχώς από τους υπερεκφραζόμενους και πολλαπλάσιους σε αριθμό υποδοχείς HER2, επειδή δεν υπόκειται σε ενδολυσosomal αποικοδόμηση (endolysosomal degradation) εντός του κυττάρου.³⁴ Έτσι, μπορεί να συμμετέχει αδιάκοπα στις λειτουργίες και μετασχηματισμούς του κυττάρου.³⁴

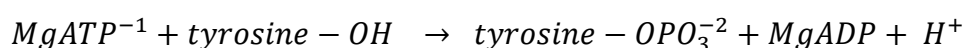
2.1.3.4. HER2 – HER4 διμερές

Οι συνδέτες που ενεργοποιούν τον HER4 υποδοχέα ταυτίζονται με αυτούς του HER3²⁸ και πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνουν τους αυξητικούς παράγοντες EGF και τις β-cellulin (β-CEL), επιρεγκιουλίνη (epiregulin – EPG) και νευρεγκιουλίνες 1–4 (NRG 1–4).³⁴

2.1.4. Δράση της κινάσης της τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον καθορισμό πολλών λειτουργιών του κυττάρου, ούσες ένζυμα που καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, την αναδιάρθρωση του κυτταροσκελετού, αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και τις διαδικασίες μεταγραφής και μετάφρασης.²⁹ Η απορρύθμιση της δράσης των κινασών οδηγεί σε σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης και σε διαταραχές του ανοσοποιητικού, καρδιαγγειακού και νευρικού συστήματος.²⁹

Η οικογένεια των κινασών της τυροσίνης αποτελείται από 90 είδη πρωτεϊνών, με τα 58 από αυτά να ορίζονται ως υποδοχείς,³⁴ ενώ το σύνολο των ανθρώπινων πρωτεϊνικών κινασών φτάνει τις 500.²⁹ Η κινάση της τυροσίνης καταλύει την φωσφορυλίωση της ομώνυμης πρωτεΐνης, με την εξής αντίδραση²⁹:



Όπως φαίνεται από την παραπάνω χημική εξίσωση, στην καταλυτική αντίδραση φωσφορυλίωσης της τυροσίνης συμμετέχει η τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine trisphosphate, ATP). Την ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται στις βιολογικές αντιδράσεις

συνήθως καλύπτει η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη διάσπαση των δεσμών φωσφοανυδρίτη, όπως αυτοί που εμπεριέχονται στην ATP, το γνωστό χημικό ενδιάμεσο που συνδέει τις ενεργοβόρες κυτταρικές διαδικασίες με αυτές που απελευθερώνουν ενέργεια.⁴¹

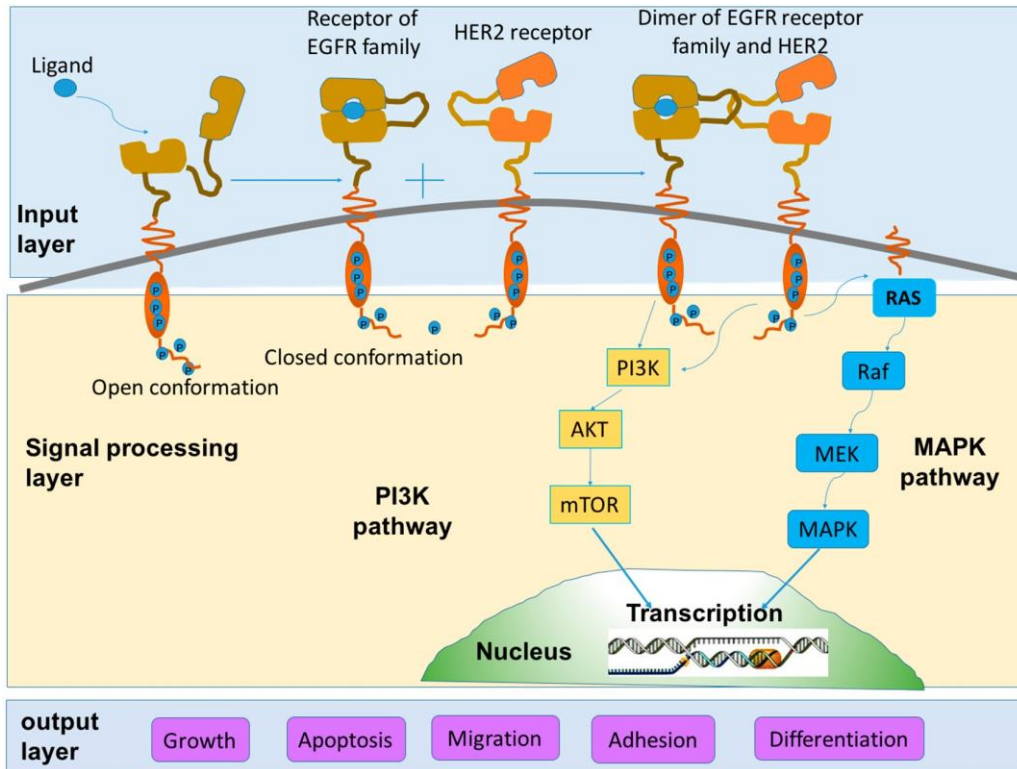


2.1.5. Σηματοδοτικά μονοπάτια

Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης με τη σειρά της ενεργοποιεί πρωτεΐνες ή ένζυμα, έτσι ώστε να ξεκινήσουν μια διαδοχική σειρά σηματοδοτικών αλληλουχιών (signaling cascades) που ρυθμίζουν τις λειτουργίες του κυττάρου.²⁴ Δύο τέτοια μονοπάτια είναι τα ακόλουθα:^{24–26,28}

- το μονοπάτι της κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (PI3K, phosphatidyl inositol 3 – kinase), με αλληλουχία PI3K/AKT/mTOR,⁴²
- το μονοπάτι Ras/Raf/ενεργοποιημένης με μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (Ras/Raf/MAPK, Rat sarcoma/Rat fibrosarcoma/Mitogen Activated Protein Kinase).

Διαφορετικοί συνδυασμοί διμερισμού μεταξύ των υποδοχέων, προάγουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια.²⁴ Η οδός PI3K ενεργοποιείται από το ετεροδιμερές HER2/HER3, ενώ η Ras/Raf/MAPK προάγεται από το σήμα όλων των διμερών που εμπεριέχουν το HER2 υποδοχέα (HER1–HER2, HER2–HER2, HER3–HER2, HER4–HER2).²⁴ Τα PI3K και MAPK είναι τα δύο πιο πολύ–μελετημένα σηματοδοτικά μονοπάτια που ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αναστολής της κυτταρικής απόπτωσης.^{24,25} Πιο συγκεκριμένα, το PI3K/AKT/mTOR μονοπάτι αφορά στην επιβίωση του κυττάρου και το Ras/MAPK στον πολλαπλασιασμό.²⁶ Οι κινάσες φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 (PI3Ks) είναι μέλη μιας οικογένειας ενδοκυτταρικών κινασών, οι οποίες φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα της θέσης 3 (3'–OH) των φωσφοϊνοσιτιδίων (phosphoinositides).³⁴ Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στο κάτωθι σχήμα (Σχήμα 2.2):²⁴



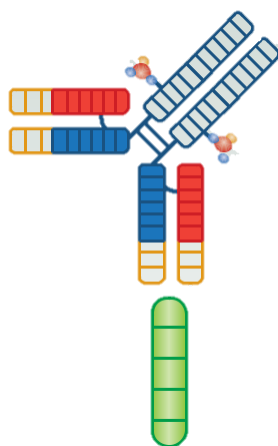
Σχήμα 2.2: Αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν μετά την πρόσδεση του συνδέτη στον EGF υποδοχέα και το σχηματισμό πρωτεϊνικού διμερούς μεταξύ του πρώτου και του HER2.²⁴

Πέρα από τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται, οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα που λαμβάνουν σήμα από τη φωσφορυλίωση της κινάσης της τυροσίνης, ενεργοποιούν και διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται πρωτεΐνες φωσφατάσης, όπως η φωσφατάση της τυροσίνης (PTP, Protein Tyrosine Phosphatase), η φωσφολιπάση C- γ (PLC- γ , Phospholipase C- γ)²⁶ και η κινάση C (PKC, Protein Kinase C),³⁴ πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση.

Όπως γίνεται προφανές, η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 σε καρκινικά κύτταρα ευνοεί το διμερισμό, πράγμα που συνεπάγεται την πολλαπλάσια ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης, οπότε και των σηματοδοτικών μονοπατιών, των οποίων ο κύριος ρόλος αφορά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αναστολή της απόπτωσης. Ως αποτέλεσμα, τα καρκινικά κύτταρα υπερπολλαπλασιάζονται, οδηγώντας στην ογκογένεση.

2.2. Στόχευση

Σήμερα, η στοχευμένη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου σε κλινικό επίπεδο περιλαμβάνει τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης και συμπλόκων αντισώματος–φαρμάκου (Σχήμα 2.4).^{43–45} Ωστόσο, τα αντισώματα εμφανίζουν, μεταξύ άλλων, ένα σημαντικό μειονέκτημα. Μετά τη χορήγησή τους, μπορεί να προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση και να αναπτυχθεί ανοχή των κυττάρων απέναντι στο σύμπλοκο αντισώματος–φαρμάκου.^{46,47} Έτσι, τα απαμερή, που συνιστούν μονόκλωνες ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες DNA ή RNA με τρισδιάστατες αναδιπλώσεις στο χώρο, εμφανίζονται ως υποψήφιος οδηγός στόχευσης, αφού έχουν τη δυνατότητα να προσδένονται εξειδικευμένα αναγνωρίζοντας το στόχο με ένα μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που χαρακτηρίζει την εξειδίκευση των αντισωμάτων.^{43,48}



Σχήμα 2.4: Σύμπλοκο αντισώματος – φαρμάκου προσδεδεμένο στον στόχο (πράσινο). Εικονίζεται το αντίσωμα (μορφή Y) με την κυτταροτοξική ουσία ακινητοποιημένη στην σταθερή περιοχή αυτού.⁴⁵

2.2.1. Μηχανισμός δράσης των αντισωμάτων

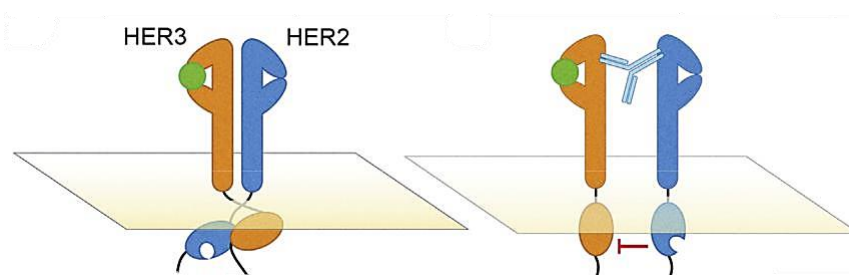
Τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα εγκεκριμένα από τον FDA (Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α.) και εφαρμοσμένα σε θεραπείες για τη στόχευση του HER2, είναι τα trastuzumab και pertuzumab.⁴⁹

Πιο αναλυτικά, το trastuzumab, το πρώτο στη σειρά αντίσωμα στη στοχευμένη θεραπεία του HER2, εγκεκριμένο το 1998,⁵⁰ αποτελεί ένα ανασυνδυασμένο εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον υποδοχέα HER2. Το αντίσωμα προσδένεται εξειδικευμένα στην περιοχή IV του εξωκυτταρικού τμήματος, η οποία βρίσκεται πολύ κοντά στην παραμεμβρανική περιοχή (juxtamembrane region).⁴⁹

Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί δράσης του trastuzumab ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, με τον πραγματικό ωστόσο να παραμένει ακόμα άγνωστος.⁴⁹ Μια ευρέως αποδεκτή θεώρηση στο πεδίο της έρευνας, είναι πως η περιοχή Fc του προσδεμένου στο καρκινικό κύτταρο αντισώματος, αναγνωρίζεται από τον Fc υποδοχέα των λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που καλούνται φυσικοί φονείς (Natural Killer cells, NK cells)⁵¹, οπότε αυτά με τη σειρά τους επιτίθενται στο καρκινικό κύτταρο.⁴⁹

Παρά τη μεγάλη σημασία εξειδικευμένη δράση του trastuzumab σε μεταστατικούς καρκίνους, ο ανθρώπινος οργανισμός εμφανίζει τόσο έμφυτη όσο και επίκτητη αντίσταση στη θεραπεία με αντισώματα, κατακρημνίζοντας το ποσοστό απόκρισης στη θεραπεία σε μόλις 50%, ενώ περίπου το 40% των ασθενών εμφανίζει πρωτογενή αντίσταση.⁴⁹ Τα αίτια της αντίστασης εντοπίζονται σε μεταβολές στη δομή του υποδοχέα HER2, οι οποίες παρεμποδίζουν την πρόσδεση του αντισώματος, ενώ σε περίπτωση παρεμπόδισης του HER2 από τη σύνδεση του trastuzumab, ευνοείται η ενεργοποίηση των υπολοίπων υποδοχέων για την αναπλήρωση του σηματοδοτικού κενού.⁴⁹

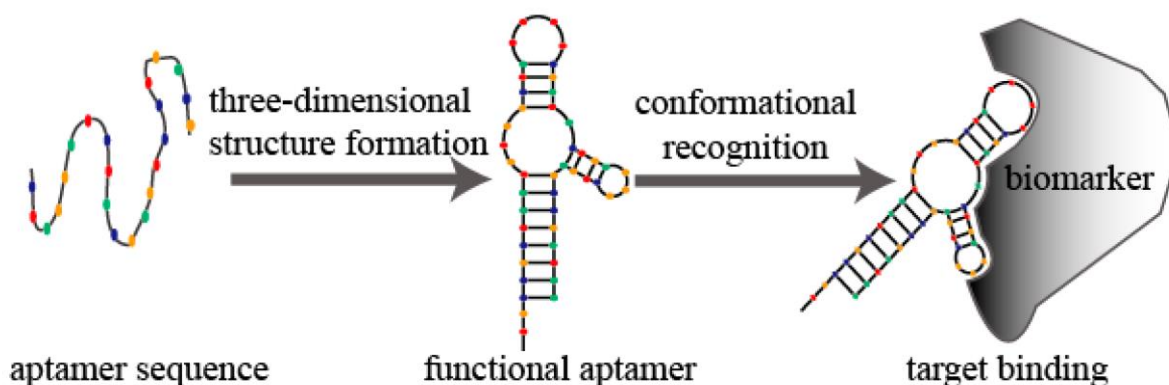
Το pertuzumab, εγκεκριμένο το 2012 από τον FDA,⁵² αποτελεί εξίσου ένα πλήρως εξανθρωποποιημένο ανασυνδυασμένο μονόκλωνο αντίσωμα, το οποίο δρα παρεμποδίζοντας το διμερισμό του υποδοχέα.⁴⁹ Πιο αναλυτικά, το αντίσωμα αλληλεπιδρά με την περιοχή II του HER2, παρεμποδίζοντας στερεοχημικά τη διαμόρφωση βρόχου που απαιτείται για την επίτευξη του διμερισμού,⁴⁹ ενώ παρουσιάζει εξειδικευμένη αναστολή του HER2–HER3 διμερισμού (Σχήμα 2.5).⁵³ Λόγω της σύντομης χρονικά πορείας που έχει διαγράψει το pertuzumab στη θεραπεία του καρκίνου, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα όσον αφορά στην ανάπτυξη αντίστασης απέναντί του.⁴⁹ Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως η συνεργιστική δράση pertuzumab και trastuzumab οδηγεί σε πιο αποτελεσματική θεραπεία του HER2+ καρκίνου του μαστού.⁵⁴ Τέλος, η Canonici et al.,⁵⁵ σε μια πρόσφατη μελέτη της, στόχευσε υπερκεφραζόμενες στον HER2 καρκινικές σειρές ταυτόχρονα με trastuzumab και pertuzumab, ενώ τα αντισώματα έφεραν πάνω τους και έναν αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης (lapatinib, afatinib, neratinib). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενισχύοντας έτσι την αντικαρκινική δράση της θεραπείας.⁵⁵



Σχήμα 2.5: Παρεμπόδιση του σχηματισμού του διμερούς HER2–HER3 μέσω της δράσης του pertuzumab.⁵³ (αριστερά: φυσιολογική σύνδεξη μονομερών, δεξιά: παρεμπόδιση)

2.2.2. Πλεονεκτήματα απταμερών

Τα απταμερή εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών αντισωμάτων με τα κυριότερα να συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1.⁵⁶ Καταρχάς, τα απταμερή μπορούν να συντεθούν και να τροποποιηθούν χημικά με μεγάλη ευκολία, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από θερμοδυναμική σταθερότητα και έλλειψη ανοσογονικότητας (immunogenicity).^{43,48} Επιπλέον, καθότι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες, είναι δυνατή η επανάκτησή της τριτοταγούς δομής τους και άρα αναγέννηση της λειτουργικότητάς τους μετά το πέρας μιας θερμικής κατεργασίας.⁴³ Η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν με υψηλή εκλεκτικότητα και εξειδίκευση τον στόχο, έχει οδηγήσει στο να αποκαλούνται “χημικά αντισώματα” (“chemical antibodies”).^{43,48,57}



Σχήμα 2.6: Αναπαράσταση της εξειδικευμένης πρόσδεσης των απταμερών στο βιοδείκτη-στόχο καρκινικών κυττάρων.⁵⁸

Σύμφωνα με τη συγκριτική μελέτη του Chen et al.⁵⁹ στην εφαρμογή απταμερών και αντισωμάτων για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου, τα απταμερή όντας 25

φορές (25–fold) μικρότερα σε μέγεθος από τα αντισώματα, μπορούν να εισέλθουν ικανοποιητικά στα κύτταρα–στόχους και να διαπεράσουν 4 φορές περισσότερο τους όγκους σε σχέση με τα αντισώματα. Ακόμη, σε *in vivo* εφαρμογές απεικόνισης των όγκων, τα απταμερή υπερέχουν σε αναλογία σήματος προς το θόρυβο του background, ενώ στη χορήγηση φαρμάκων επέδειξαν 4.3 φορές (4.3–fold) περισσότερο χρόνο διατήρησης του σήματος.⁵⁹

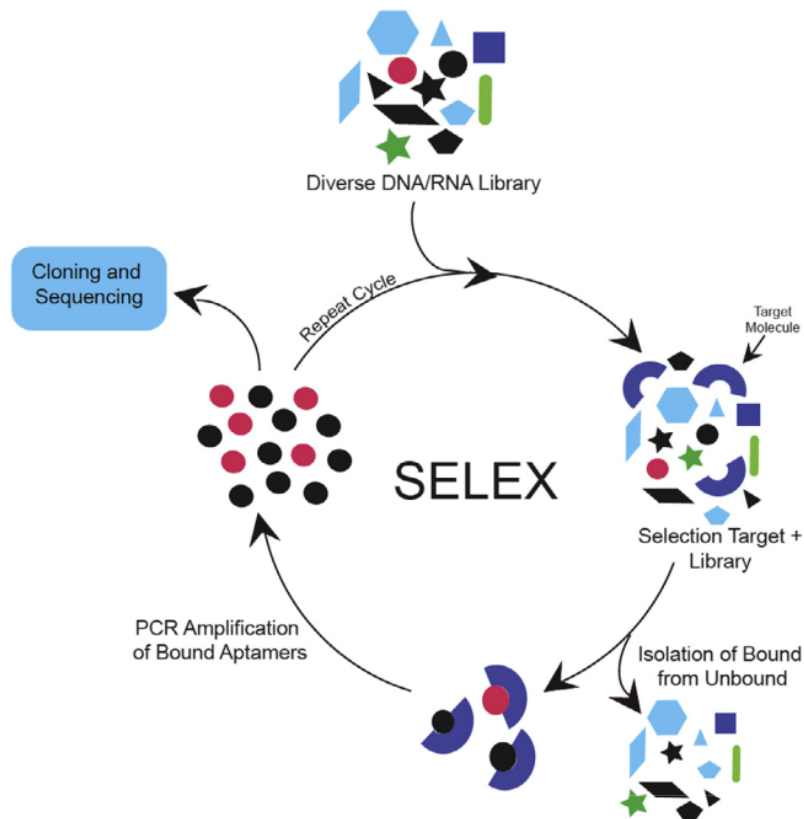
Πίνακας 2.1: Σύγκριση μεταξύ απταμερών και συμβατικών αντισωμάτων.⁵⁶

<i>Ιδιότητα</i>	<i>Απταμερές</i>	<i>Αντίσωμα</i>
Μάζα	10–25kDa	50–100kDa
Μέθοδος παραγωγής	<i>In vitro</i> επιλογή (οικονομική)	<i>In vivo</i> επιλογή (ακριβή)
Ανοσογονικότητα	Καθόλου ή ελάχιστη	Σχετικά ισχυρότερη
Χημική τροποποίηση	Εύκολη	Δύσκολη
Κόστος	Αποδοτικό (cost–effective)	Υψηλό

2.2.3. Επιλογή απταμερών – SELEX

Τα κατάλληλα απταμερή συνήθως επιλέγονται από μία μεγάλη συλλογή νουκλεϊκών οξέων (nucleic acid library) μέσω της *in vitro* διαδικασίας SELEX. Η μέθοδος περιλαμβάνει το σχεδιασμό ενός μίγματος ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών DNA ή RNA της τάξης των $10^{14} - 10^{15}$ και μήκους 15–100 νουκλεοτιδίων,⁴³ το οποίο επωάζεται με τις πρωτεΐνες–στόχους.^{48,57} Κατά την επώαση, μόνο ένα μικρό μέρος των υποψήφιων αλληλουχιών θα προσδεθεί ισχυρά στις πρωτεΐνες, οπότε οι υπόλοιπες αλληλουχίες θα διαχωριστούν από το μίγμα.⁴⁸ Έπειτα, οι εξειδικευμένα προσδεμένες αλληλουχίες απομονώνονται και πολλαπλασιάζονται μέσω της μεθόδου PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης), ώστε ακολούθως να συστήσουν μία νέα συλλογή αλληλουχιών που θα υποβληθεί σε SELEX.⁴⁸ Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για αρκετούς κύκλους με στόχο τον εμπλουτισμό των αλληλουχιών που αναγνωρίζουν και προσδέονται εξειδικευμένα στην επιθυμητή πρωτεΐνη. Στους τελευταίους κύκλους εφαρμόζονται έλεγχοι της εξειδίκευσης με την εισαγωγή ανταγωνιστικών μορίων, ενώ μειώνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης–στόχου και

αυξάνονται τα στάδια έκπλυσης.⁴⁸ Συνήθως, 8–18 κύκλοι αρκούν για την απομόνωση των εξειδικευμένων απταμερών, τα οποία στη συνέχεια κλωνοποιούνται.⁴⁸



Σχήμα 2.7: Η μέθοδος επιλογής απταμερών SELEX, επαναλαμβανόμενων κύκλων.⁶⁰

Όσον αφορά στις εφαρμογές των απταμερών στη στόχευση και θεραπεία του καρκίνου, η διαδικασία SELEX μπορεί να εφαρμοστεί με την εισαγωγή ολόκληρων κυττάρων στη θέση του στόχου (whole cell–SELEX) που εκφράζουν στην επιφάνειά τους την επιθυμητή πρωτεΐνη.⁴⁸ Βέβαια η whole cell–SELEX είναι πιο απαιτητική ως μέθοδος, και συνήθως απαιτούνται περισσότεροι κύκλοι για την επιλογή των πιο εξειδικευμένα προσδεμένων απταμερών.⁵⁷

2.2.4. Εφαρμογές απταμερών στον καρκίνο

Τα απταμερή αποτελούν βιομόρια με πολλές δυνατότητες, βρίσκοντας εφαρμογή στην απεικόνιση, τη χορήγηση φαρμάκου και τη θεραπεία νεοπλασιών, αλλά και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

2.2.4.1. Απεικόνιση

Παρουσιάζοντας υψηλότερη αναλογία φθορίζοντος σήματος προς το θόρυβο του background από αυτή των αντισωμάτων, τα απταμερή προσελκύουν το ενδιαφέρον ως ανιχνευτές απεικόνισης (imaging probes). Ωστόσο, τα απταμερή πρέπει να συμπλοκοποιηθούν με διάφορα φθορίζοντα μόρια ή νανοσωματίδια που φέρουν τις κατάλληλες ιδιότητες για την παροχή εικόνας *in vivo*, γεγονός που δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα, αφού η χημική τροποποίησή τους είναι αρκετά εύκολη.⁶¹ Η τροποποίηση παραμαγνητικών ή υπερ-παραμαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με απταμερή, μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της μελέτης των ασθενειών μέσω Απεικόνισης Μαγνητικού Συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging, MRI), εφόσον παράγει δυνατότερο σήμα και βαθύτερη διείσδυση εντός των ιστών.⁶¹

2.2.4.2. Θεραπεία

Οι κύριες πρακτικές εφαρμογές των απταμερών στην θεραπεία του καρκίνου έγκεινται είτε στην ανταγωνιστική πρόσδεσή τους σε σύμπλοκα πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή υποδοχέα-συνδέτη⁴³ είτε στην παράδοση των φαρμακευτικών ουσιών στα κύτταρα-στόχους.⁶²

Μέχρι σήμερα, πολλά απταμερή έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπευτική στόχευση, με το απταμερές pegaptanib να συνιστά φαρμακευτικό σκεύασμα σε εμπορική κυκλοφορία για την αντιμετώπιση της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, υπό την ονομασία Macugen.^{63,64} Στο πεδίο του καρκίνου τα AS1411 και NOX-A12, έχουν φτάσει μέχρι και τις πρώτες κλινικές δοκιμές επιτυγχάνοντας σημαντική ανταγωνιστική πρόσδεση και αναστολή των υποδοχέων-στόχων τους.⁶² Το AS1411 είναι ένα DNA απταμερές 26 νουκλεοτιδίων που εμφανίζει ισχυρή εκλεκτικότητα στην πρόσδεση με το εξωτερικό τμήμα της πρωτεΐνης νουκλεολίνης (nucleolin), η οποία εκφράζεται στους πυρήνες όλων των κυττάρων, υπερεκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.⁶² Το απταμερές AS1411 συνδέεται στον υποδοχέα νουκλεολίνη και αναστέλλει τη δράση της, επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπως πνεύμονα, προστάτη, μαστού και εντέρου.⁶² Από την άλλη, το NOX-A12 είναι ένα RNA απταμερές μήκους 45 νουκλεοτιδίων, το οποίο αναπτύχθηκε ως ανταγωνιστής του συνδέτη χημειοκίνη CXCL12 για την πρόσδεση στους υποδοχείς CXCR4 και CXCR7, οι οποίοι ενεργοποιούν μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη

μετάσταση και την αγγειογένεση του καρκίνου.⁶² Αυτό το απταμερές βρίσκει εφαρμογή σε καρκίνους του εγκεφάλου, του παχέος εντέρου και των πολλαπλών μυελωμάτων.

Όσον αφορά στη φαρμακευτική θεραπεία, σε μια πρόσφατη δημοσίευση, ο Shen et al.⁶⁵ τροποποίησε νανοσωματίδια πυριτίου που έφεραν το κυτταροτοξικό φάρμακο Doxorubicin με το απταμερές 5' – GCA GCG GTG TGG GG GCA GCG GTG TGG GG GCA GCG GTG TGG GG – 3' (βλ. Κεφάλαιο 3.6.2. *Απταμερές At*), για να στοχεύσει τα υπερεκφραζόμενα σε HER2 κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού SKBR-3. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα Dox-νανοσωματίδια προσλήφθηκαν σε ποσοστό σχεδόν τριπλάσιο στα κύτταρα της σειράς SKBR3 που υπερεκφράζει τον HER2 σε σχέση με την MCF7 που αποτέλεσε το αρνητικό control, με πρόσληψη 82.7% και 31.0% αντίστοιχα.⁶⁵ Αυτό το γεγονός αποδεικνύει τη μεγάλη σημασία της στόχευσης, και πιο συγκεκριμένα της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο απταμερές και τον HER2 για τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.⁶⁵

2.2.4.3. Βιοαισθητήρες

Έχουν αναπτυχθεί ερευνητικά πολλές εφαρμογές των απταμερών σε βιοαισθητήρες εκμεταλλεζόμενες την δυνατότητά τους να αναγνωρίζουν εξειδικευμένα το μόριο-στόχο (aptasensors). Πιο συγκεκριμένα, οι Guo et al.⁶⁶ και Chai et al.⁶⁷ ανέπτυξαν αισθητήρες για τον εντοπισμό της HER2 πρωτεΐνης, ούσα καρκινικός δείκτης, με τη χρήση του απταμερούς 5' – GCA GCG GTG TGG GG – 3' (βλ. Κεφάλαιο 3.6.1. *Απταμερές A*). Τόσο ο πρώτος όσο και ο δεύτερος, έδειξαν την εκλεκτικότητα του απταμερούς να αναγνωρίζει ένα πεπτίδιο της HER2 πρωτεΐνης έναντι άλλων πρωτεϊνών που περιέχονται εντός ενός δείγματος ανθρώπινου ορού (ένζυμο BACE1, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο CEA, ανοσοσφαιρίνη G IgG, ανοσοσφαιρίνη M IgM, p53, πρωτεϊνική κινάση A).^{66,67}

3. Μεθοδολογική προσέγγιση

3.1. Βασική ιδέα

Μέσα από μελέτες στόχευσης του υποδοχέα HER2 έχουν προκύψει διάφορα υποψήφια απταμερή⁶⁸⁻⁷¹ που μπορούν να λειτουργήσουν ως οδηγοί τόσο για την χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όσο και για την παρεμπόδιση κυτταρικών μονοπατιών στη θεραπεία των HER2+ καρκίνων. Σε αυτή τη βάση, κρίθηκε αναγκαία η διεξαγωγή μιας συγκριτικής μελέτης μεταξύ αυτών των διαφορετικών απταμερών. Πρακτικά, τα διαφορετικά απταμερή χρησιμοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες καρκινικών σειρών, τόσο θετικών όσο και αρνητικών στην υπερέκφραση του υποδοχέα HER2, ώστε να μελετηθεί συγκριτικά η πρόσδεση και η εκλεκτικότητα του κάθε απταμερούς και έτσι να επιλεγθεί το βέλτιστο. Διευκρινίζεται ότι οι αρνητικές κυτταρικές σειρές δεν έχουν μηδενική έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αλλά εκφράζουν την πρωτεΐνη σε φυσιολογικά επίπεδα, δηλαδή χαρακτηρίζονται ως αρνητικές στην υπερέκφραση. Τα κύτταρα εξετάστηκαν με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, μέσω της εφαρμογής των κατάλληλων φθορίζουσών χρωστικών.

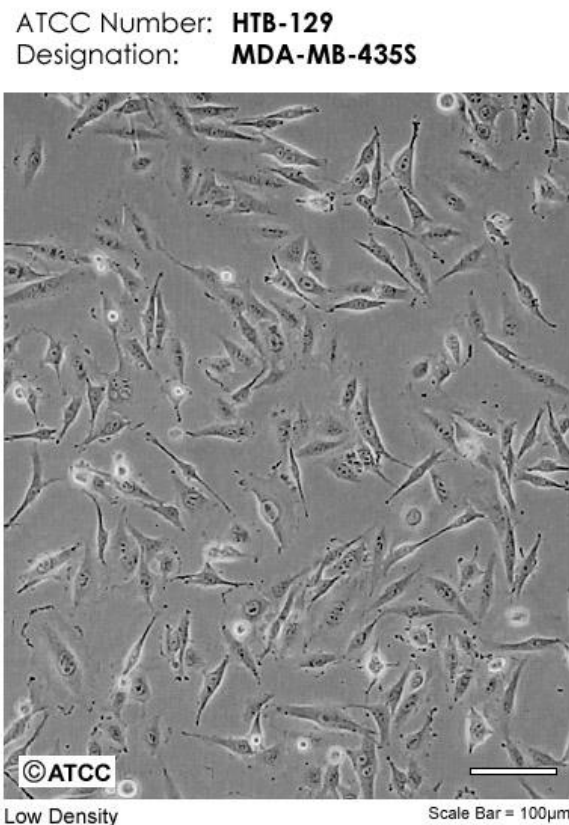
3.2. Μελέτη γενετικά τροποποιημένης κυτταροσειράς στον HER2

Σε πρώτο στάδιο ερευνήθηκαν οι διαφορές που παρουσιάζει στην πρόσδεση των απταμερών μια γενετικά τροποποιημένη – ώστε να υπερεκφράζει τον υποδοχέα HER2 – κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού, σε σχέση με το αντίστοιχο ισογονιδιακό στέλεχος άγριου τύπου (wild type) της σειράς, το οποίο δεν υπερεκφράζει τον HER2. Μέσω της σύγκρισης ισογονιδιακών κυτταρικών σειρών προσφέρεται η δυνατότητα εξέτασης της επίδρασης που έχει αποκλειστικά μια συγκεκριμένη μετάλλαξη στο βιολογικό σύστημα.⁷² Πιο συγκεκριμένα, η εξειδίκευση των απταμερών στον υποδοχέα HER2, μπορεί να μελετηθεί συγκρίνοντας την πρόσδεσή τους σε κύτταρα διαφορετικών επιπέδων έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Εάν σε μια υψηλά υπερεκφραζόμενη στον HER2 σειρά, προσδεθεί και περισσότερο απταμερές, αυτό θα μπορεί να εξηγηθεί μόνο μέσω της εξειδίκευσης, εφόσον δεν υπάρχει τίποτα άλλο διαφορετικό μεταξύ των κυτταρικών σειρών.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για αυτόν το σκοπό ήταν η MDA–MB–435 καρκίνου του μαστού, η οποία έχει βρεθεί αρνητική στην υπερέκφραση του HER2,^{73–77} ενώ το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος της αποτέλεσε η σειρά 435eb1.

3.2.1. Κυτταρική σειρά MDA–MB–435

Η κυτταρική σειρά MDA–MB–435 αποτελεί στέλεχος καρκίνου του μαστού, το οποίο απομόνωσε για πρώτη φορά ο R. Cailleau et al. το 1976 από μια 31χρονη γυναίκα ασθενή με μεταστατικό πορογενές αδενοκαρκίνωμα του μαστού.^{78,79} Τα κύτταρα αυτής της σειράς έχουν σχήμα ατράκτου (spindle shaped), ανήκουν στον επιθηλιακό ιστό⁸⁰ και η εικόνα τους σε καλλιέργεια δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 3.1: Κύτταρα της καρκινική σειράς μαστού MDA–MB–435 σε καλλιέργεια.⁷⁸

3.2.2. Κυτταρική σειρά 435eb1

Η κυτταρική σειρά 435eb1 είναι μια γενετικά τροποποιημένη σειρά στην οποία έχει εισαχθεί ένα διαγονιδιακό πλασμίδιο (βακτηριακής προέλευσης) στο οποίο έχει ενσωματωθεί το ανθρώπινο γονίδιο του HER2, ώστε να τον υπερεκφράζει. Η κατασκευή

αυτής της σειράς επετεύχθει μέσω της διαμόλυνσης του κυττάρου με το pSV-neo πλασμίδιο, το οποίο εμπεριέχει το γονίδιο ανοχής στο αντιβιοτικό νεομυκίνη (neomycin),⁸¹ και έφερε, επίσης, ολόκληρο το cDNA (complementary DNA, συμπληρωματικό DNA) 4.4 kDa⁸² του φυσιολογικού ανθρώπινου γονιδίου ErbB2 που βρίσκεται στο μητρικό στέλεχος της σειράς MDA-MB-435.⁸³ Η εικόνα των κυττάρων 435eb1 σε καλλιέργεια ταυτίζεται με αυτήν της MDA-MB-435 σειράς στην *Εικόνα 3.1*.

Η διαμόλυνση κυττάρων με ξένο γενετικό υλικό (DNA ή RNA) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης των γονιδίων, μέσω της ενίσχυσης ή αναστολής της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, αλλά και για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών.⁸⁴ Το εισαγόμενο γενετικό υλικό μπορεί, είτε να παραμείνει μέσα στο κύτταρο, εφόσον ενσωματωθεί μέσα στο γονιδίωμα του ξενιστή και να διατηρήσει την έκφραση του γονιδίου που μεταφέρει ακόμα και μετά την διαίρεση των κυττάρων του ξενιστή, είτε να εκφράζεται για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο και μετά να αποβληθεί.⁸⁴

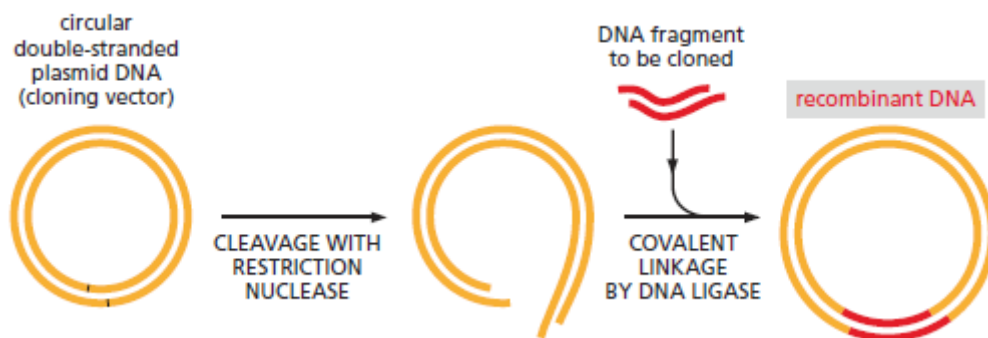
Το cDNA που εμπεριέχεται στο εισερχόμενο πλασμίδιο στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, το οποίο προέρχεται από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση) του μονόκλωνου ώριμου mRNA. Το mRNA αυτό, έχει προκύψει από τη μεταγραφή του γονιδίου της προς μετάφραση HER2 πρωτεΐνης. Σε αυτό λοιπόν βρίσκεται η γενετική πληροφορία του ErbB2 γονιδίου (μόνο τα εξώνια) χωρίς τα εσώνια (αλληλουχίες που δεν ανήκουν στην πρωτεΐνη).⁸⁵

Με αυτόν τον τρόπο, ο υποδοχέας HER2, τελικά, εκφράζεται πολύ περισσότερο στην σειρά 435eb1 σε σχέση με την μητρική MDA-MB-435. Το ποσοστό αύξησης της έκφρασης του HER2 αναλύεται παρακάτω.

3.2.3. Μετασηματισμός γενετικού υλικού

Για την απομόνωση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ή ενός συγκεκριμένου γονιδίου, απαιτείται η κλωνοποίηση αυτού. Ξεκινώντας, το γονιδίωμα σπάει σε μικρότερα κομμάτια (αλληλουχίες) μέσω ενζύμων, των περιοριστικών νουκλεασών, αποκτώντας έτσι ευκολότερη πρόσβαση στην αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου. Το γονίδιο αυτό μπορεί να εισαχθεί σε ένα άλλο μόριο DNA που θα λειτουργήσει ως φορέας και θα συμβάλει στην αντιγραφή του γονιδίου εντός ενός κυττάρου.⁸⁶

Τους συνήθεις φορείς αποτελούν τα πλασμίδια, τα οποία είναι μικρά κυκλικά μόρια DNA που βρίσκονται κυρίως σε βακτήρια και μπορούν να παράγουν αντίγραφα τους ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου. Ακόμη, τα πλασμίδια διαθέτουν συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης για τις κοινές περιοριστικές νουκλεάσες, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα να ανοίξουν και να δεχθούν ένα ξένο κομμάτι DNA, συνδέοντας μετά ξανά τους κλώνους με τα ένζυμα DNA λιγάσες. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, το οποίο εισάγεται σε βακτήρια ώστε να αντιγραφεί και να πολλαπλασιαστεί, μια διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός του βακτηρίου.

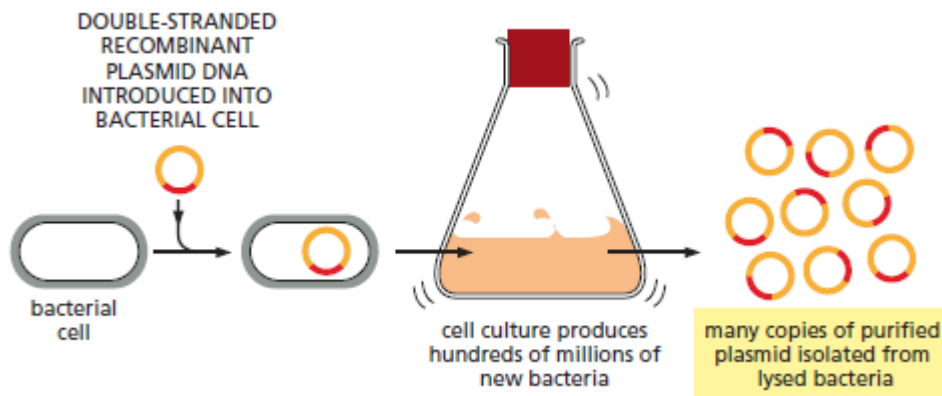


Σχήμα 3.1: Εισαγωγή ξένης αλληλουχίας DNA μέσα σε βακτηριακό πλασμίδιο.⁸⁶

Τα βακτηριακά πλασμίδια που χρησιμοποιούνται κατά κόρον συνήθως φέρουν γονίδια που καθιστούν τον ξενιστή τους ανθεκτικό σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Αυτό τους το προσόν δίνει τη δυνατότητα ελέγχου πρόσληψης του πλασμιδίου, υποβάλλοντας τον ξενιστή –εν προκειμένω την βακτηριακή αποικία– στο κατάλληλο αντιβιοτικό. Έτσι, τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο θα επιβιώσουν του αντιβιοτικού και θα αποτελέσουν την αποικία που θα καλλιεργηθεί σε επόμενο χρόνο για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού γονιδίου.⁸⁶

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός βασίζεται στην φυσική ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να προσλαμβάνουν μόρια DNA που βρίσκονται στο περιβάλλον τους. Ο βακτηριακός κύκλος διπλασιασμού διαρκεί περίπου 30 λεπτά, οπότε ο αριθμός των αντιγράφων DNA διπλασιάζεται αντίστοιχα με ταχύτατο ρυθμό. Εντός ενός 24ώρου η μετασχηματισμένη βακτηριακή αποικία παράγει εκατομμύρια αντίγραφα του πλασμιδίου

με το επιθυμητό γονίδιο, τα οποία λαμβάνονται με λύση (lysis) των βακτηρίων και απομόνωσή τους από τα υπόλοιπα κυτταρικά υπολείμματα.⁸⁶



Σχήμα 3.2: Μετασχηματισμός βακτηρίου και απομόνωση πολλαπλασιασμένων αντιγράφων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.⁸⁶

Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς 435eb1 απομονώθηκε το γονίδιο ErbB2 και εισήχθη στο βακτηριακό πλασμίδιο pSV-neo, το οποίο φέρει το γονίδιο αντοχής έναντι στο αντιβιοτικό νεομυκίνη.

3.2.4. Μελέτη έκφρασης HER2 στην κυτταροσειρά 435eb1

Για τον καθορισμό του ποσοστού υπερέκφρασης του υποδοχέα HER2 στην γενετικά τροποποιημένη σειρά 435eb1 πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις, η PCR και η qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR), μέθοδοι που και οι δύο βασίζονται στον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας DNA ή RNA. Με την πρώτη μέθοδο, ελέγχθηκε η ύπαρξη του πλασμιδίου εντός των κυττάρων της καρκινικής σειράς, ενώ με τη δεύτερη εάν έχει ενσωματωθεί συγκεκριμένα το γονίδιο ErbB2 και κυρίως τα επίπεδα έκφρασής του.

3.2.4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) ή αλλιώς Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης βασίζεται στη δράση της DNA πολυμεράσης, η οποία μπορεί να παράγει δεκάδες δισεκατομμύρια αντίγραφα της – προς ανάλυση – αλληλουχίας DNA. Το μεγάλο πλεονέκτημα που καθιστά την PCR μια τόσο σημαντική μέθοδο είναι ότι πλέον η

ποσότητα του DNA δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Πιο αναλυτικά, το σύνολο του γονιδιώματος που αποτελεί το δείγμα, συνίσταται από μια μεγάλη ποικιλία αλληλουχιών DNA, πράγμα που δυσκολεύει τον εντοπισμό και ανάλυση του επιθυμητού. Με την εισαγωγή της PCR, η αλληλουχία που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον πολλαπλασιάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό που πλέον το σήμα της διακρίνεται εύκολα από το θόρυβο των υπόλοιπων αλληλουχιών. Η PCR επιτρέπει ουσιαστικά την κλωνοποίηση μιας αλληλουχίας DNA εκτός του κυττάρου, *in vitro*.⁸⁷

Η συνολική αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιείται εντός ενός μίγματος, το οποίο αποτελείται από το δείγμα DNA που έχει εξαχθεί (που θα αποτελέσει τη μήτρα για την αντιγραφή), την πολυμεράση Taq, τους εκκινητές και περίσσεια τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) που περιλαμβάνουν τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη. Ο συνολικός όγκος του μίγματος υποβάλλεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αυξομειούμενης θερμοκρασίας (εντός συγκεκριμένης διάταξης) μέχρι να παραχθεί ικανή ποσότητα αντιγράφων. Η βασική λειτουργία της μεθόδου μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: την μετουσίωση (denaturation), την υβριδοποίηση με εκκινητές (primers) και την φάση της επιμήκυνσης (elongation).⁸⁷

Μετουσίωση (Denaturation)

Κατά το πρώτο στάδιο της μετουσίωσης, αυξάνεται η θερμοκρασία περί τους 94°C, ώστε να διαχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA. Σε θερμοκρασία υψηλότερη των 80°C, διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου, οπότε έτσι το δίκλωνο μόριο DNA μετουσιώνεται σε μονόκλωνο.⁸⁷

Υβριδοποίηση

Στο δεύτερο στάδιο, αυτό της υβριδοποίησης, η θερμοκρασία πέφτει και κυμαίνεται μεταξύ 40–70°C. Η χαμηλότερη θερμοκρασία ευνοεί τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και τώρα, οι εκκινητές (primers), που αποτελούν μονόκλιωνα μόρια σύντομων αλληλουχιών συμπληρωματικών προς τη DNA μήτρα, συνδέονται στις κατάλληλες θέσεις με αυτήν, υβριδοποιώντας τους DNA κλώνους.⁸⁷

Εκκινητές (Primers)

Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συνήθως 10–30 νουκλεοτιδίων, οι οποίες προσδένονται εξειδικευμένα στις επιθυμητές προς αντιγραφή αλληλουχίες του μονόκλωνου DNA και αναγνωρίζονται από την DNA πολυμεράση για την έναρξη της αντιγραφής. Από τους εκκινητές που προστίθενται στην PCR, κάποιοι θα δένονται συμπληρωματικά στον κλώνο με τη φορά 5' → 3', ενώ άλλοι θα αναγνωρίζουν τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες κατά τη φορά 3' → 5'.⁸⁷

Πολυμεράση Taq

Η DNA πολυμεράση καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής του DNA. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται σε διαδικασίες PCR προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο ζει σε θερμές πηγές και αντέχει σε θερμοκρασίες άνω των 100°C. Η αντοχή του σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες παρέχει τη δυνατότητα αποδιάταξης και μετουσίωσης των βιομορίων, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης είναι οι 72°C.⁸⁷

Επιμήκυνση

Κατά το τρίτο στάδιο, την επιμήκυνση, όπου συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος του DNA, η θερμοκρασία φτάνει τους 72°C. Η Taq πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και πραγματοποιεί την αντιγραφή του DNA κλώνου χρησιμοποιώντας τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια που βρίσκονται ελεύθερα στο μίγμα της αντίδρασης. Έτσι, ξεκινάει η αντιγραφή από τον εκκινητή και συνεχίζει στο DNA με τη φορά του εκάστοτε κλώνου μέχρι την αλλαγή της θερμοκρασίας και την επανάληψη του κύκλου. Σε κάθε νέο κύκλο, τα τμήματα DNA που μπορούν να αποτελέσουν μήτρα για την αντιγραφή έχουν πολλαπλασιαστεί λόγω των προηγούμενων αντιγράφων κι έτσι κάθε κύκλος θεωρητικά διπλασιάζει την ποσότητα DNA της επιθυμητής αλληλουχίας. Η διαδικασία της PCR απαιτεί περίπου 20–40 κύκλους για την παραλαβή μιας ικανοποιητικής ποσότητας DNA, ώστε να μπορεί να τεθεί προς ανάλυση (περίπου 0.1 μg).⁸⁷

3.2.4.2. PCR για την ανίχνευση του πλασμιδίου

Για τον προσδιορισμό της πρόσληψης ή μη του πλασμιδίου εντός των κυττάρων της σειράς 435eb1 διενεργήθηκε PCR. Εάν το πλασμίδιο έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου, θα είναι δυνατόν να δημιουργηθούν αντίγραφα συγκεκριμένων γονιδίων μέσω PCR και να εντοπιστούν ακολούθως με την ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, για τον έλεγχο της επιτυχούς πρόσληψης του πλασμιδίου, η κυτταροσειρά 435eb1 θα πρέπει να συγκριθεί με την αντίστοιχη μητρική της MDA–MB–435 που δεν φέρει το πλασμίδιο, αλλά διαθέτει ακριβώς τα ίδια γονίδια, συνιστώντας έτσι το αρνητικό control. Επιλέχθηκε ο εντοπισμός του γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη και όχι του ErbB2, καθώς το πρώτο το φέρει μόνο η σειρά 435eb1.

3.2.4.3. Ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης

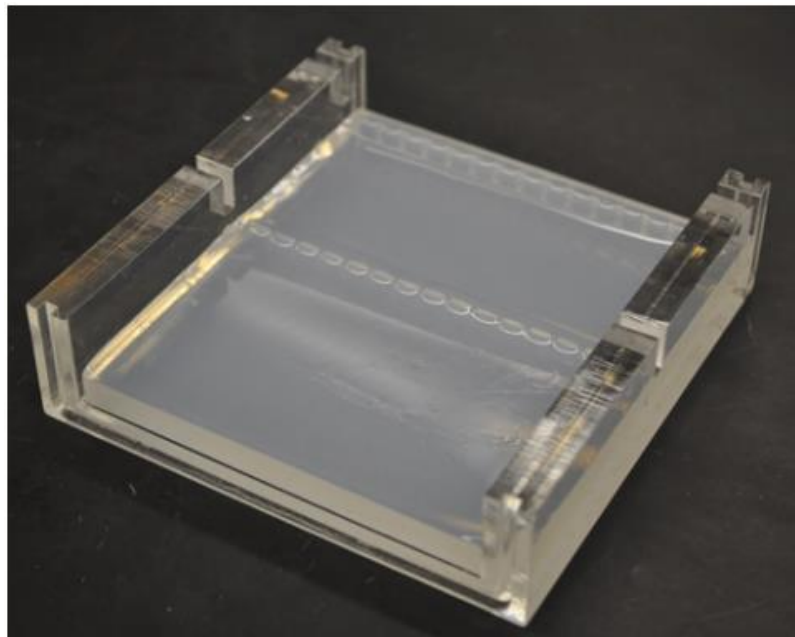
Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται κατά μέγεθος, καθώς οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες που τα συνιστούν κατευθύνονται προς την άνοδο (θετικός πόλος).^{88,89} Ο ρυθμός με τον οποίο τα μόρια μετακινούνται μέσα στο gel καθορίζεται αποκλειστικά από το μέγεθός τους, με τα μικρότερα να κινούνται ταχύτερα. Τα διαφορετικά μεγέθη DNA ή RNA διαχωρίζονται σχηματίζοντας μπάντες (bands), οι οποίες ύστερα από την προσθήκη συγκεκριμένης φθορίζουσας χρώσης (βρωμιούχο αιθίδιο) γίνονται ορατές στο UV.⁸⁹

Η ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου αποτελούν συνήθεις μεθόδους διαχωρισμού αλληλουχιών DNA ή RNA διαφορετικών μεγεθών από 100bp έως 25kb,⁸⁸ καθώς και τα δύο gel σχηματίζουν πορώδες εσωτερικό κατά την σταθεροποίησή τους.⁹⁰ Η ηλεκτροφόρηση gel αγαρόζης φέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως χημική σταθερότητα που δεν επηρεάζει τη δομή των νουκλεϊκών οξέων, ευκολία στη χρήση και άμεση επανάκτηση των δειγμάτων για περαιτέρω μελέτη.⁸⁹

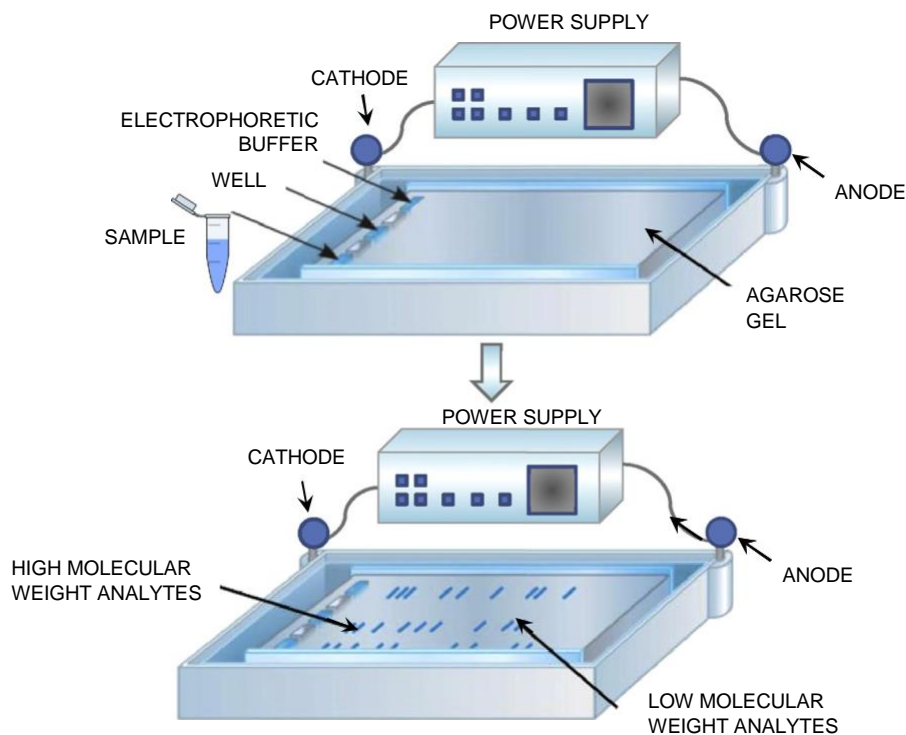
Η αγαρόζη απομονώνεται από τις ποικιλίες φυκιών *Gelidium* και *Gracilaria* και συνίσταται από επαναλαμβανόμενες μονάδες αγαροβιόζης (L– και D– γαλακτόζης).⁸⁸ Κατά την σταθεροποίηση του gel, τα πολυμερή αγαρόζης συνδέονται μη ομοιοπολικά και σχηματίζουν ένα δίκτυο πόρων, το μέγεθος των οποίων καθορίζει τη διαχωριστική ικανότητα του gel.⁸⁸ Η ομοιομορφία στην αναλογία μάζας–φορτίου όσον αφορά στα μόρια DNA εξασφαλίζει μια συγκεκριμένη συμπεριφορά κατά την μετακίνησή τους εντός του gel, με τη διανυθείσα απόσταση να είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του

μοριακού βάρους.⁸⁸ Το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων, η συγκέντρωση του gel σε αгарόζη, η διαμόρφωση του DNA στο χώρο, το εφαρμοζόμενο δυναμικό και το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι κάποιες από τις παραμέτρους που καθορίζουν το διαχωρισμό.⁸⁸ Η αύξηση της συγκέντρωσης της αгарόζης μειώνει την ταχύτητα των μορίων εντός του gel, οπότε διευκολύνεται ο διαχωρισμός των μικρότερων μορίων. Ωστόσο, η αύξηση του δυναμικού επιταχύνει τη μετακίνηση των μορίων με άμεση βέβαια συνέπεια την αύξηση της θερμοκρασίας και το ρίσκο τήξης του gel.⁸⁹

Για το διαχωρισμό DNA, τα δείγματα φορτώνονται σε προσχηματισμένα πηγαδάκια εντός του gel και εφαρμόζεται ένα ρεύμα. Το gel είναι τοποθετημένο εντός διάταξης που εξασφαλίζει την βύθισή του εντός του διαλύματος ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματίζεται κλειστό κύκλωμα. Η χρησιμοποιούμενη διάταξη δίνεται στις παρακάτω εικόνες, *Εικόνα 3.4* και *Εικόνα 3.5*.



Εικόνα 3.2: Gel αгарόζης με τα σχηματισμένα κελιά-πηγάδια που φέρουν τα δείγματα νουκλεϊκών οξέων.⁸⁸



Σχήμα 3.3: Συνήθης διάταξη ηλεκτροφόρησης gel αγαρόζης.⁹¹

Τα ηλεκτρόδια της διάταξης ηλεκτροφόρησης συνδέονται έτσι ώστε το αρνητικό DNA να φεύγει από τα πηγαδάκια και να κατευθύνεται κατά μήκος του gel έως την απέναντι πλευρά. Οπότε, η κάθοδος (αρνητικός πόλος) θα είναι από την πλευρά των πηγαδιών, ενώ στην άλλη άκρη του gel συνδέεται η άνοδος (θετικός πόλος).

Οι μάντες που προκύπτουν από το διαχωρισμό των διάφορων αλληλουχιών DNA εμφανίζονται κατά την ακτινοβολία του gel με UV. Το βρωμιούχο αιθίδιο που προστίθεται στα –προς ηλεκτροφόρηση– δείγματα, αποτελεί μια φθορίζουσα ουσία που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων, προσφέροντας τη δυνατότητα εντοπισμού των τμημάτων DNA εντός του gel.⁸⁹ Το μοριακό βάρος της κάθε μάντας καθορίζεται ανάλογα με τη θέση της στο gel. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε ηλεκτροφόρηση εισάγεται και ένα δείγμα (ladder) που εμφανίζει μάντες γνωστών μοριακών βαρών, ώστε να μπορούν να καθοριστούν συγκριτικά τα μοριακά βάρη των νέων δειγμάτων.

Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, εξετάστηκε η παρουσία –με την εμφάνιση μάντας ή όχι– του γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη εντός της κυτταρικής σειράς 435eb1, γεγονός που εξασφαλίζει την ενσωμάτωση του πλασμιδίου. Ωστόσο, το κατά

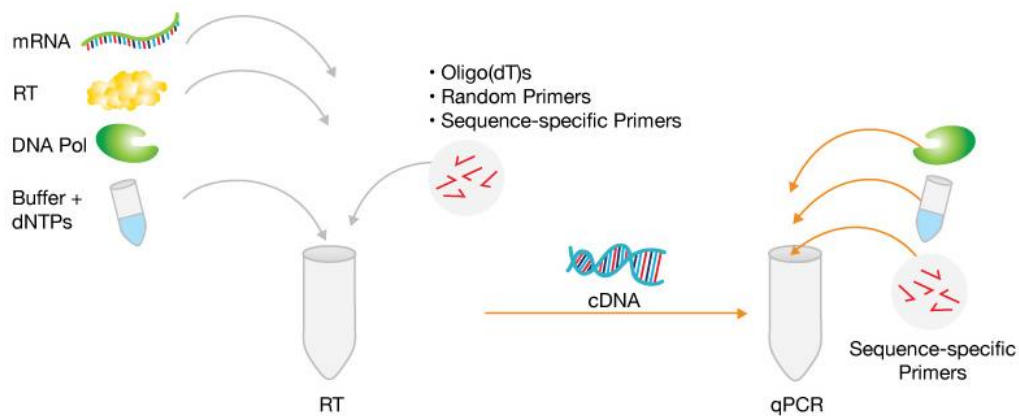
πόσο η ενσωμάτωση του γονιδίου ErbB2 στο γονιδίωμα της κυτταρικής σειράς 435eb1 έχει επιτευχθεί παραμένει άγνωστο, πρόβλημα που επιλύεται με τη μέθοδο που ακολουθεί.

3.2.4.4. qPCR

Για τον έλεγχο της παρουσίας αλλά και της έκφρασης του γονιδίου ErbB2 στην κυτταρική σειρά 435eb1 διενεργήθηκε qPCR στο cDNA που προέκυψε από την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA της HER2 πρωτεΐνης. Το cDNA αυτό λήφθηκε με τη μέθοδο Reverse Transcription PCR (RT-PCR, Αντίστροφης Μεταγραφής).

Στη μέθοδο Reverse Transcription PCR χρησιμοποιείται mRNA ως αρχική μήτρα, σε αντίθεση με το DNA που αναλύθηκε παραπάνω. Αρχικά, το δείγμα που εισάγεται για την RT-PCR περιέχει όλο το RNA που βρίσκεται στα κύτταρα της προς ανάλυση σειράς, εντός του οποίου περιέχεται το mRNA που έχει προκύψει για τη μετάφραση της HER2 πρωτεΐνης. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) χρησιμοποιεί το mRNA για να σχηματίσει το συμπληρωματικό μονόκλωνο DNA (complementary DNA, cDNA) μέσω της κατάλυσης της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής. Στη συνέχεια, η DNA πολυμεράση μετατρέπει το μονόκλωνο cDNA σε δίκλωνο DNA, ώστε με τη σειρά του να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την κοινή PCR και τον πολλαπλασιασμό του.⁹²

Η qPCR βασίζεται στον εντοπισμό του φθορίζοντος σήματος που παράγεται σε αναλογία με το προϊόν της PCR κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου όπου πολλαπλασιάζεται το DNA. Το φθορίζον μόριο μπορεί είτε να παρεμβάλλεται στην αλληλουχία της αντιγραφόμενης μήτρας και να διασπάται από τη δράση της DNA πολυμεράσης εκπέμποντας έτσι φθορισμό, είτε να προσδένεται στο δίκλωνο DNA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο χρώσης-DNA το οποίο έχει τη δυνατότητα να απορροφά το μπλε φως και να εκπέμπει πράσινο, υποδηλώνοντας τη συγκέντρωση του πολλαπλασιασμένου δίκλωνου DNA. Ένας πολύ ευαίσθητος ανιχνευτής εντός της διάταξης PCR μετράει και καταγράφει το φθορίζον σήμα μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου της PCR. Έτσι, τελικά καταλήγει στη μέτρηση της συγκέντρωσης των αντιγράφων DNA σε πραγματικό χρόνο (real-time).⁹²



Σχήμα 3.4: Τα βήματα για την εφαρμογή της μεθόδου QRT-PCR.⁹³

3.3. Μελέτη φυσικά υπερεκφραζόμενων σειρών στον HER2

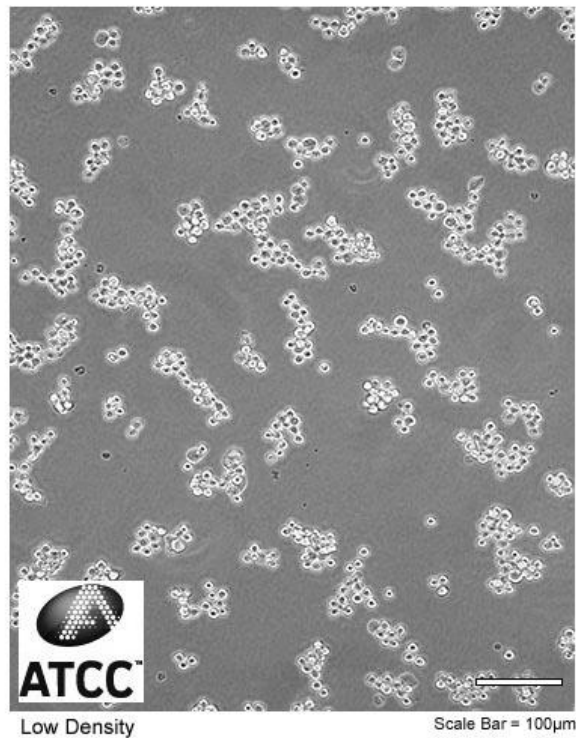
Για τη μελέτη της πρόσδεσης των απταμερών στον HER2 εξετάστηκαν, πέραν της γενετικά τροποποιημένης κυτταρικής σειράς 435eb1, άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν φυσικά τον υποδοχέα. Οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3, των καρκίνων μαστού, στομάχου και ωοθηκών αντίστοιχα.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μελετάται ο καρκίνος του μαστού, ωστόσο λόγω των περιορισμένων διαθέσιμων καρκινικών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν τον HER2, εισήχθησαν και άλλα είδη καρκίνου που πληρούν την προϋπόθεση της υπερέκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα.

3.3.1. Κυτταρική σειρά MDA-MB-453

Τα κύτταρα της σειράς MDA-MB-453 ανήκουν στα επιθηλιακά του ανθρώπινου μαστικού αδένου και απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον R. Cailleau et al. το 1976 από μία 48χρονη ασθενή με μεταστατικό καρκίνωμα του μαστού, επιτιθέμενο σε λεμφαδένες, εγκέφαλο, υπεζωκοτικές και περικαρδιακές κοιλότητες.⁹⁴ Σύμφωνα με αναφορές τα κύτταρα MDA-MB-453 υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2^{74,95-97} και η εικόνα τους σε καλλιέργεια δίνεται παρακάτω:

ATCC Number: **HTB-131**™
Designation: **MDA-MB-453**



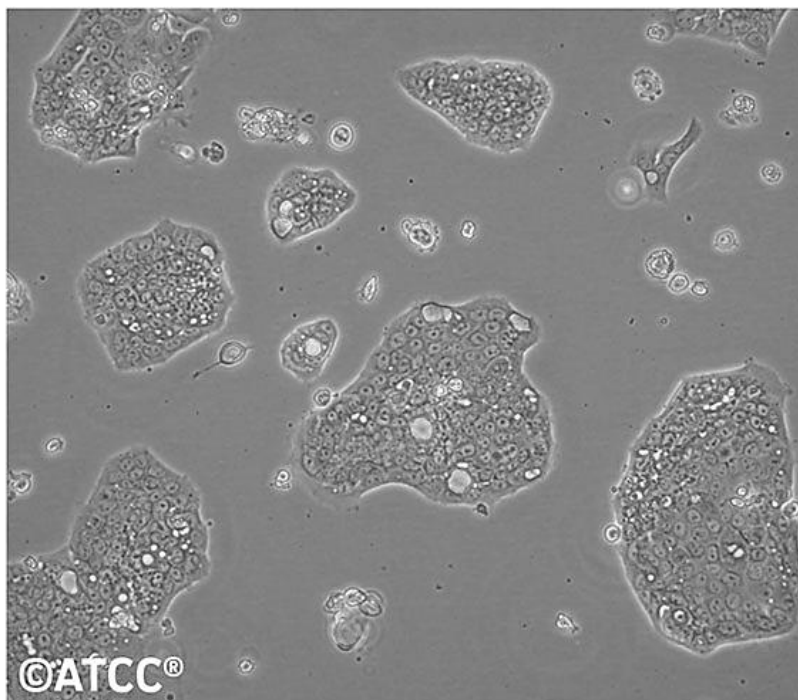
Εικόνα 3.3: Κύτταρα της καρκινικής σειράς MDA-MB-453 σε καλλιέργεια.⁹⁴

3.3.2. Κυτταρική σειρά NCI-N87

Τα κύτταρα της σειράς NCI-N87 είναι επιθηλιακά προερχόμενα από μεταστατικό γαστρικό καρκίνο στο σπύκι άνδρα ασθενούς και απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1976 από τον Gazdar et al. στο National Cancer Institute.⁹⁸ Ο όγκος εισήχθη σε αθυμικά ποντίκια ως ξενομόσχευμα και αφέθηκε για τρεις γενιές μέχρι να καθιερωθεί ως κυτταρική σειρά.⁹⁸ Τα κύτταρα N87 έχουν βρεθεί θετικά στην υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα⁹⁹⁻¹⁰² και η εικόνα τους σε καλλιέργεια παρουσιάζεται στην *Εικόνα 3.4*.

ATCC Number: **CRL-5822**

Designation: **NCI-N87**



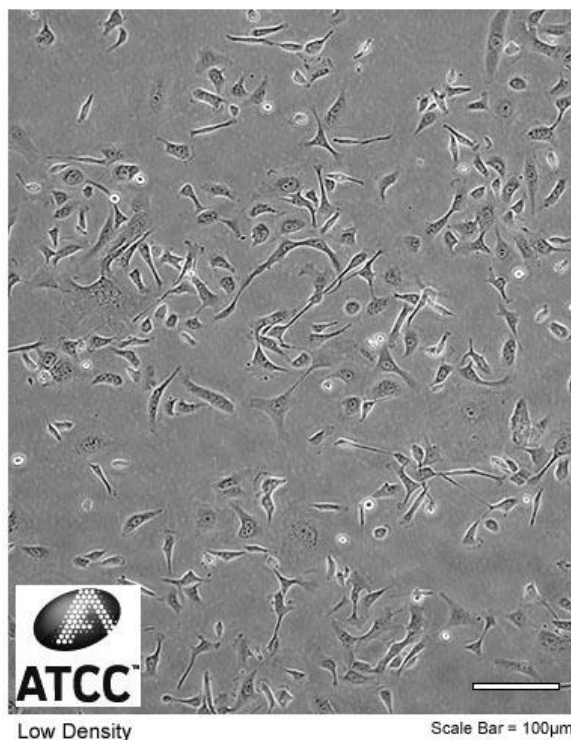
High Density

Εικόνα 3.4: Κύτταρα της καρκινικής σειράς στομάχου NCI-N87 σε καλλιέργεια.⁹⁸

3.3.3. Κυτταρική σειρά SK-OV-3

Η κυτταρική σειρά SK-OV-3 συνίσταται από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος των ωοθηκών και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1973 από μία 63χρονη ασθενή.¹⁰³ Η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 στα SKOV3 έχει καταγραφεί σε αρκετές δημοσιεύσεις^{95,104-107}, ενώ η εικόνα των κυττάρων σε καλλιέργεια επισυνάπτεται κάτωθι:

ATCC Number: **HTB-77**™
Designation: **SK-OV-3 [SKOV-3]**

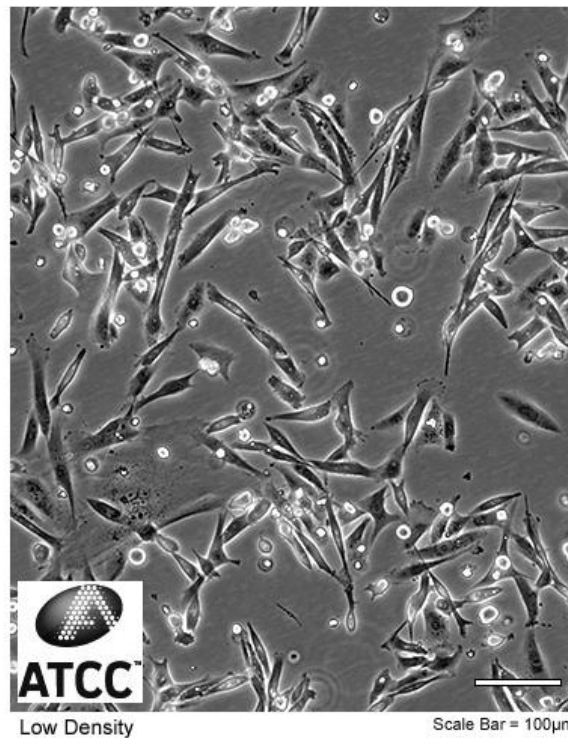


Εικόνα 3.5: Κύτταρα της καρκινικής σειράς ωοθηκών SKOV3 σε καλλιέργεια.¹⁰³

3.4. Μελέτη μη υπερεκφραζόμενης σειράς στον υποδοχέα HER2

Η μελέτη της πρόσδεσης των απταμερών βασίζεται στη σύγκριση μεταξύ θετικών και αρνητικών, στην υπερέκφραση του υποδοχέα HER2, καρκινικών κυτταρικών σειρών. Σε αυτό το πλαίσιο, μελετήθηκε η τριπλά αρνητική (ER-, PR-, HER2-)^{74,76,77,108} κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-231. Τα κύτταρα αυτής της σειράς ανήκουν στα επιθηλιακά κύτταρα μεταστατικού καρκίνου του μαστού στην υπεζωκοτική κοιλότητα και έχουν απομονωθεί από το αδενοκαρκίνωμα 51χρονης ασθενούς.¹⁰⁹ Η εικόνα των κυττάρων της σειράς MDA-MB-231 σε καλλιέργεια δίνεται στην *Εικόνα 3.6*.

ATCC Number: **HTB-26**™
Designation: **MDA-MB-231**

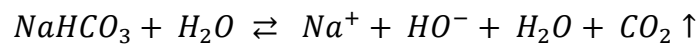


Εικόνα 3.6: Κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MDA-MB-231 σε καλλιέργεια.¹⁰⁹

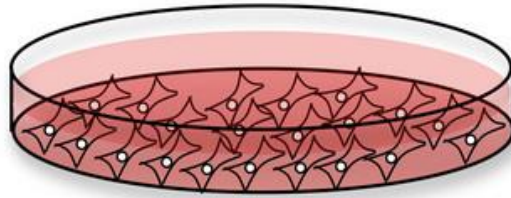
3.5. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Γενικά, τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να επιτελούν τις λειτουργίες τους, εφόσον παρέχονται οι απαραίτητες συγκεντρώσεις οξυγόνου, γλυκόζης, ιόντων, αμινο- και λιπαρών οξέων στο εξωκυτταρικό περιβάλλον τους και η κατάλληλη θερμοκρασία κατά την επώασή τους.¹¹⁰ Οι φυσιολογικές συνθήκες της *in vitro* ανάπτυξης ανθρώπινων κυττάρων περιλαμβάνουν θερμοκρασία 37°C και σταθερό pH στο εύρος 7.2–7.4, ώστε να παρομοιάζουν όσον το δυνατόν περισσότερο το εσωτερικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού.¹¹¹ Τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση των κυττάρων εξασφαλίζονται με τη χρήση ενός θρεπτικού μέσου, ενώ οι συνθήκες μέσω του επωαστήρα. Η διατήρηση του pH στις κατάλληλες τιμές ρυθμίζεται με την εισαγωγή ροής αέρα εμπλουτισμένου με 5% CO₂ εντός του επωαστήρα. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) που παράγεται κατά τις διαδικασίες καταβολισμού των κυττάρων είναι η κύρια ουσία υπεύθυνη για τις αλλαγές στο pH.^{41,112} Σε ένα κλειστό σύστημα, το CO₂ μπορεί να αντιδράσει με το νερό και να παράγει ανθρακικό οξύ (H₂CO₃) κι έτσι να οξινίσει το

θρεπτικό μέσο.¹¹² Το ρυθμιστικό διάλυμα του διττανθρακικού (HCO_3^-) αποτελεί ένα φυσιολογικό διάλυμα με pH γύρω στο 7.4, επειδή το H_2CO_3 στο πλάσμα του αίματος είναι σε ισορροπία με την τεράστια ποσότητα CO_2 που βρίσκεται σε αέρια φάση στους πνεύμονες.¹¹³ Έτσι, το θρεπτικό μέσο μέσα στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα, αποκτά την ιδιότητα ρυθμιστικού διαλύματος μέσω της παρακάτω αντίδρασης που βρίσκεται σε μόνιμη ισορροπία:¹¹²



Τα κύτταρα που προσκολλούνται, καλλιεργούνται σε τρυβλία Petri και έχουν την παρακάτω εικόνα:



Σχήμα 3.5: Καλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλίο Petri. Τα κύτταρα είναι προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου, ενώ είναι βυθισμένα μέσα στο θρεπτικό μέσο (ροζ).¹¹⁴

3.6. Απταμερή

Τα απταμερή που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι τα εξής:

- Απταμερές A: 2.2 DNA aptamer 14nt,⁶⁸
5'– GCA GCG GTG TGG GG – [Cyanine 5] – 3'
και το τριμερές αυτού, με τη σήμανση At,
- Απταμερές At: 2.2t DNA aptamer 42nt,⁶⁸
5'– [Cyanine 5] – GCA GCG GTG TGG GG – GCA GCG GTG TGG GG –
GCA GCG GTG TGG GG – 3'
- Απταμερές B: Hb5 40nt,⁶⁹
5'–TGC ACT TGT CAT TTT GTA TAT GTA TTT GGT TTT TGG CTC T –
[Cyanine 5] – 3'

- Απταμερές Γ: 86C 45nt,⁷⁰

5'– [Cyanine 5] – TGG GGC CTG GAT ACG GAT TGG TAA GGA TTA GTA –
GGG GGC ATA GCT – 3'

- Απταμερές Δ: HeA2_3 aptamer D 40nt,⁷¹

5'–[Cyanine 5] – TCT AAA AGG ATT CTT CCC AAG GGG ATC CAA TTC –
AAA CAG C – 3'

3.6.1. Απταμερές A

Το απταμερές A2.2 μήκους 14 δεσοξυρινοκλεοτιδίων προέκυψε ύστερα από 5 κύκλους της διαδικασίας SELEX, μέσα από μια συλλογή μονόκλωνων DNA με εισαγόμενο στόχο την – ακινητοποιημένη σε αντίσωμα – HER2 πρωτεΐνη που εκφράζεται στα κύτταρα γαστρικού καρκίνου NCI–N87, μια σειρά η οποία όπως προαναφέρθηκε υπερεκφράζει το συγκεκριμένο υποδοχέα.⁶⁸

Ο Mahlke et al.⁶⁸, μέσω διαφόρων ελέγχων κηλίδωσης (blotting) εξήγαγε το συμπέρασμα πως το απταμερές 2.2 παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση στη στόχευση της ανθρώπινης ErbB2 πρωτεΐνης, ενώ δεν δύναται να προσδεθεί σε καμία άλλη πρωτεΐνη της ErbB οικογένειας, συμπεριλαμβανόμενης και της ErbB1 που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την ErbB2.

3.6.2. Απταμερές At

Το τριμερές του DNA απταμερούς 2.2, το 2.2t, μήκους 42 νουκλεοτιδίων σχεδιάστηκε προς ενίσχυση της δράσης του αντίστοιχου μονομερούς και τη δυνατότητα προώθησης της διασταύρωσης των HER2 υποδοχέων.⁶⁸

Μέσω μεθόδων κηλίδωσης (blotting) απεδείχθη η αναμενόμενη υπεροχή του τριμερούς At στην εξειδικευμένη στόχευση της ErbB2 πρωτεΐνης, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.⁶⁸ Με την εφαρμογή βιοχημικών αναλύσεων, αλλά και ανοσοφθορισμού (immunofluorescence) παρατηρήθηκε πως η στόχευση του ErbB2 υποδοχέα των κυττάρων N87 με το τριμερές απταμερές 2.2t οδηγεί σε ικανοποιητική αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, σε σχέση με τη δράση του μονομερούς.⁶⁸ Επιπλέον, η πρόσδεση του απταμερούς προωθεί τη μετατόπιση του εξωκυτταρικού τμήματος του

HER2 υποδοχέα ενδοκυτταρικά, στο κυτταρόπλασμα, απ' όπου μετέπειτα απομακρύνεται μέσω της δράσης των λυσοσωμάτων.⁶⁸ Τέλος, η σύγκριση της αντικαρκινικής δράσης του τριμερούς 2.2t με αυτήν του μονοκλωνικού αντισώματος mAb43, κατέληξε στην υπεροχή του πρώτου, έχοντας δύο φορές ισχυρότερη δράση,⁶⁸ ενώ ταυτόχρονα το απταμερές δεν προκαλεί την αντίδραση του ανοσοποιητικού.¹¹⁵

3.6.3. Απταμερές Β

Το απταμερές Β με ονομασία Hb5 αποτελείται από μια DNA αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων και επιλέχθηκε από μια διαδικασία SELEX αρκετών κύκλων με στόχο πρόσδεσης ένα HER2 πεπτίδιο χημικά συντεθειμένο σε καθαρότητα $\geq 95\%$.⁶⁹ Το πεπτίδιο αυτό αποτελεί ένα τμήμα του HER2 υποδοχέα, συνιστάμενο από 20 αμινοξέα

Το απταμερές Hb5 μελετήθηκε επίσης ως προς την πρόσδεσή του μόνο στο εξωκυτταρικό τμήμα (ECD, Extracellular Domain) της πρωτεΐνης HER2, ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτικό της πρόσδεσης σε πραγματικά κύτταρα.⁶⁹ Το Hb5 συνδέθηκε επιτυχώς στην HER2 πρωτεΐνη, ενώ υπό την παρουσία αλβουμίνης (BSA, Bovine Serum Albumin) και τρυψίνης, αναδείχθηκε η τάση προς εξειδικευμένη στόχευση των HER2 μορίων.^{46,69}

3.6.4. Απταμερές Γ

Το 45 νουκλεοτιδίων DNA απταμερές 86C έχει ακινητοποιηθεί πάνω σε ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με νανοσωτίδια χρυσού (AuNPs) στα πλαίσια ανάπτυξης ενός βιοαισθητήρα εντοπισμού του εξωκυτταρικού τμήματος της HER2 πρωτεΐνης που αποσπάται και εισάγεται στην κυκλοφορία του αίματος.⁷⁰ Το απταμερές αυτό είχε απομονωθεί από τον Limin Chun et al.⁷⁰ με μία non-SELEX μέθοδο, την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM). Βέβαια, δεν αναφέρεται το μόριο-στόχος που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή του απταμερούς, γεγονός που δυσκολεύει την αξιολόγησή του ως προς την εξειδικευμένη στόχευση.

Η εφαρμογή του αισθητήρα στον εντοπισμό μιας ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης συνιστάμενης από το εξωκυτταρικό τμήμα του HER2 υποδοχέα, έδειξε υψηλή ευαισθησία και χαμηλό όριο ανίχνευσης του αναλύτη.⁷⁰ Επιπλέον, σε περιβάλλον υψηλών συγκεντρώσεων ανοσοσφαιρίνης G (IgG), γλυκόζης, DNA και RNA πλασμιδίων,

ο σένσορας επέδειξε ελάχιστη αλληλεπίδραση με τα μόρια εκτός στόχου, εξασφαλίζοντας την υψηλή εκλεκτικότητα του απταμερούς στον εντοπισμό του HER2.⁷⁰

3.6.5. Απταμερές Δ

Το DNA απταμερές HeA2_3 αποτελείται από 40 νουκλεοτίδια και έχει απομονωθεί μέσα από διαδικασία SELEX 5 κύκλων με τη θέση του μορίου – στόχου να καταλαμβάνουν ολόκληρα κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού SKBR-3.⁷¹ Μέσω της whole-cell SELEX όλες οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου αποτελούν υποψήφιες θέσεις πρόσδεσης, οπότε μετά την επιλογή του απταμερούς, εξετάστηκε η εκλεκτικότητά του ως προς τον υποδοχέα HER2.⁷¹ Τα αποτελέσματα του Gijis et al.⁷¹ έδειξαν την εξειδικευμένη στόχευση του HER2 από το HeA2_3 απταμερές, μέσω της σύγκρισης υπερεκφραζόμενων (SKOV-3 και SKBR-3) και μη (MDA-MB-231) καρκινικών κυτταρικών σειρών. Κατά την επώαση των κυττάρων με το απταμερές, φάνηκε να εισέρχεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί μέσω των μηχανισμών ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων.⁷¹

3.7. Απεικόνιση των κυττάρων

Η συνήθης πρακτική για τον οπτικό έλεγχο των κυττάρων και την απεικόνισή τους περιλαμβάνει τη χρήση μικροσκοπίου. Στην παρούσα εργασία, η εξέταση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο ειδών φωτονικού μικροσκοπίου. Το πρώτο είναι το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (bright-field microscope) με το οποίο παρατηρούνταν τα κύτταρα κατά την καλλιέργειά τους εντός των τρυβλίων και το δεύτερο, είναι το μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescence microscope), με το οποίο απεικονίστηκαν τα κύτταρα ύστερα από την επώασή τους με τα απταμερή που φέρουν φθορίζοντα μόρια για τον εντοπισμό τους.

Το φωτονικό μικροσκόπιο επιτρέπει την εξέταση των καρκινικών κυττάρων, αφού τα περισσότερα κύτταρα έχουν διαμέτρους εντός του εύρους 1–100 μm .¹¹⁶ Στο φωτονικό μικροσκόπιο, το ορατό φως διαπερνά το δείγμα και φτάνει σε γυάλινους φακούς, οι οποίοι με τη σειρά τους διαθλούν το φως με τέτοιο τρόπο ώστε η εικόνα να μεγεθύνεται καθώς προβάλλεται στο μάτι.¹¹⁶ Η μέγιστη διακριτική ικανότητα ενός φωτονικού μικροσκοπίου μπορεί να φτάσει έως και τα 0.2 μm .¹¹⁶

Γενικά, οι εικόνες στο bright-field, βασίζονται στην αντίθεση μεταξύ φωτεινών και σκοτεινών περιοχών, με τα προσκολλημένα κύτταρα να διακρίνονται ως πιο σκοτεινές μορφές. Η μικροσκοπία φθορισμού βασίζεται στην αρχή της δράσης των φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και την εκπέμπουν μετά ως ορατό φως (φθορισμός).¹¹⁶ Το μικροσκόπιο φθορισμού είναι παρόμοιο με αυτό του φωτεινού-πεδίου (bright-field), με τη μόνη διαφορά να έγκειται στην διέλευση του προσπίπτοντος φωτός διαμέσου δύο ομάδων φίλτρων.¹¹⁷ Η πρώτη ομάδα φίλτρων επιτρέπει τη διέλευση μόνο των μηκών κύματος που διεγείρουν τα φθορίζοντα μόρια, ενώ ο φθορισμός που εκπέμπεται από αυτά διαπερνά αποκλειστικά τη δεύτερη ομάδα.¹¹⁷

4. Πειραματική διαδικασία

4.1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της στόχευσης στην παρούσα διπλωματική εργασία συγκεντρώνονται κάτωθι:

1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές: MDA-MB-435, MDA-MB-eb1, MDA-MB-231, NCI-N87.
2. Θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) / Υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (Σύσταση: 4 mM L-γλουταμίνη, 4500 mg/L γλυκόζη και πυροσταφυλικό νάτριο)
3. Βόειος εμβρυακός ορός αίματος.
4. Αντιβιοτικό μίγμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης (Σύσταση: 10 000 Units/mL πενικιλίνη, 10 000 μg/mL στρεπτομυκίνη).
5. Διάλυμα 0.5% v/v τρυψίνης – EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ).
6. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 1×PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4.
7. Διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε 1×PBS.
8. Φθορίζουσα χρωστική DAPI (4',6-διαμίδινο-2-φαινυλινδόλη).
9. Διάλυμα επικάλυψης και μονιμοποίησης Mowiol.
10. Απταμερή συγκέντρωσης 100 μM από τη Sigma Aldrich:
 - **A:** 2.2 DNA aptamer 14nt
5'– GCAGCGGTGTGGGG – [Cyanine 5]
 - **At:** 2.2t DNA aptamer 42nt (τριμερές)
5'– [Cyanine 5] – GCAGCGGTGTGGGG – GCAGCGGTGTGGGG –
GCAGCGGTGTGGGG
 - **B:** Hb5 40nt
5'–TGCACCTTGTCATTTTGTATATGTATTTGGTTTTTGGCTCT – [Cyanine
5]
 - **Γ:** 86C 45nt
5'– [Cyanine 5] –
TGGGGCCTGGATACGGATTGGTAAGGATTAGTAGGGGGCATAGCT
 - **Δ:** HeA2_3 aptamer D
5'–[Cyanine 5] –
TCTAAAAGGATTCTTCCCAAGGGGATCCAATTCAAACAGC

4.2. Μέθοδοι

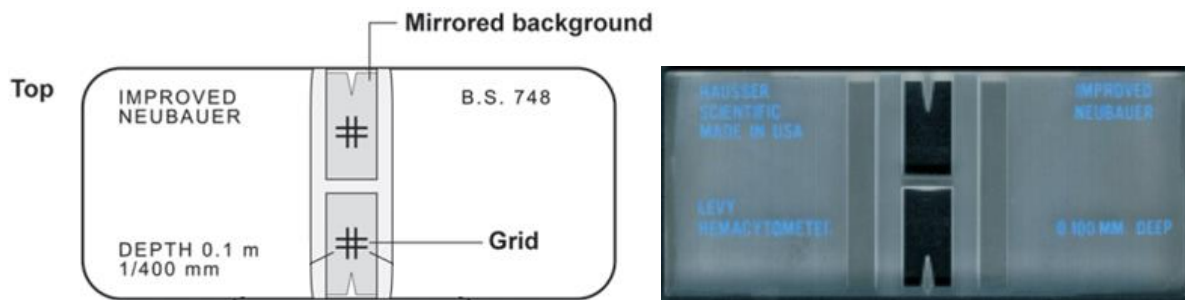
4.2.1. Κυτταροκαλλιέργεια

Όλες οι κυτταροσειρές (MDA-MB-435, MDA-MB-435eb1, MDA-MB-231, MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri από πολυστυρένιο έως ότου φθάσουν να επικαλύπτουν περί το 75% και άνω της επιφάνειας του τρυβλίου, οπότε και ακολούθησε αραίωση και ανακαλλιέργεια (split) των κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων ήταν το θρεπτικό μέσο DMEM/υψηλής γλυκόζης με την προσθήκη 10%v/v βόειου ορού και 1%v/v αντιβιοτικού μίγματος πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν εντός επωαστήρα κυτταροκαλλιεργειών υπό 37°C ροή διοξειδίου του άνθρακα (5% CO₂).

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά αφαιρέθηκε το προηγούμενο θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο της κυτταροκαλλιέργειας και το τρυβλίο με τα προσκολλημένα κύτταρα εκπλύθηκε με διάλυμα 1×PBS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 0.05% τρυψίνης – EDTA σε 1×PBS υπό 37°C και 5%v/v CO₂ για όσο χρόνο απαιτείται για κάθε κυτταροσειρά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε με προσθήκη θρεπτικού υλικού, όγκου 5 φορές μεγαλύτερου σε σχέση με τον όγκο της τρυψίνης, ώστε μετέπειτα τα κύτταρα της ανακαλλιέργειας να μπορέσουν να προσκολληθούν πάνω στο νέο τρυβλίο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της διασποράς των κυττάρων υπό 1500rpm για 10min και παραλαβή του pellet των κυττάρων προς επαναδιάλυσή του με φρέσκο θρεπτικό υλικό στην επιθυμητή πυκνότητα για την ανακαλλιέργεια. Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε νέο τρυβλίο και τα κύτταρα αφέθηκαν να επωαστούν υπό 37°C και 5%v/v CO₂ μέχρι να επιτευχθεί ξανά 75% και άνω επικάλυψη του τρυβλίου.

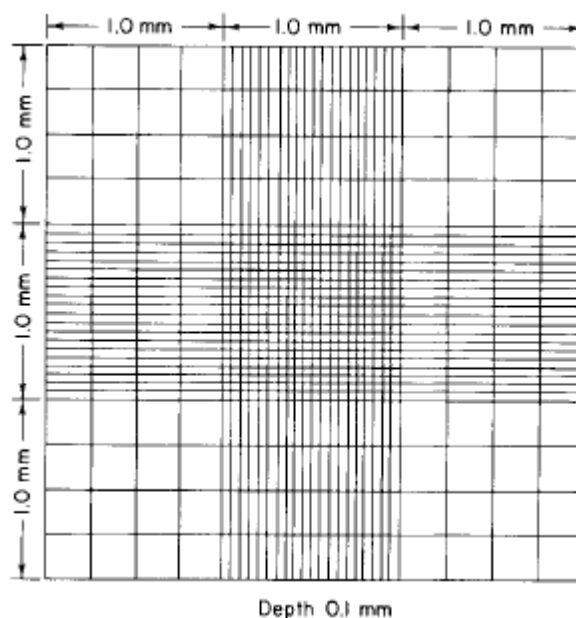
4.2.2. Μέτρηση κυττάρων

Ο καθορισμός της πυκνότητας των κυττάρων για την ανακαλλιέργεια καθοριζόταν από τη μέτρηση των κυττάρων μέσω ενός αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Το αιμοκυτταρόμετρο είναι ένα όργανο που διαθέτει ένα θάλαμο μέσα στον οποίο τοποθετείται η διασπορά κυττάρων, ώστε να μετρηθούν. Η εικόνα μιας τέτοιας διάταξης δίνεται στην *Εικόνα 4.1*:



Εικόνα 4.1: Η διάταξη ενός αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer, σκιαγραφημένη (αριστερά)¹¹⁸ και στην πραγματικότητα (δεξιά).¹¹⁹

Το αιμοκυτταρόμετρο έχει σκιαγραφημένη την εξής διαγράμμιση εντός του θαλάμου:

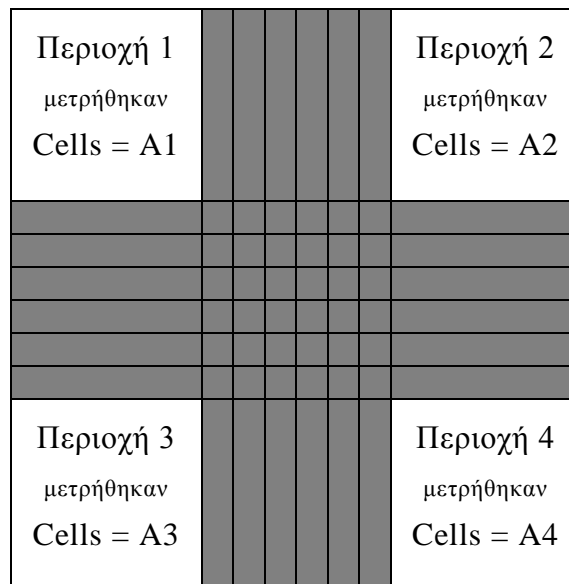


Σχήμα 4.1: Διαγράμμιση του θαλάμου μέτρησης του αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer.¹²⁰

Καταρχάς, για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, απομονώθηκε το pellet αυτών κατόπιν φυγοκέντρησης και αραιώθηκε με θρεπτικό μέσο, σε τέτοιο βαθμό ώστε η πυκνότητα να είναι αρκετά υψηλή. Το αιμοκυτταρόμετρο καθαρίστηκε με αιθανόλη και επικαλύφθηκε με μία γυάλινη καλυπτρίδα προς δημιουργία του θαλάμου. Μόλις 12μL από τη διασπορά των κυττάρων εισήχθησαν μέσα στο αιμοκυτταρόμετρο και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με μεγεθυντικό φακό 10× στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο bright-field. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι μέτρησης των κυττάρων που εισάγονται εντός του

θαλάμου Neubauer. Αυτή που ακολουθήθηκε στην παρούσα πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τη μέτρηση των κυττάρων που εμπεριέχονταν σε 4 συγκεκριμένες περιοχές.

Οι 4 αυτές περιοχές αποτελούνταν από τα 16 τετράγωνα που εικονίζονται πάνω αριστερά, τα 16 τετράγωνα πάνω δεξιά και τα αντίστοιχα αυτών στην κάτω πλευρά, στο Σχήμα 4.1. Τα κύτταρα που συμπεριλήφθηκαν στη μέτρηση έπρεπε να βρίσκονται αποκλειστικά εντός των γραμμών που καθορίζονται από τα 16 αυτά τετράγωνα. Αφότου τα κύτταρα μετρηθούν σε αυτές τις 4 περιοχές, υπολογίζεται ο μέσος όρος, και ο αριθμός κυττάρων που προκύπτει, έστω A , πολλαπλασιάζεται με $\times 10^4$ cells/mL, για την εύρεση της πυκνότητας των κυττάρων. Πιο αναλυτικά:



Σχήμα 4.2: Παρουσίαση της μεθόδου μέτρησης των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Συνολικά κύτταρα που μετρήθηκαν:

$$A1 + A2 + A3 + A4 = B$$

Μέσος όρος:

$$B/4 = \Gamma$$

Άρα, υπάρχουν $\Gamma \times 10^4$ κύτταρα/mL στο διάλυμα που περιέχει τη διασπορά τους. Με χρήση του νόμου της αραιώσης, επιτυγχάνεται η επιθυμητή πυκνότητα κυττάρων για την ανακαλλιέργεια.

4.2.3. Στόχευση κυττάρων με απταμερή

Για τη μελέτη της εξειδίκευσης των απταμερών στη στόχευση, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε πιάτα 48-πηγαδιών και αφήθηκαν να επωαστούν (37°C, 5% CO₂) για δύο μέρες, ώστε να αναπτυχθούν και να προσκολληθούν ισχυρά πάνω στην επιφάνεια του πηγαδιού. Με το πέρας των δύο ημερών και την επίτευξη της επιθυμητής επικάλυψης, ακολούθησε αφαίρεση του θρεπτικού, έκπλυση των κυττάρων με 1×PBS και επώασή τους με τα απταμερή για 1hr στους 37°C. Κάθε διαφορετικό απταμερές επώαστηκε με κάθε διαφορετική κυτταροσειρά, ώστε τελικά να διερευνηθούν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί και να μπορούν έτσι να εξαχθούν συμπεράσματα από την ταυτόχρονη σύγκριση. Με την ολοκλήρωση της επώασης των απταμερών, ακολούθησε έκπλυση με 1×PBS εις διπλούν και μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων με διάλυμα 4% PFA για 15min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Επανάληψη της έκπλυσης με 1×PBS και χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI για 5min και ξανά έκπλυση με 1×PBS. Τελικά, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με Mowiol και εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

4.2.3.1. Σειρές MDA-MB-435 και 435eb1

Αρχικά, για τη μελέτη της πρόσδεσης των απταμερών μελετήθηκαν συγκριτικά οι καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-435 και 435eb1, με την πρώτη να αποτελεί το αρνητικό control (μεταβλητή ελέγχου) εφόσον δεν υπερεκφράζει τον υποδοχέα HER2 και τη δεύτερη το θετικό δείγμα στην υπερέκφραση του HER2, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Σε αυτό το πείραμα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 1μM απταμερούς για κάθε ένα από τα A, At, B, Γ και Δ και στο τέλος εξετάστηκαν με μικροσκοπία φθορισμού υπό μεγέθυνση 40x και χρόνο έκθεσης 500ms για το DAPI και 3sec για το Cy5.

4.2.3.2. Βελτιστοποίηση των συνθηκών στόχευσης

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πρώτο πείραμα στόχευσης κρίθηκε αναγκαία η βελτιστοποίηση των συνθηκών στόχευσης. Η διαδικασία της στόχευσης με απταμερή μπορεί να βελτιστοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη τρεις παραμέτρους, τη διαμόρφωση του απταμερούς κατά την πρόσδεση, τη σύσταση του διαλύματος που χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις και τη μονιμοποίηση των κυττάρων με PFA.

Τα απταμερή αποτελούν ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες και όπως όλα τα νουκλεϊκά οξέα, σχηματίζουν τριτοταγείς διαμορφώσεις στο χώρο.¹²¹ Η αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ σε πειράματα στόχευσης με απταμερή αναφέρεται βιβλιογραφικά η προθέρμανσή τους στους 95°C για 5min και η μετέπειτα ψύξη τους.^{122–126}

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τα ξεπλύματα ήταν 1×PBS. Για την επίτευξη της βέλτιστης απομάκρυνσης των μη-προσδεμένων απταμερών μελετήθηκε τόσο η θερμοκρασία του διαλύματος κατά τα ξεπλύματα (θερμό ή ψυχρό), αλλά και η περιεκτικότητα του σε άλατα. Πιο αναλυτικά, ένα διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα θα απομακρύνει ηλεκτροστατικά ευκολότερα τις νουκλεοτιδικές αλυσίδες, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες. Αναφορικά, σε πλήθος ερευνητικών άρθρων για τις εκπλύσεις απταμερών έχουν χρησιμοποιηθεί 1×PBS σε θερμοκρασία δωματίου (RT, 25°C)^{122–124,127,128}, προθερμασμένο 1×PBS (37°C),¹²⁹ 1×PBS σε θερμοκρασία πάγου,^{130,131} ρυθμιστικό διάλυμα με υψηλή περιεκτικότητα σε άλας^{129,130,132} ή συνδυασμός των δύο τελευταίων.^{126,129,132}

Τέλος, η μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων είναι μια απαραίτητη διαδικασία για την διατήρηση της δομής τους και την αποφυγή των συνεπειών της σήψης εφόσον τα κύτταρα πλέον δεν βρίσκονται ζωντανά σε καλλιέργεια.¹³³ Η χρονική σειρά του βήματος της μονιμοποίησης έγκειται στη σκοπιά από την οποία πραγματοποιείται η μελέτη της πρόσδεσης των απταμερών. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτες που τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν πριν την επώαση με το απταμερές, η πρόσδεση ήταν μόνο επιφανειακή, ενώ όταν η μονιμοποίηση ακολουθούσε την στόχευση, τα απταμερή είχαν τη δυνατότητα να ενσέλθουν και εντός των κυττάρων.^{123,128,132} Οπότε, επιλέχθηκε σε πρώτη φάση η επιφανειακή μελέτη πρόσδεσης με μονιμοποίηση των κυττάρων πριν την επώαση με απταμερή, με την προ-μονιμοποίηση να αποτελεί μία πιθανή μέθοδο καθαρισμού του background προς περιορισμό του θορύβου του σήματος φθορισμού.

Κύτταρα της σειράς MDA-MB-435 σε πυκνότητα 30,000cells/well καλλιιεργήθηκαν σε 48-well plate για 2 ημέρες και ακολούθως υποβλήθηκαν σε πείραμα στόχευσης με 1μM At υπό τις ακόλουθες 6 διαφορετικές συνθήκες (i), (ii), (iii), (iv), (v) και (vi):

Πίνακας 4.2: Σχεδιασμός πειραμάτων προς βελτιστοποίηση των συνθηκών επώασης των απταμερών.

	Θέρμανση απταμερούς 95°C 5min	Fixation πριν το απταμερές	Fixation μετά το απταμερές	Ξέπλυμα με 1×PBS σε RT	Ξέπλυμα με 1×PBS εμποτισμένο 500mM NaCl	Ξέπλυμα με ice- cold 1×PBS	Ξέπλυμα με 1×PBS σε 37°C
(i)	✓		✓	✓			
(ii)			✓	✓			
(iii)			✓		✓		
(iv)			✓			✓	
(v)			✓				✓
(vi)		✓		✓			

Η περίπτωση (ii) αποτέλεσε τη συνήθη διαδικασία που έχει περιγραφεί και παραπάνω. Σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της (i), το απταμερές δεν θερμάνθηκε, ενώ σε όλες εκτός της (vi) η μονιμοποίηση έλαβε χώρα μετά τη επώαση του απταμερούς. Στα πειράματα (iii) έως (v) εξετάστηκαν διαφορετικές συνθήκες έκπλυσης των κυττάρων. Τα πηγάδια με τα καλλιεργημένα κύτταρα μελετήθηκαν σε duplicates για κάθε περίπτωση. Τα κύτταρα απεικονίστηκαν με μικροσκοπία φθορισμού υπό DAPI (400ms) και Cy5 (3sec) και μεγέθυνση 40x.

4.2.3.3. PCR στις σειρές MDA–MB–435 και 435eb1

Η PCR διενεργήθηκε για τον εντοπισμό του μετασηματισμένου πλασμιδίου, εντός της γενετικά τροποποιημένης σειράς 435eb1. Ως control αυτής της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η σειρά MDA–MB–435 που δεν διαθέτει το πλασμίδιο με το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη.

Αρχικά, τα καλλιεργημένα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα τρυβλία (επικάλυψη $\geq 75\%$) με τη χρήση τρυψίνης, φυγοκεντρήθηκαν (1500rpm, 10min) και απομονώθηκαν τα pellet 435 και 435eb1. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL αλκαλικού διαλύματος σε κάθε pellet, σχηματίστηκε ένα ιξώδες ρευστό και λήφθηκε προς θέρμανση στους 95°C για 90min. Σε αυτό το στάδιο διαλύονται τα κύτταρα και μέσα στο μίγμα εμπεριέχεται το DNA που θα αντιγραφεί στην PCR.

Το μίγμα που μπήκε στην PCR είχε την εξής σύσταση:

Πίνακας 4.3: Σύσταση μίγματος Neo-PCR.

Neo-PCR	
DNA δείγματος	1uL
Primer mix 25μM	0.5uL
dNTPs 10mM	0.5uL
Buffer 10x	2.5uL
Taq polymerase	0.15uL
H ₂ O	20.35uL
<i>Vtot</i>	<i>25uL</i>

Δημιουργήθηκαν 4 δείγματα έτοιμα προς PCR:

- 435
- 435eb1
- 435 1/10 (αραίωση)
- 435eb1 1/10 (αραίωση)

Η Neo-PCR διενεργήθηκε για 32 κύκλους και μετά τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel 2% αγαρόζης.

4.2.3.4. qPCR στις σειρές MDA-MB-435 και 435eb1

Εφόσον τα αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση του πλασμιδίου έδωσαν μια ποιοτική εικόνα, ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των κυττάρων 435 και 435eb1 στην πρωτεΐνη HER2. Αρχικά, απομονώθηκαν τα pellets των σειρών 435 και 435eb1, προστέθηκε 0.5mL Trizol σε κάθε ένα και 100uL χλωροφόρμιο. Τα δείγματα ανακινήθηκαν ελαφρώς για να ομογενοποιηθούν και αφέθηκαν για 15min σε RT. Ακολούθησε ψυχόμενη φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (12,000 rpm και άνω) για 15min και έπειτα λήφθηκε η υπερκείμενη φάση που εμπεριέχει το RNA. Προστέθηκε ισοπροπανόλη σε όγκο ½ του Trizol, το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρώς και αφέθηκε για 10min σε RT. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκε για 10min και αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση

προς απομόνωση του pellet. Το pellet εκπλύθηκε με 75% EtOH (in DEPC water), φυγοκεντρήθηκε για 5min ώστε να αφαιρεθεί η EtOH και αφέθηκε να στεγνώσει. Ακολούθησε επαναδιάλυση του pellet σε 40uL DEPC water και θέρμανση στους 55°C για 20min, ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA. Αυτό αποτελεί το τελικό δείγμα RNA των κυττάρων και η συγκέντρωσή του σε RNA μετρήθηκε στο NanoDrop Spectrophotometer:

- $C_{\text{RNA}, 435} = 2\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- $C_{\text{RNA}, 435\text{eb1}} = 1.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Με βάση αυτή τη συγκέντρωση υπολογίστηκε ο όγκος των RNA δειγμάτων για το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο είναι:

Πίνακας 4.4: Σύσταση μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Reverse Transcription	
5×Primer Script	3uL
Primer Script RT	0.75uL
Oligo.dT Primer	0.75uL
Random hexamers	0.75uL
RNA sample	500ng
RNase free water	up to 15uL
<i>Vtot</i>	<i>15uL</i>

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 15min, μετά ακολούθησε θέρμανση στους 85°C για 5s, ώστε να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση και τέλος τα δείγματα ψύχθηκαν στους 4°C. Από αυτήν την αντίδραση προέκυψε το cDNA που εισήχθη στην qPCR.

Πίνακας 4.5: Σύσταση μίγματος αντίδρασης qPCR.

qPCR	
2×buffer (περιέχει SYBR Green, πολυμεράση κ.ά.)	10uL
Primer mix 10μM	0.4uL
H ₂ O	4.6uL
cDNA	5uL
Vtot	20uL

Αφού ετοιμάστηκαν τα δείγματα για την qPCR (σε triplicates), εισήχθησαν στο όργανο Light Cycler 96 – Real Time PCR System για τον υπολογισμό του φθορισμού του DNA προϊόντος που προκύπτει από την αντιγραφή (φθορίζουσα ουσία: SYBR Green).

4.2.3.5. Σειρές NCI–N87 και MDA–MB–231

Εφόσον καθορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες υπό τις οποίες θα διεξαγόταν το πείραμα, η διερεύνηση της στόχευσης των απταμερών συνεχίστηκε με την εισαγωγή μιας φυσικά υπερεκφραζόμενης σειράς στον υποδοχέα HER2, της NCI–N87 του γαστρικού καρκίνου και της τριπλά αρνητικής κυτταρικής σειράς MDA–MB–231, ώστε να ληφθούν καλύτερα συγκριτικά αποτελέσματα.

Η μέθοδος περιλάμβανε την μονιμοποίηση των κυττάρων πριν την επώαση με απταμερή, τη θέρμανση των τελευταίων στους 95°C για 5min προς αποδιάταξη και ξεπλύματα με 1×PBS σε RT. Κύτταρα πυκνότητας 30,000cells/well καλλιεργήθηκαν σε 48-well plate και επώαστηκαν με 0.5μM απταμερούς. Οι φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού λήφθηκαν σε μεγέθυνση 40x και χρόνους έκθεσης DAPI:200ms και Cy5:1sec.

4.2.3.6. Μελέτη επιφανειακής πρόσδεσης απταμερών

Το πείραμα στόχευσης διεξήχθη υπό τις ανωτέρω περιγραφείσες συνθήκες (βλ. Κεφάλαιο 4.2.3.5) για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA–MB–435, MDA–MB–231, MDA–MB–453, NCI–N87 και SKOV–3. Οι εικόνες που προέκυψαν λήφθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού για DAPI:500ms και Cy5:3s και σε μεγέθυνση 40x.

4.2.3.7. Μελέτη ενδοκυττάρωσης των απταμερών

Στο ίδιο πλαίσιο με την προηγούμενη παράγραφο μελετήθηκε η ενδοκυττάρωση των απταμερών στις κυτταρικές σειρές MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-453 και NCI-N87,¹ μόνο που σε αυτήν την περίπτωση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν αφότου παρήλθε η επώασή τους με 0.5μM απταμερούς.

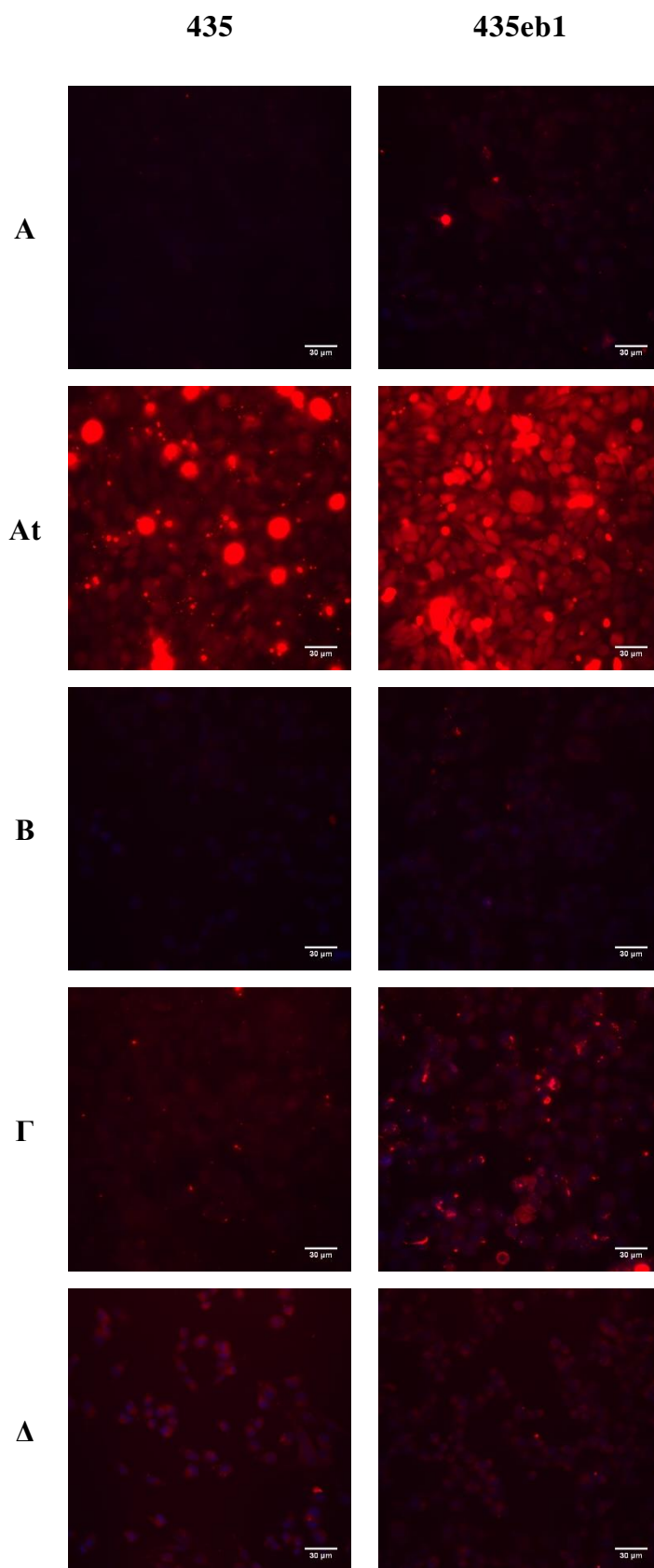
¹ Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων της σειράς SKOV-3 κρίθηκε ανεπιτυχής, οπότε αφαιρέθηκαν από το πείραμα στόχευσης.

5. Αποτελέσματα

5.1. Συγκριτική στόχευση κυττάρων 435 και 435eb1

Οι φωτογραφίες που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ και επισυνάπτονται παρακάτω, με το DAPI να δηλώνεται με το χρώμα μπλε (πυρήνας του κυττάρου) και το Cyanine5 των απταμερών με κόκκινο στην *Εικόνα 5.1*.

Όπως προκύπτει από τις φωτογραφίες, τα απταμερή φάνηκε να μην έχουν εκπλυθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, με το υψηλό σήμα (background noise) να δυσκολεύει την αξιολόγησή τους. Υπό αυτές τις συνθήκες, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί η βελτιστοποίηση των συνθηκών στόχευσης και ο εντοπισμός της διαφοράς στην έκφραση του HER2, μεταξύ των σειρών MDA-MB-435 και 435eb1, για την μετέπειτα εκτίμηση της εξειδίκευσης των απταμερών. Ειδικότερα, το At παρά τον υψηλό φθορισμό που θεωρητικά μεταφράζεται σε ισχυρή πρόσδεση, σχημάτισε αρκετά συσσωματώματα, γεγονός που εισάγει αμφιβολίες, ως προς την προέλευση του υψηλού σήματος. Δηλαδή, πιθανότατα το απταμερές δεν έχει προσδεθεί ισχυρά, απλά παρουσιάζει υψηλό μη επιλεκτικό σήμα λόγω κακής έκπλυσης. Σε δεύτερο επίπεδο, το απταμερές Γ παρουσίασε σημαντικό σήμα, με την εξειδίκευση ως προς τον HER2 να γίνεται διακριτή στη σειρά 435eb1, εφόσον έχει προσδεθεί περισσότερο απταμερές. Συνολικά όμως, δεν μπορούν να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στη στόχευση μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, κάτι το οποίο οφείλεται στη μη επιλεκτική πρόσδεση των απταμερών (non-specific binding) τόσο στην επιφάνεια του τρυβλίου όσο και πιθανότητα σε πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα σε καλλιέργεια (extracellular matrix).



Εικόνα 5.1: Φθορισμός κυτταρικών σειρών MDA-MB-435 και 435eb1 μετά από επώαση με 1 μ M απταμερούς. DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 30 μ m.

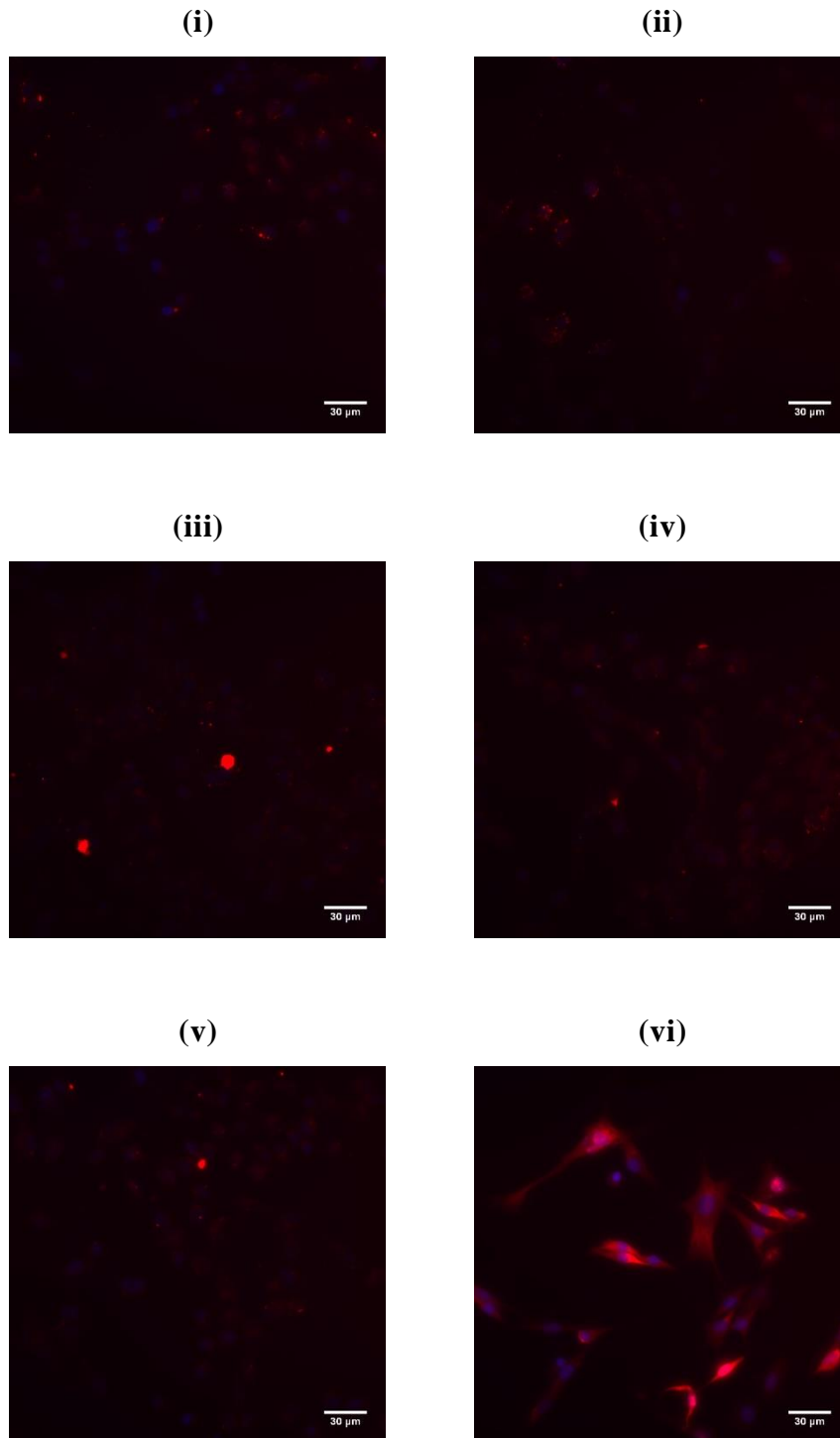
5.2. Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών στόχευσης

Οι εικόνες των κυττάρων MDA–MB–435 από την εφαρμογή των 6 διαφορετικών συνθηκών επώασης με 1μM απταμερούς At, δίνονται στην *Εικόνα 5.2*.

Η διαφορά της εικόνας των κυττάρων στην περίπτωση της μονιμοποίησης πριν την εισαγωγή του απταμερούς είναι εμφανής. Στις περιπτώσεις (i) έως (v) εντοπίζεται και πάλι αρκετό σήμα στο background των κυττάρων, δυσκολεύοντας την ακριβή εκτίμηση της πρόσδεσης του απταμερούς At στα κύτταρα, σε αντίθεση με την εικόνα (vi) όπου το background δίνει σαφώς χαμηλότερο σήμα και το At φαίνεται εξειδικευμένα προσδεμένο πάνω στα κύτταρα. Επιπλέον, το απταμερές At έχει προσδεθεί καθ' όλο το μήκος των κυττάρων, φανερώνοντας το σχήμα ατράκτου αλλά και τις συνδέσεις μεταξύ τους.

Μετά από τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος, καθορίστηκε η συμπερίληψη στη διαδικασία επώασης των απταμερών με τα κύτταρα, της θέρμανσης του απταμερούς στους 95°C για 5min, αλλά και η προ–μονιμοποίηση των κυττάρων προς εξαγωγή των πρώτων εκτιμήσεων χωρίς το θόρυβο του background. Τα ξεπλύματα συνεχίστηκαν με 1×PBS σε RT, καθώς τόσο η υψηλή περιεκτικότητα σε άλας όσο και η μεταβολή της θερμοκρασίας του (θερμό, ψυχρό) δεν επέδειξαν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στο καθάρισμα από το μη–προσδεμένο απταμερές.

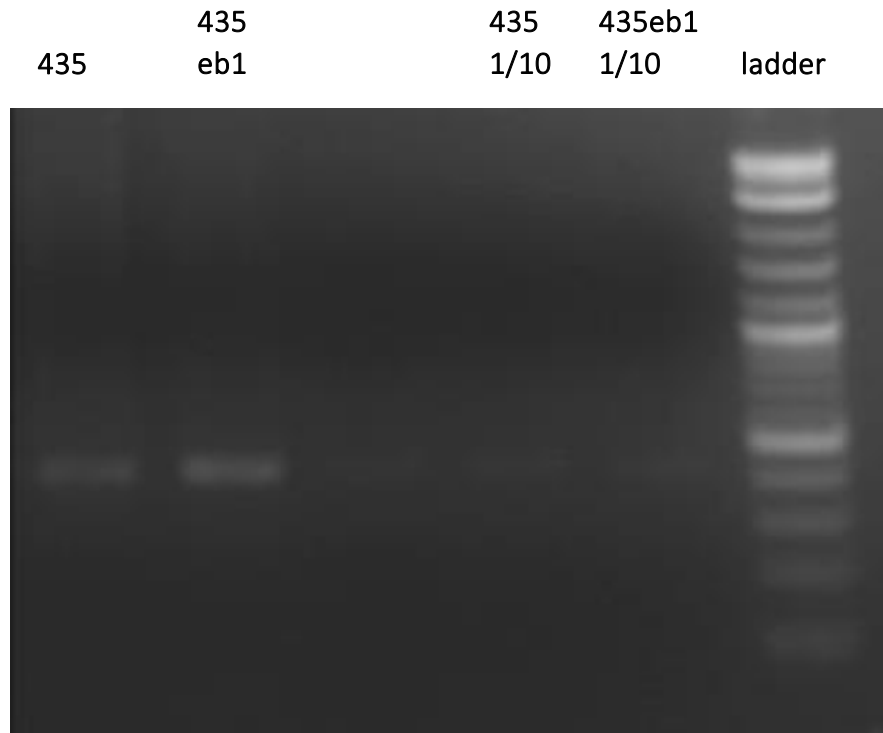
MDA - MB - 435 / a p t a m e r A t



Εικόνα 5.2: Φθορισμός κυτταρικής σειράς MDA-MB-435 μετά από επώαση με 1μM At σε διαφορετικές συνθήκες μονιμοποίησης και ξεπλυμάτων. Όπου (i): At 95°C, (ii):1×PBS,RT, (iii):high salt, (iv):ice-cold 1×PBS, (v):prewarmed 1×PBS, (vi): Pre-fixed cells. DAPI:400ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 30μm.

5.3. Εντοπισμός γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη

Οι μπάντες του γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη που προέκυψαν μετά την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης, είναι οι εξής:



Εικόνα 5.3: Μπάντες του γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη ύστερα από Neo-PCR για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-435 και 435eb1. Τα δείγματα εξετάστηκαν και σε αραιώση 1/10, ενώ δεξιά φαίνεται ο ladder (σκάλα) για τον προσδιορισμό των προκυπτουσών μπαντών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR εντοπίστηκε το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη και στις δύο κυτταρικές σειρές, MDA-MB-435 και 435eb1 κάτι το οποίο σημαίνει ότι και στις δύο κυτταροσειρές ήταν παρόν το πλασμίδιο PSV-neo. Αυτό το γεγονός μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους. Από την μία μεριά, είναι πιθανό η σειρά 435 να περιείχε το αντίστοιχο πλασμίδιο χωρίς όμως το μετασχηματισμό του με το γονίδιο του ErbB2. Είναι δυνατόν λοιπόν η συγκεκριμένη σειρά σκοπίμως να μετασχηματίστηκε με το συγκεκριμένο πλασμίδιο έτσι ώστε να αποτελεί πιο συμβατό δείγμα control για την 435eb1. Από την άλλη δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα να υπήρξε επιμόλυνση των δύο κυτταρικών σειρών κατά την ανακαλλιέργειά τους. Για την μελέτη του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου του HER2 διενεργήθηκε qPCR, καθώς το γονίδιο του HER2 βρίσκεται και στις δύο κυτταρικές σειρές, καθιστώντας την χρήση απλής PCR αδόκιμη.

5.4. Ποσοτική έκφραση του HER2 στα κύτταρα 435 και 435eb1

Τα αποτελέσματα της qPCR, έδειξαν πως τα 435eb1 εκφράζουν 30.3 φορές (30.3–fold) περισσότερο την πρωτεΐνη HER2 από τα MDA–MB–435. Το γεγονός αυτό συνάδει με την πρώτη εκδοχή που προτάθηκε στην προηγούμενη παράγραφο για την παρουσία του πλασμιδίου PSV–neo και στις δύο κυτταροσειρές. Το πλασμίδιο, δηλαδή, χρησιμοποιήθηκε για να μετασηματίσει και την κυτταρική σειρά 435, έτσι ώστε να αποτελεί πιο αξιόπιστο control. Η διαφορά αυτή στο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου παρότι φαίνεται σημαντική, δεν εντοπίστηκε στα επίπεδα φθορισμού κατόπιν επώασης με τα απταμερή (βλ. *Εικόνα 5.1.*), γεννώντας αμφιβολίες για το κατά πόσο αυτή η διαφοροποίηση είναι ικανή να αυξήσει σε τέτοια βαθμό την συγκέντρωση των συγκεκριμένων υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη, ώστε να μετρηθεί διαφορετικό σήμα στον φθορισμό –κατόπιν πρόσδεσης των απταμερών– μιας και η μικροσκοπία φθορισμού είναι λιγότερο ευαίσθητη σαν τεχνική από την qPCR. Γι’ αυτό τον λόγο, κρίθηκε σημαντική η διεξαγωγή ενός πειράματος στόχευσης με απταμερή τόσο κυτταρικών σειρών στις οποίες η πρωτεΐνη HER2 υπερεκφράζεται φυσικά (NCI–N87), καθώς και σειρών με φυσιολογικά επίπεδα έκφρασής της (MDA–MB–231).

5.5. Συγκριτική στόχευση σειρών 435, 435eb1, 231 και N87

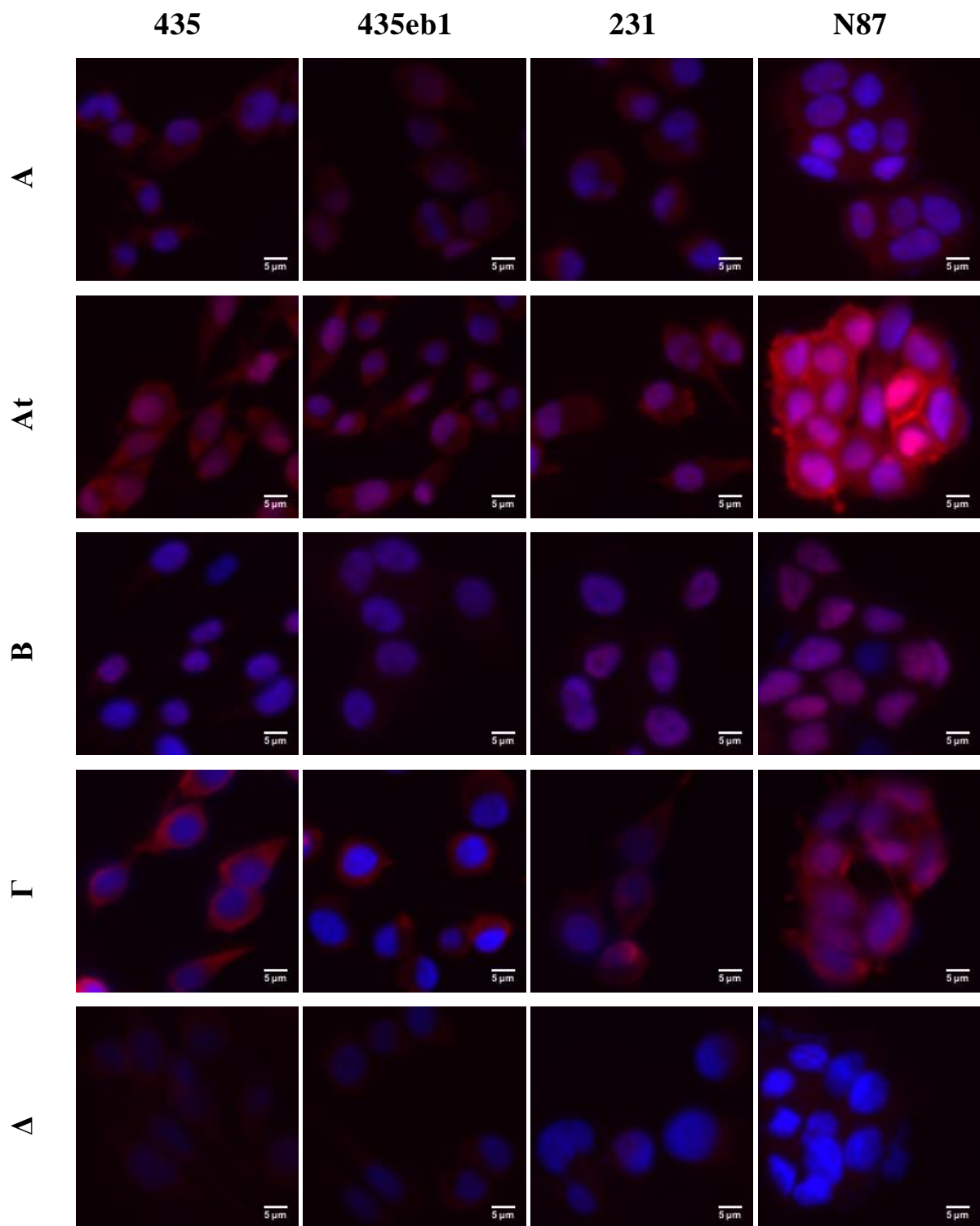
Από τις φωτογραφίες που λήφθηκαν (*Εικόνα 5.4*), κατέστη σαφές πως όλα τα απταμερή προσδένονται κατά προσέγγιση στον ίδιο βαθμό σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, ανεξαρτήτως του ποσοστού έκφρασης του υποδοχέα HER2. Μεταξύ των κυτταρικών σειρών, ξεχώρισε η NCI–N87, καθώς τα απταμερή έδειξαν σημαντική προτίμηση (affinity) στην πρόσδεση επί αυτών των κυττάρων συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Οπότε, στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας η σειρά 435eb1 παραλείφθηκε, μη προσφέροντας έναν θετικό δείγμα στόχευσης για τα απταμερή. Ως προς τα απταμερή, τα Αt και Γ επέδειξαν ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης στα κύτταρα, ενώ το απταμερές Δ, προσδέθηκε πολύ ασθενώς.

Πιο αναλυτικά, το απταμερές Α προσδέθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές, με τα N87 να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο φθορισμό σε ένα συνολικά χαμηλό επίπεδο. Αντιθέτως, το Αt παρουσίασε πολλαπλάσιο σήμα συνολικά, ενώ ειδικά στην κυτταρική σειρά N87 επέδειξε ισχυρή εκλεκτικότητα, επιβεβαιώνοντας τις μελέτες⁶⁸ που θέλουν την τριμερή δομή να προσφέρει υψηλότερα ποσοστά πρόσδεσης στην πρωτεΐνη–στόχο.

Συνεχίζοντας, το απταμερές Β έδειξε ασθενή πρόσδεση στα κύτταρα, με υψηλότερο σήμα στα N87, ενώ το απταμερές Δ φάνηκε να μην έχει μεγάλη χημική συγγένεια με τους υποδοχείς των κυττάρων.^{σχ.2} Τέλος, σημαντικό σήμα έδωσε και το απταμερές Γ, ενώ ενδιαφέρον παρουσίασε η εκλεκτικότητά του, καθώς προσδέθηκε ισχυρότερα στα κύτταρα N87 και πολύ λιγότερο στα 231, ενώ δεν παρουσίασε διαφοροποιήσεις στις σειρές 435 και 435eb1. Ακόμη, αξιοσημείωτη κρίθηκε η υψηλή αναλογία πραγματικού σήματος του απταμερούς Γ ως προς το background.

Με βάση όλα τα παραπάνω, και στην προσπάθεια διεξαγωγής ενός ασφαλούς συμπεράσματος ως προς την επιλεκτικότητα των πέντε διαφορετικών αλληλουχιών υπό εξέταση, η στόχευση προσανατολίστηκε στην σύγκριση κυτταρικών σειρών οι οποίες είτε έχουν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης του HER2 είτε τον υπερεκφράζουν, οπότε απομακρύνθηκε η γενετικά τροποποιημένη σειρά 435eb1 και εισήχθησαν οι φυσικά υπερεκφραζόμενες SK-OV-3 και MDA-MB-453. Επιπλέον, αφαιρέθηκε το απταμερές Δ από το σύνολο των αλληλουχιών, εφόσον δεν επέδειξε σημαντική ικανότητα στόχευσης.

² Στα κύτταρα N87 της *Εικόνας 5.4* το ασθενές σήμα του απταμερούς Δ χάνεται από το φθορισμό του DAPI στους πυρήνες, παρουσιάζοντας ένα ψευδές αποτέλεσμα (artifact) μηδενικής πρόσδεσης.

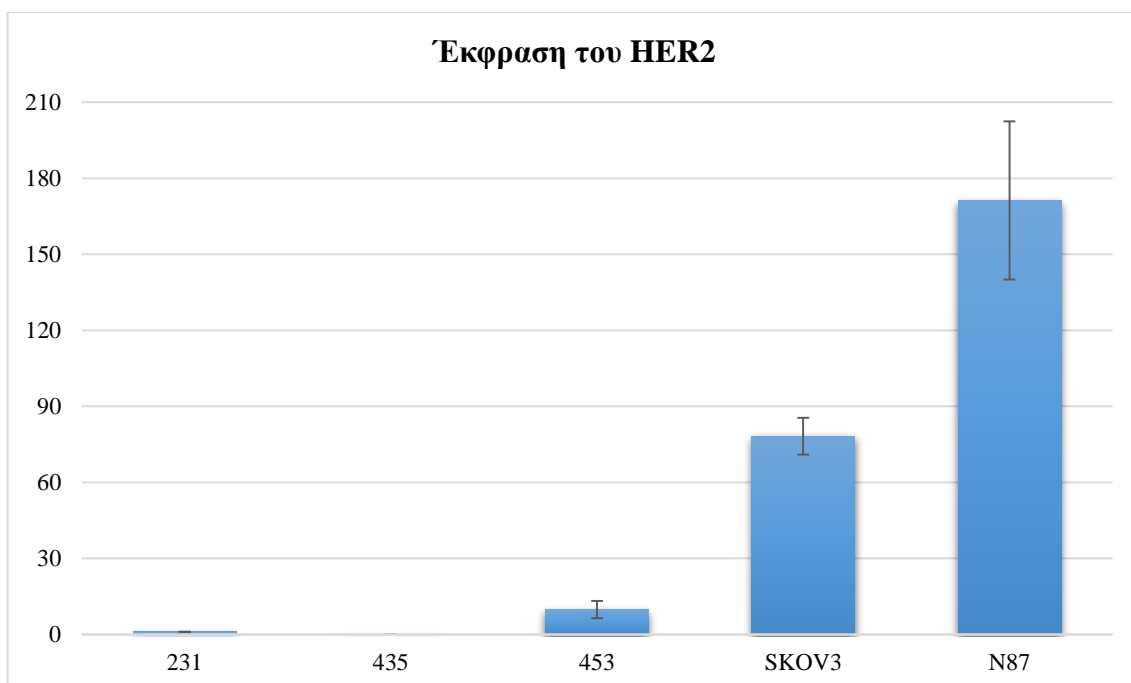


Εικόνα 5.4: Φθορισμός κυτταρικών σειρών MDA-MB-435, 435eb1, MDA-MB-231 και NCI-N87 μετά από επώαση με 0.5μM απταμερούς. DAPI:200ms, Cy5:1s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 5μm.

5.6. Ποσοτική έκφραση του HER2 στις φυσικά υπερεκφραζόμενες σειρές

Το σύνολο των σειρών που αποτέλεσε το δείγμα για το επικείμενο πείραμα στόχευσης, δηλαδή οι MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-453, NCI-N87 και SK-OV-3, υποβλήθηκε σε qPCR για την εξακρίβωση της ποσοτικής έκφρασης του υποδοχέα HER2, ώστε να μπορεί να μελετηθεί η εξειδίκευση ή μη των απταμερών. Δηλαδή, εάν μία κυτταρική σειρά υπερεκφράζει ποσοτικά την πρωτεΐνη HER2 ως προς το δείγμα control, αλλά το απταμερές δεν προσδένεται αναλογικά περισσότερο σε αυτήν, τότε προκύπτει ότι δεν επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη στόχευση του υποδοχέα HER2, κάτι το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Από τη διενέργεια της ποσοτικής qPCR, με χρήση των κυττάρων 231 ως δείγμα control, προέκυψε πως τα N87 εκφράζουν 171 φορές (171-fold) περισσότερο τον HER2 από τα 231, τα SKOV3 εκφράζουν 78 φορές (78-fold) περισσότερο, κα τέλος, τα MDA-MB-453 μόλις 10 φορές περισσότερο (10-fold). Από αυτή τη μέθοδο, προέκυψε πως τα MDA-MB-435 εκφράζουν λιγότερο HER2 από τα 231, με τα τελευταία να υπερέχουν με 15 φορές (15-fold) περισσότερη έκφραση. Οι ποσότητες του HER2 στα 435 και 231 αντικατοπτρίζουν τη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε αυτά τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται συνοπτικά στο *Διάγραμμα 5.1*.



Διάγραμμα 5.1: Συγκριτική έκφραση της πρωτεΐνης HER2 μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, SKOV-3 και NCI-N87.

5.7. Στόχευση φυσικά υπερεκφραζόμενων και μη κυτταρικών σειρών

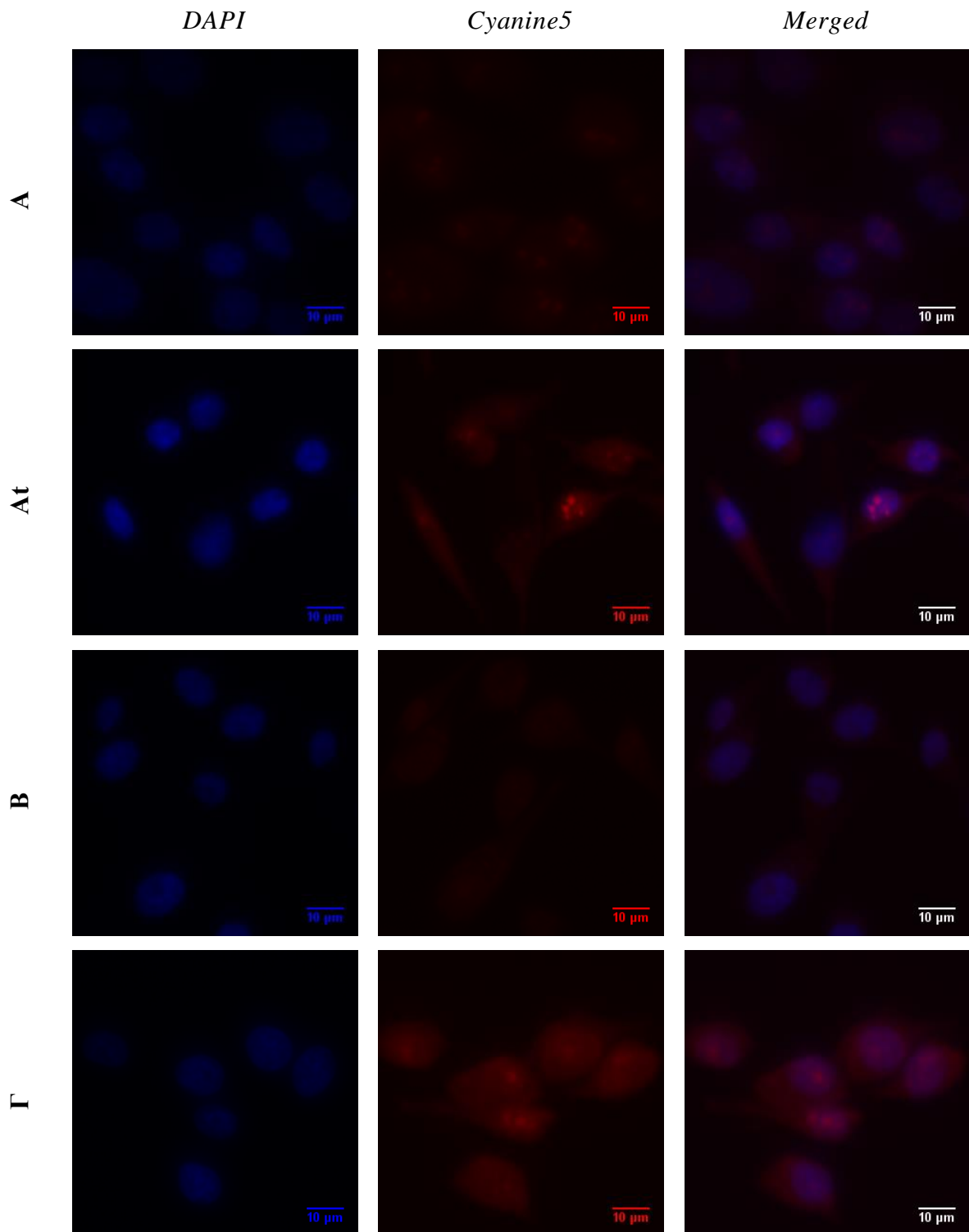
Το πείραμα στόχευσης διεξήχθη σε δύο μέρη με γνώμονα τη μελέτη της επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών σε πρώτο στάδιο και τη δυνατότητα ενδοκυττάρωσης (internalization assay) τους σε δεύτερο. Η ειδοποιός διαφορά βρίσκεται στην εναλλαγή του χρονικού βήματος στο οποίο λαμβάνει χώρα η μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% PFA. Πιο συγκεκριμένα, για την εξωτερική πρόσδεση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν πριν την επώαση με τα απταμερή, ενώ για τη μελέτη της ενδοκυττάρωσης, μετά.

5.7.1. Επιφανειακή πρόσδεση απταμερών

Οι φωτογραφίες των “προ-μονιμοποιημένων” κυττάρων που προέκυψαν από το πείραμα στόχευσης, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ και παρατίθενται στις *Εικόνες 5.5 – 5.9*.

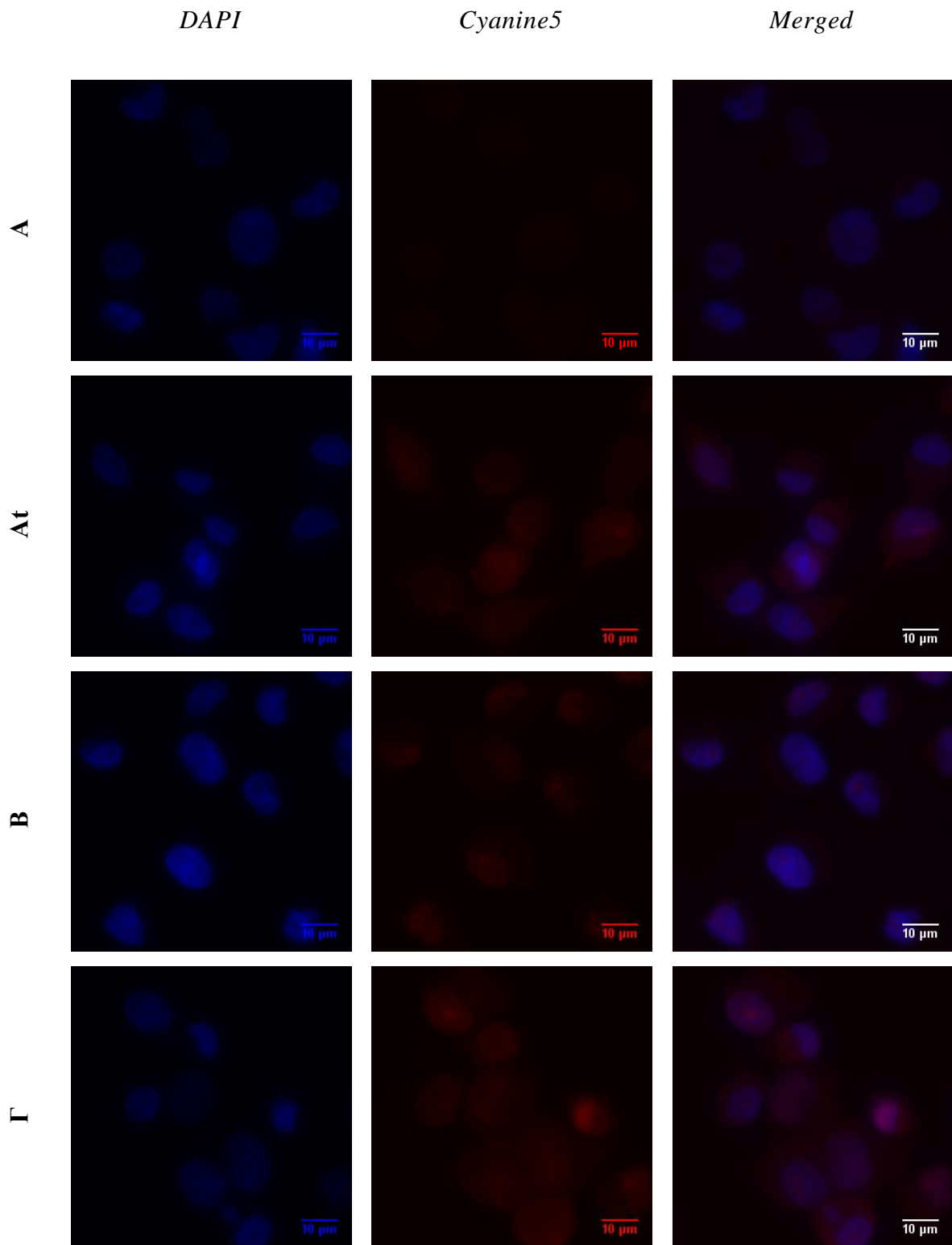
Αμέσως προκύπτει ότι τα απταμερή Αt και Γ προσδένονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές (ακόμα και στα αρνητικά control MDA-MB-435 και MDA-MB-231), ενώ το πιο ισχυρό σήμα φθορισμού που καταγράφηκε μεταφράζεται σε περισσότερο προσδεμένο απταμερές. Τόσο το απταμερές Α όσο και το Β φαίνεται να προσδένονται στα κύτταρα σε χαμηλότερο βαθμό, με το πρώτο να είναι πιο υποσχόμενο ως προς την επιλεκτική στόχευση.

M D A - M B - 4 3 5



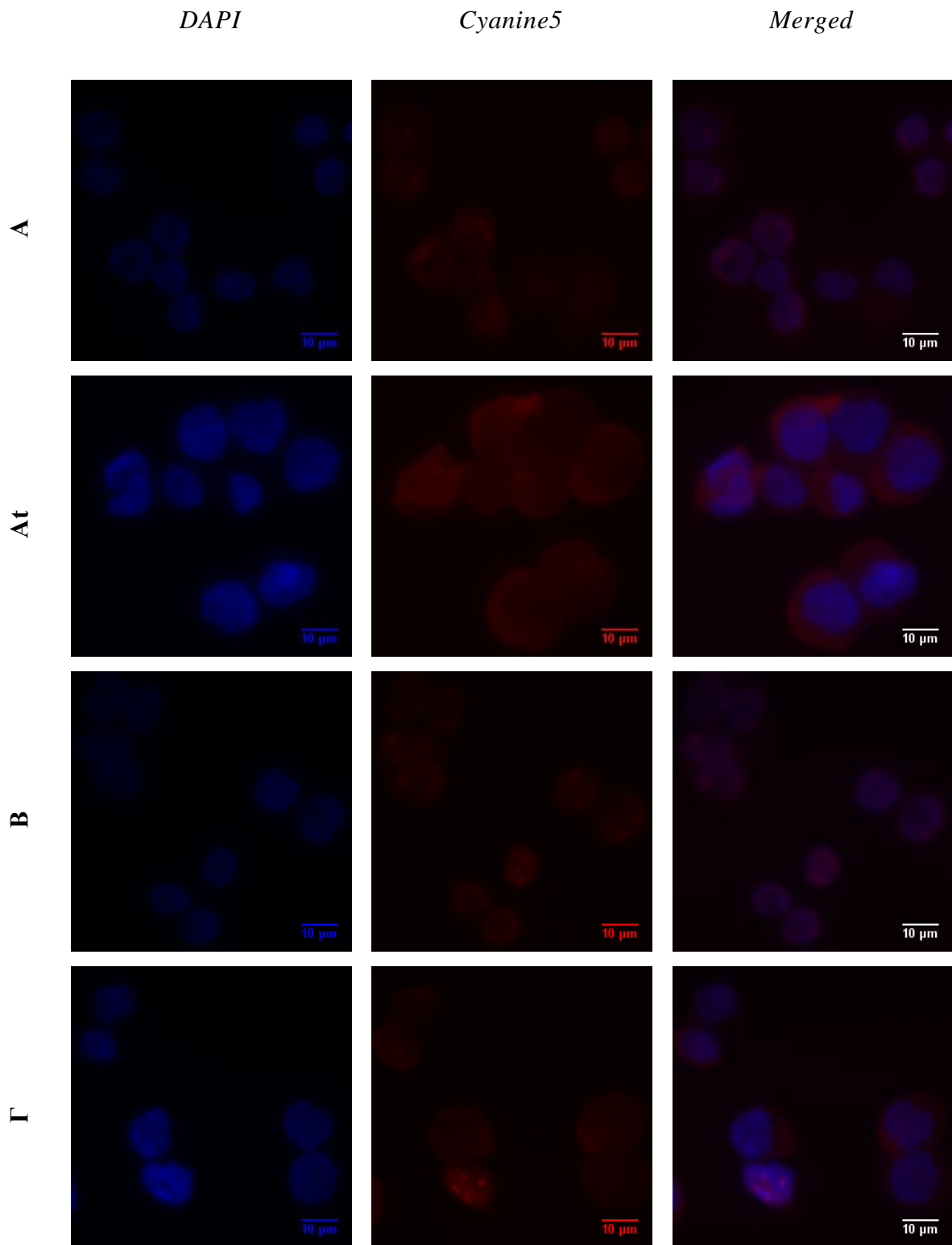
Εικόνα 5.5: Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-435 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm

M D A - M B - 2 3 1



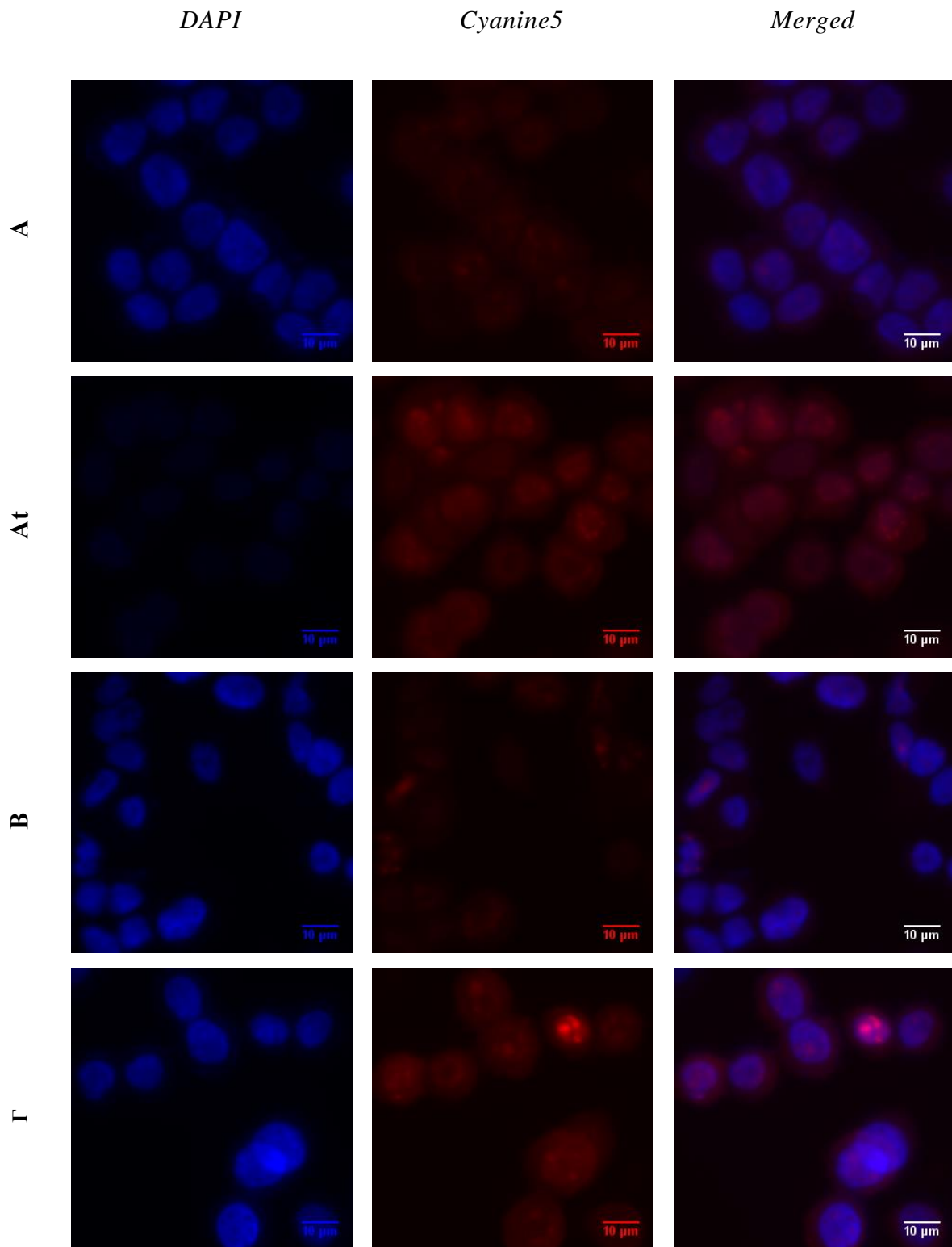
Εικόνα 5.6: Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

M D A - M B - 4 5 3



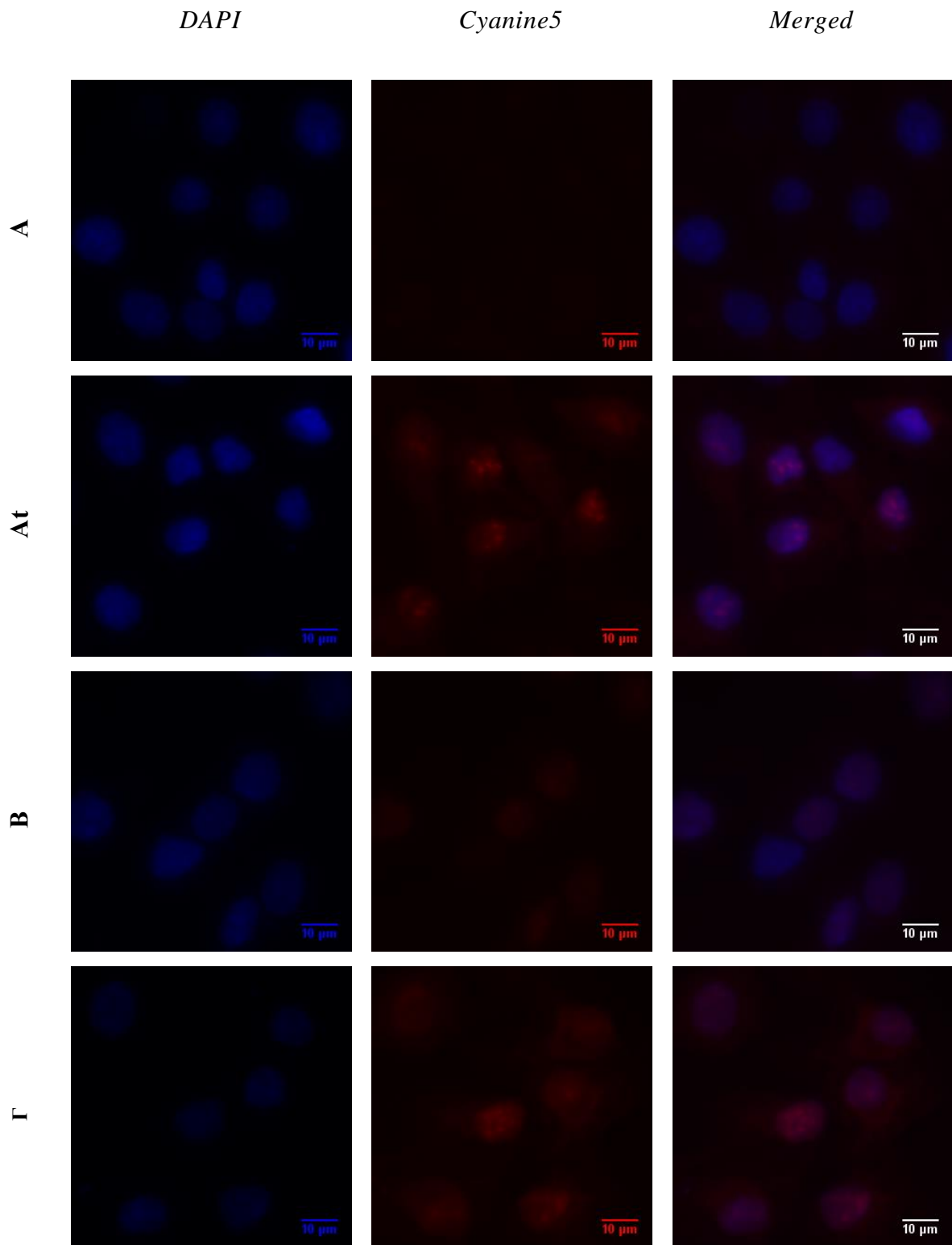
Εικόνα 5.7: Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-453 (επίωση σε 0.5μM). DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

NCI - N 8 7



Εικόνα 5.8: Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του στομάχου NCI-N87 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

S K - O V - 3



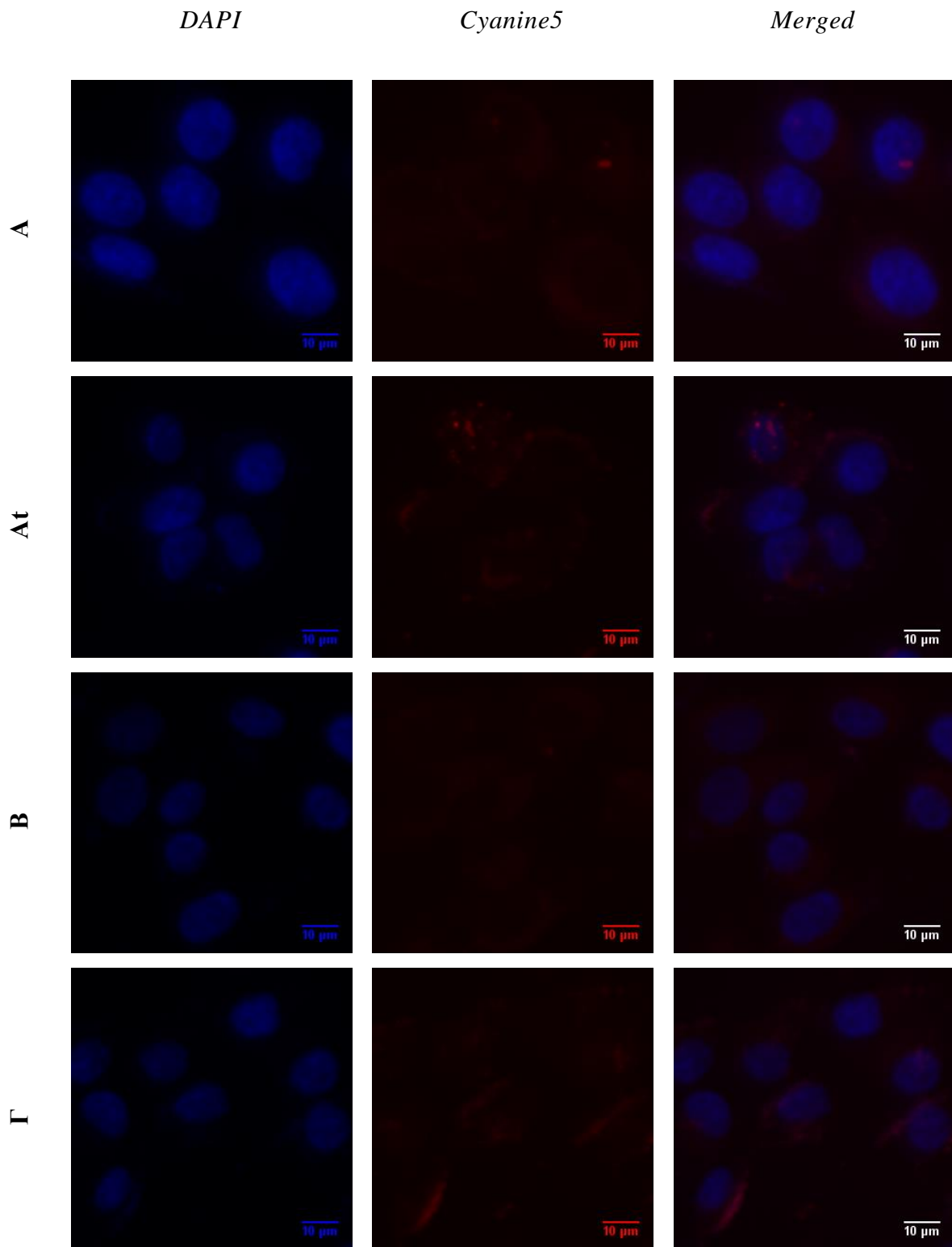
Εικόνα 5.9: Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά των ωθηκών SKOV-3 (επώαση σε 0.5 μ M). DAPI:500ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10 μ m.

5.7.2. Μελέτη ενδοκυττάρωσης των απταμερών

Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της ενδοκυττάρωσης των απταμερών που απεικονίστηκε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (DAPI: 300ms, Cy5: 3s), παρατίθεται στις παρακάτω *Εικόνες 5.10 – 5.13*.

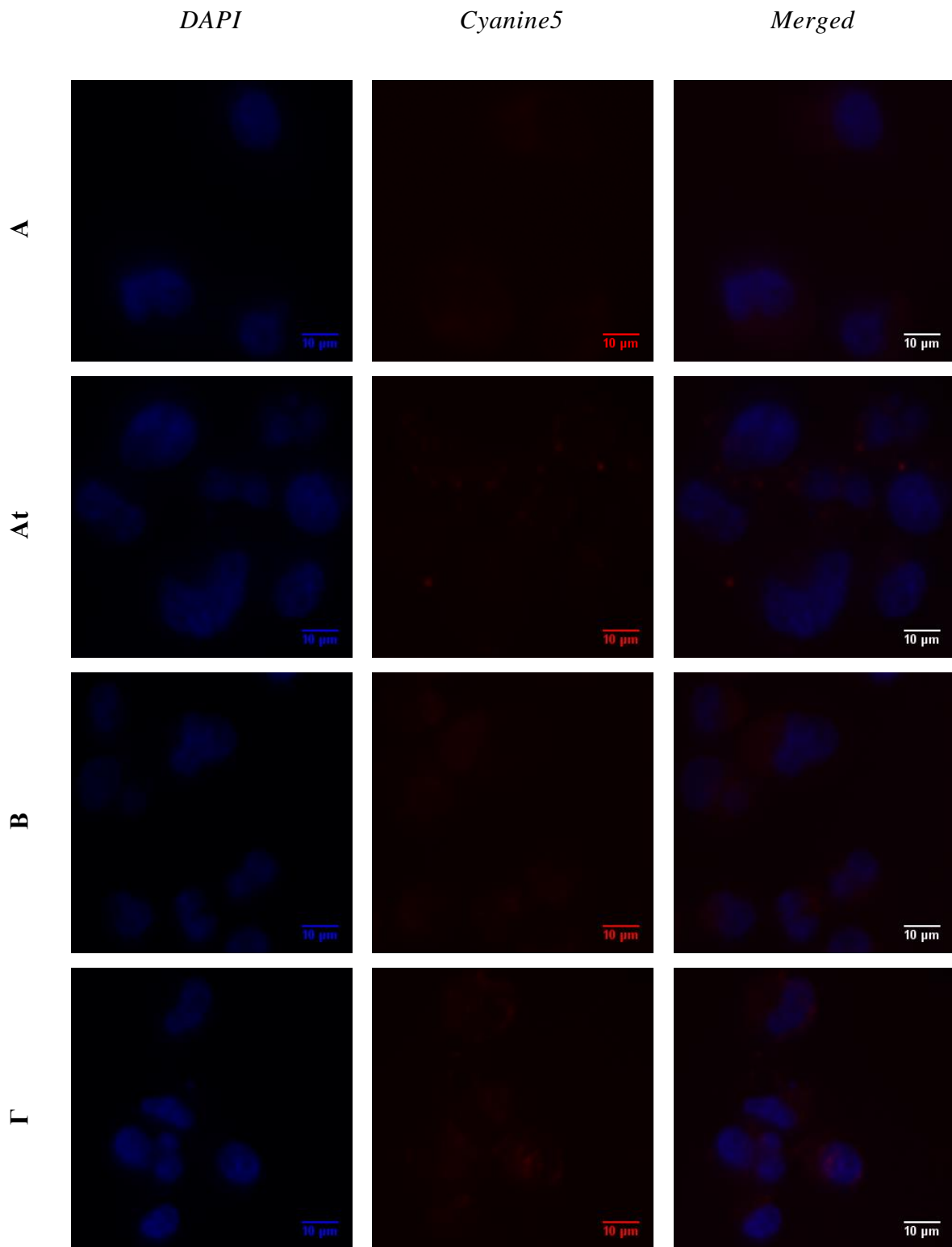
Όσον αφορά στην είσοδο των απταμερών εντός των κυττάρων, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο με τα πειράματα πρόσδεσης των απταμερών σε κύτταρα που είχαν ήδη μονιμοποιηθεί (βλ. *Κεφάλαιο 5.7.1*), με τα απταμερή At και Γ να επιδεικνύουν τον υψηλότερο φθορισμό. Για τις αρνητικές σειρές 435 και 231 δεν είναι εμφανής κάποια σημαντική υπεροχή στην ενδοκυττάρωση μεταξύ των At και Γ, με την τελευταία να παρουσιάζει ελάχιστη ενδοκυττάρωση και των 4 απταμερών. Στα κύτταρα 453 παρατηρείται αξιοσημείωτη ενδοκυττάρωση τόσο του At όσο και του Γ, ενώ στα N87 το απταμερές Γ σαφώς υπερέχει ποσοτικά εντός των κυττάρων.

M D A - M B - 4 3 5



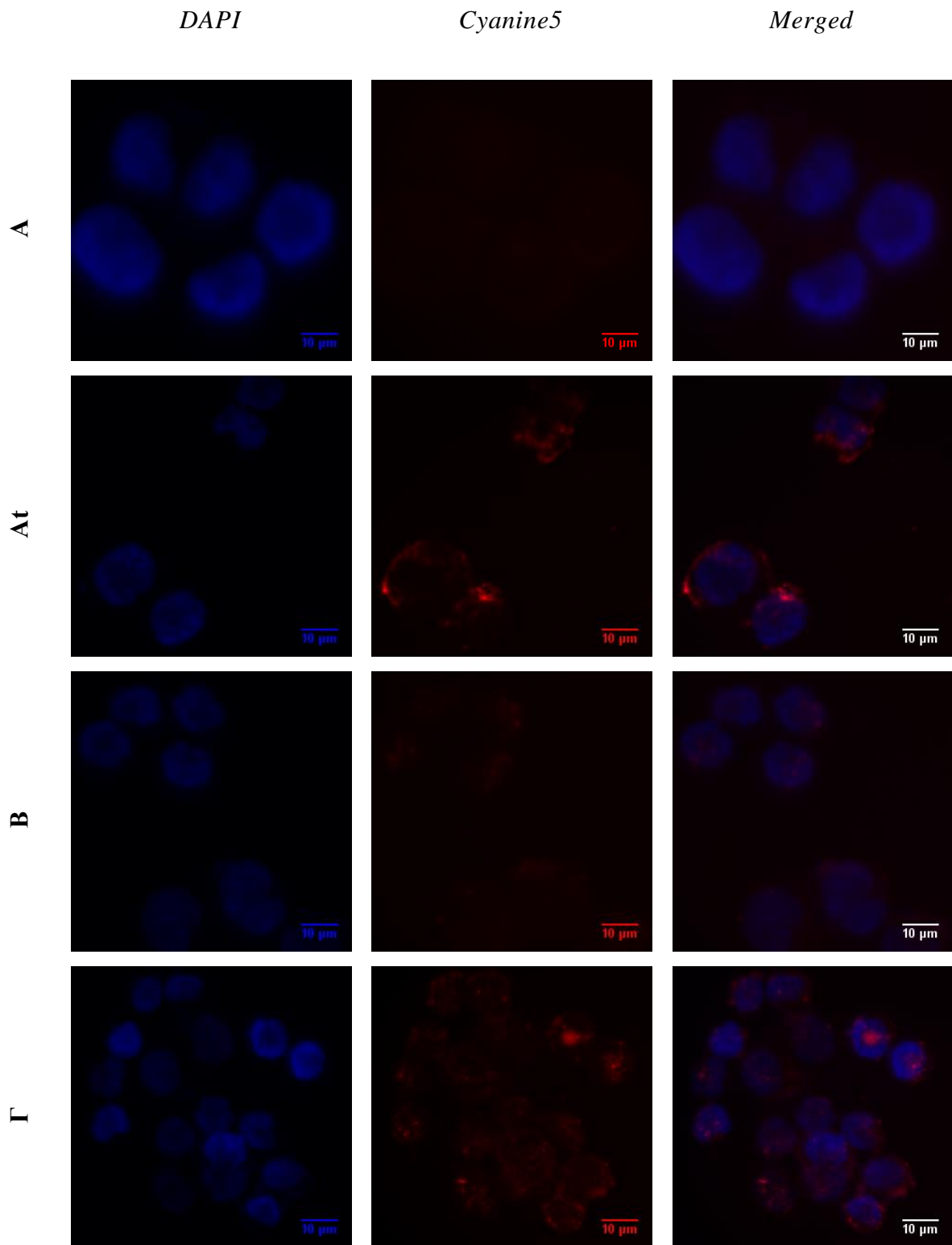
Εικόνα 5.10: Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-435 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:300ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

M D A - M B - 2 3 1



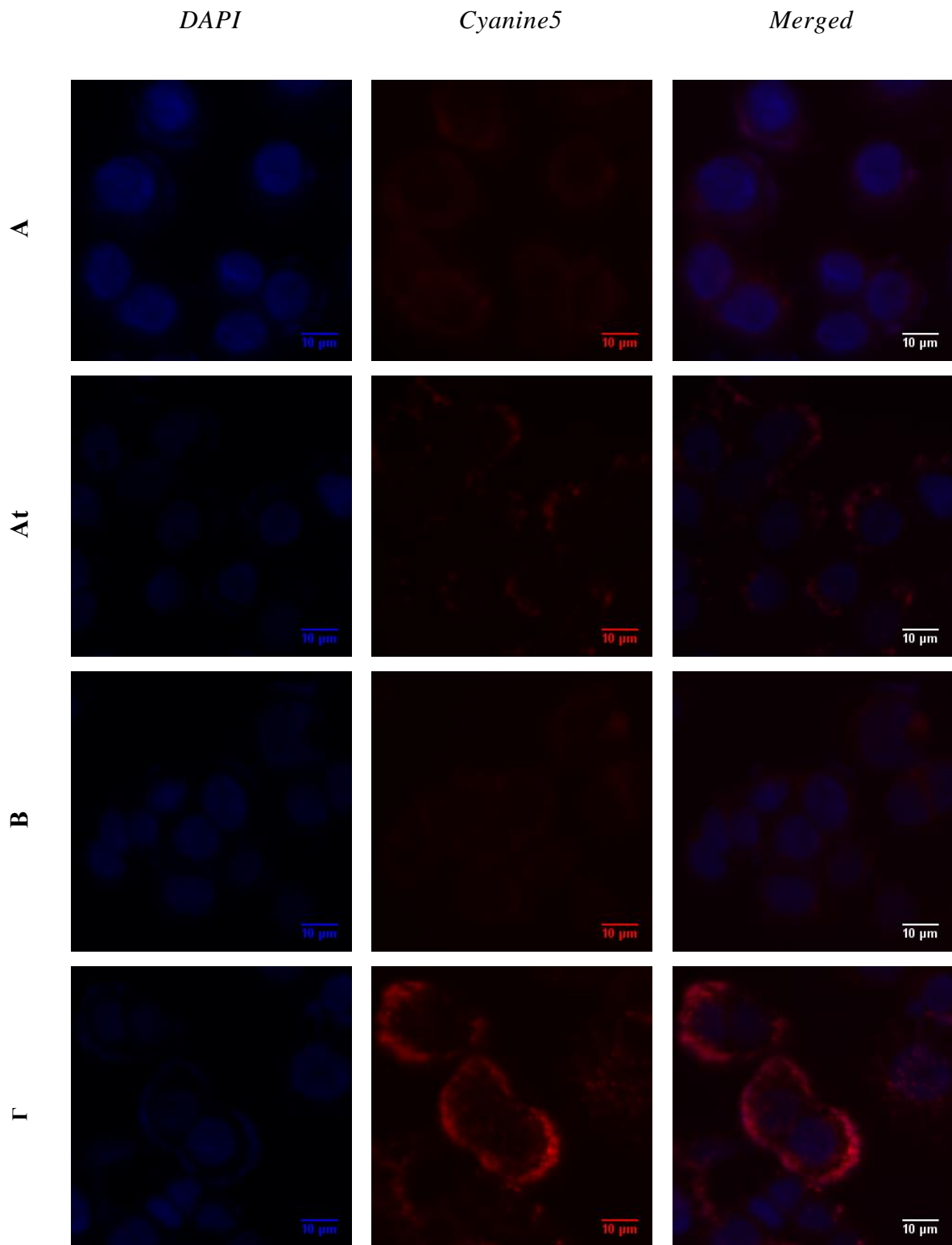
Εικόνα 5.11: Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-231 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:300ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

M D A - M B - 4 5 3



Εικόνα 5.12: Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-453 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:300ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

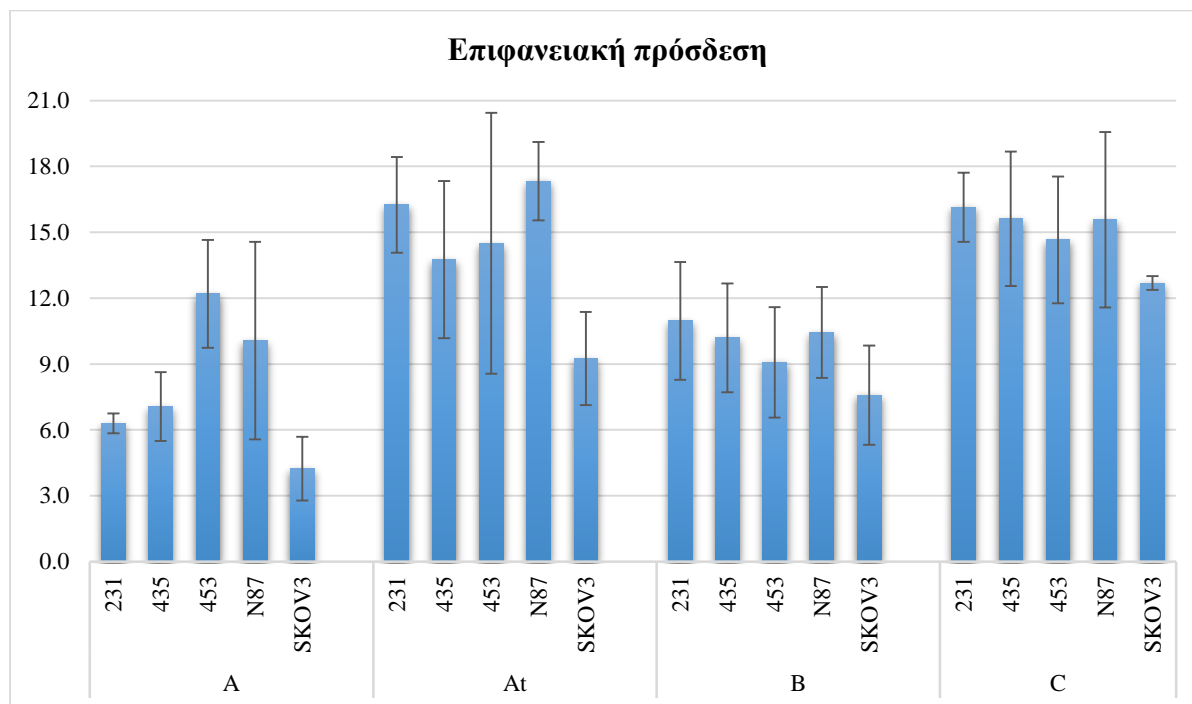
N C I - N 8 7



Εικόνα 5.13: Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του στομάχου NCI-N87 (επώαση σε 0.5μM). DAPI:300ms, Cy5:3s. Φωτογραφίες με μεγέθυνση 40x. Επεξεργασία ImageJ. Scale bar: 10μm.

5.7.3. Ποσοτικοποίηση σήματος

Για την ακριβή εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την εξειδίκευση των απταμερών, τα αποτελέσματα φθορισμού ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ, και προέκυψαν τα εξής διαγράμματα (5.2 και 5.3):

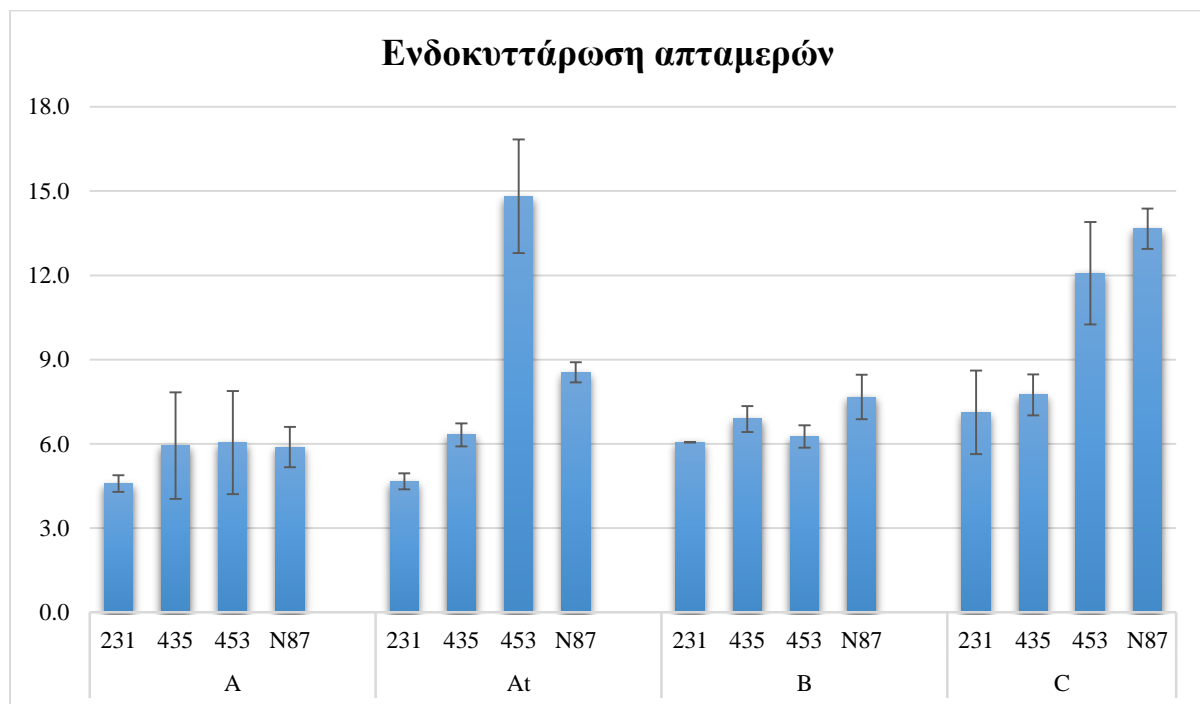


Διάγραμμα 5.2: Συγκριτική παρουσίαση του φθορίζοντος σήματος επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ επί των σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3.

Όπως προκύπτει από τη ποσοτικοποίηση των σημάτων, μεγαλύτερη εξειδίκευση στην επιφανειακή στόχευση του HER2 παρουσιάζει το απταμερές A παρά το χαμηλό αποδιδόμενο φθορισμό. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να προσδέεται το διπλάσιο στα υπερεκφραζόμενα κύτταρα 453, ενώ 1.5 φορές παραπάνω στα κύτταρα N87, σε σχέση με τα αρνητικά control (435 και 231).

Τα απταμερή At, B και Γ παρουσιάζουν αμελητέες διαφορές στην επιφανειακή πρόσδεση μεταξύ των κυτταρικών σειρών, υποδεικνύοντας μη εξειδικευμένη συμπεριφορά ως προς τον HER2, παρά τις βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν το αντίθετο.⁶⁸⁻⁷⁰ Ακόμη, συνολικά, τα απταμερή δεν προσδέθηκαν στον αναμενόμενο βαθμό στα κύτταρα SK-OV-3 με βάση και το αποτέλεσμα της qPCR (βλ. Κεφάλαιο 5.6).

Όλα τα παραπάνω μπορούν να αιτιολογηθούν λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα κύτταρα προέρχονται από διαφορετικές κυτταρικές σειρές διαφορετικών ειδών καρκίνου (μαστού, στομάχου και ωοθηκών), οπότε θα διαθέτουν και διαφορετικό πρωτεϊνικό προφίλ (είδη, αναλογίες, τροποποιήσεις πρωτεϊνών κ.ο.κ.) στην πλασματική τους μεμβράνη. Έτσι, εισάγονται πολλαπλές υποψήφιες θέσεις πρόσδεσης των απταμερών, δυσκολεύοντας το έργο του χαρακτηρισμού της εξειδίκευσής τους αποκλειστικά ως προς τον υποδοχέα HER2.



Διάγραμμα 5.3: Συγκριτική παρουσίαση του φθορίζοντος σήματος από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ επί των σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3.

Όσον αφορά στην ενδοκυττάρωση των απταμερών, τα απταμερή At και Γ παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό εισόδου εντός των υπερεκφραζόμενων σειρών MDA-MB-453 και NCI-N87. Πιο αναλυτικά, το απταμερές At εισέρχεται 3 φορές περισσότερο στα κύτταρα 453 και 1.8 φορές περισσότερο στα N87 σε σχέση με τα 231, ενώ παράλληλα το απταμερές Γ εισέρχεται 1.7 φορές περισσότερο στα 453 και 1.9 φορές περισσότερο στα N87. Παρότι τα N87 εκφράζουν 17 φορές (17-fold) παραπάνω από τα 453 την πρωτεΐνη HER2 σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR, αυτή η πολλαπλάσια διαφορά δεν αντικατοπτρίζεται στη διαφορά του φθορίζοντος σήματος. Το απταμερές B κατάφερε

1.3 φορές μεγαλύτερη πρόσδεση στα κύτταρα N87 σε σχέση με τα 231, αναλογία που ταυτίζεται με αυτήν της αντίστοιχης στόχευσης με το απαμερές A.

6. Συζήτηση

Το γεγονός ότι τα απταμερή στη μελέτη της επιφανειακής πρόσδεσης έδειξαν ένα κοινό μοτίβο συμπεριφοράς για όλες τις κυτταρικές σειρές με εξαίρεση το A, ενώ στη μελέτη ενδοκυττάρωσης τα At και Γ παρουσίασαν υψηλό βαθμό εισόδου στα κύτταρα, καταδεικνύει την πολυπλοκότητα της χρήσης απταμερών για την στόχευση καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, φανερώνει πως η επιλεκτική πρόσδεση των απταμερών και η ενδοκυττάρωσή τους δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την ύπαρξη του πρωτεϊνικού υποδοχέα, αλλά και από έναν αριθμό άλλων παραγόντων όπως το πρωτεϊνικό προφίλ της πλασματικής μεμβράνης.

Ενδεικτικά, και όσον αφορά στην ενδοκυττάρωσή τους, τα απταμερή παρότι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων των νουκλεοτιδίων και θεωρητικά απωθούμενα από την αρνητικά φορτισμένη φωσφολιπιδική κυτταρική μεμβράνη,¹³⁴ κατάφεραν να εισέλθουν εντός των κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στη διαπίστωση πως η ενδοκυττάρωση πραγματοποιείται διαμέσου της μεσολάβησης ενός υποδοχέα (Receptor Mediated Endocytosis, RME).¹³⁵ Είναι πιθανό λοιπόν, η δομή και η σταθερότητα των μεγάλων σε μήκος απταμερών At και Γ (σε σχέση με το A) να τους επέτρεψαν να συμπεριφερθούν ως συνδέτες και να προκάλεσαν την ενδοκυττάρωσή τους κατόπιν πρόσδεσής τους στην επιφάνεια των κυττάρων. Παρότι υπάρχουν και εναλλακτικές θεωρίες για τον μηχανισμό εισόδου των απταμερών στο κύτταρο, όπως αυτή που προτείνεται από τον Wan et al. μέσω της μακροπίνωσης (macropinocytosis)¹³⁶ είναι σαφής η σημασία της δισδιάστατης και τρισδιάστατης δομής των απταμερών στην δράση τους.

Όσον αφορά στις δομές που μπορούν να προσλάβουν τα απταμερή, η σταθερότητα των πιθανών διαμορφώσεων είναι ένας από τους λόγους πίσω από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στα πειράματα πρόσδεσής τους στην πλασματική μεμβράνη. Μέσω του λογισμικού m-fold που βρίσκεται στην ιστοσελίδα <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold> μπορούν να εκτιμηθούν οι πιθανές διαμορφώσεις των νουκλεϊκών οξέων. Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, λοιπόν, εκτιμήθηκαν οι πιθανές δευτεροταγείς δομές που λαμβάνουν τα χρησιμοποιούμενα DNA απταμερή στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Αυτές οι εκτιμήσεις προκύπτουν από έναν μαθηματικό αλγόριθμο, σχεδιασμένο να υπολογίζει την ελεύθερη ενέργεια Gibbs (Gibbs free energy) ($\Delta G < 0$) που απαιτείται για το σχηματισμό βρόχων και διακλαδώσεων. Στη συγκεκριμένη

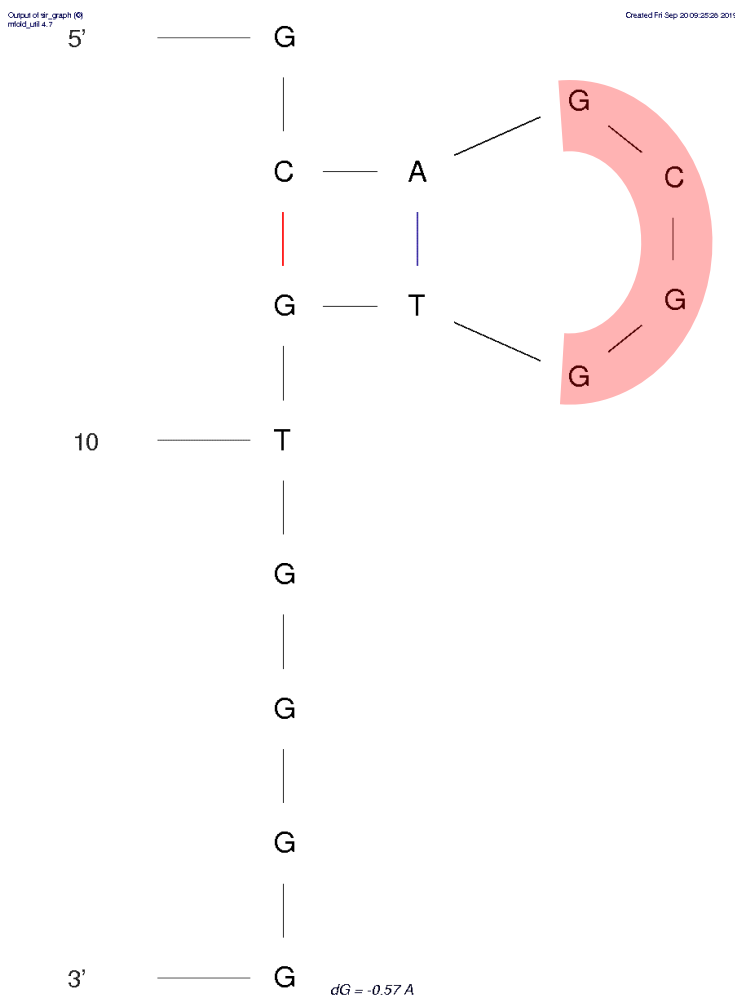
περίπτωση, για την θεώρηση των πιθανών δομών που λαμβάνουν τα απταμερή, εισήχθησαν οι αλληλουχίες τους, η θερμοκρασία επώασης με τα κύτταρα, δηλαδή 37°C, και η περιεκτικότητα του μέσου επώασης σε άλατα. Το μέσω επώασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το θρεπτικό μέσο DMEM και από τη σύστασή¹³⁷ του υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ιόντων $[Na^+] = 154.9085mM$ και $[Mg^{2+}] = 0.811mM$. Ανάμεσα στις υπογήφειες διαμορφώσεις που προτάθηκαν, επιλέχθηκαν αυτές με τη μεγαλύτερη ελεύθερη ενέργεια Gibbs (κατά απόλυτη τιμή) ως οι πιο θερμοδυναμικά σταθερές. Οι ενέργειες ΔG που βρέθηκαν είναι $-0.57 kcal/mole$, $-13.52 kcal/mole$, $-4.81 kcal/mole$, $-9.05 kcal/mol$ και $-9.63 kcal/mol$ για τις δομές των απταμερών A, At, B, Γ και Δ αντίστοιχα. Οι προτεινόμενες διαμορφώσεις παρατίθενται στην *Εικόνα 6.1*.

Από τα άνωθι προκύπτει ότι με βάση την ελεύθερη ενέργεια Gibbs το απταμερές At παρουσιάζει τη μεγαλύτερη σταθερότητα ($\Delta G_{At} = -13.52 kcal/mol$), με τα Γ ($\Delta G_{\Gamma} = -9.63 kcal/mol$), B ($\Delta G_B = -4.81 kcal/mol$) και A ($\Delta G_A = -0.57 kcal/mol$) να ακολουθούν σε φθίνουσα σειρά. Ακόμη, η σταθερότητα των απταμερών εξασφαλίζεται από τους σχηματιζόμενους δεσμούς μεταξύ των ζευγών αζωτούχων βάσεων. Οπότε, όσο περισσότερες βάσεις συνιστούν ένα απταμερές τόσο πιο σταθερό θα είναι λόγω των δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ τους κατά την αναδίπλωσή του. Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 6.1* τα απταμερή με τη μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα At και Γ, παρουσιάζουν διαμορφώσεις με μακριά stems αρκετών ζευγών βάσεων.

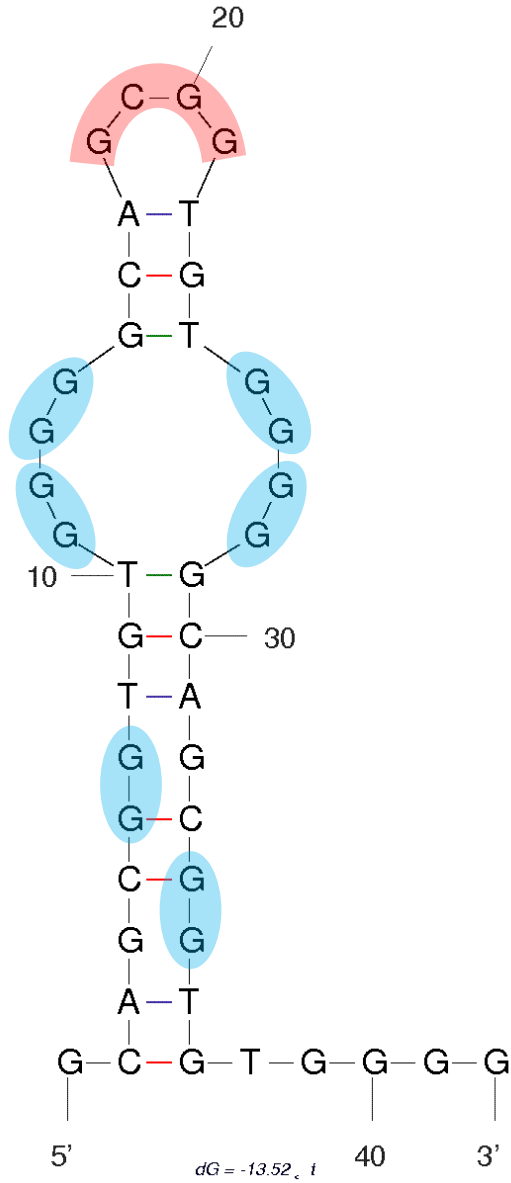
Έκπληξη αποτελεί η αρκετά χαμηλού βαθμού πρόσδεση του απταμερούς Δ, καθώς εμφανίζει ελεύθερη ενέργεια $\Delta G_{\Delta} = -9.63 kcal/mol$. Η επιλογή αυτού του απταμερούς έγινε μέσα από whole-cell SELEX με τα κύτταρα-στόχους να ανήκουν στην υπερεκφραζόμενη στον HER2 σειρά καρκίνου του μαστού SKBR-3,⁷¹ χωρίς όμως να εξασφαλίζεται ότι το συγκεκριμένο απταμερές προσδένεται πράγματι στον υποδοχέα HER2. πράγμα που γεννά αμφιβολίες ως προς την εξειδίκευση αυτού του απταμερούς και κατά συνέπεια μπορεί να εξηγήσει και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν.

πρόσδεσης, ενώ κατά την ενδοκυττάρωση τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα ελήφθησαν από τα απταμερή Αt και Γ. Σε αυτή τη βάση ερευνήθηκε η ύπαρξη κάποιας κοινής αλληλουχίας που μοιράζονται τα τρία απταμερή, η οποία θα εξηγούσε τη χημική συγγένεια πρόσδεσης, και, στην περίπτωση των δύο τελευταίων, την ενδοκυττάρωσή τους.

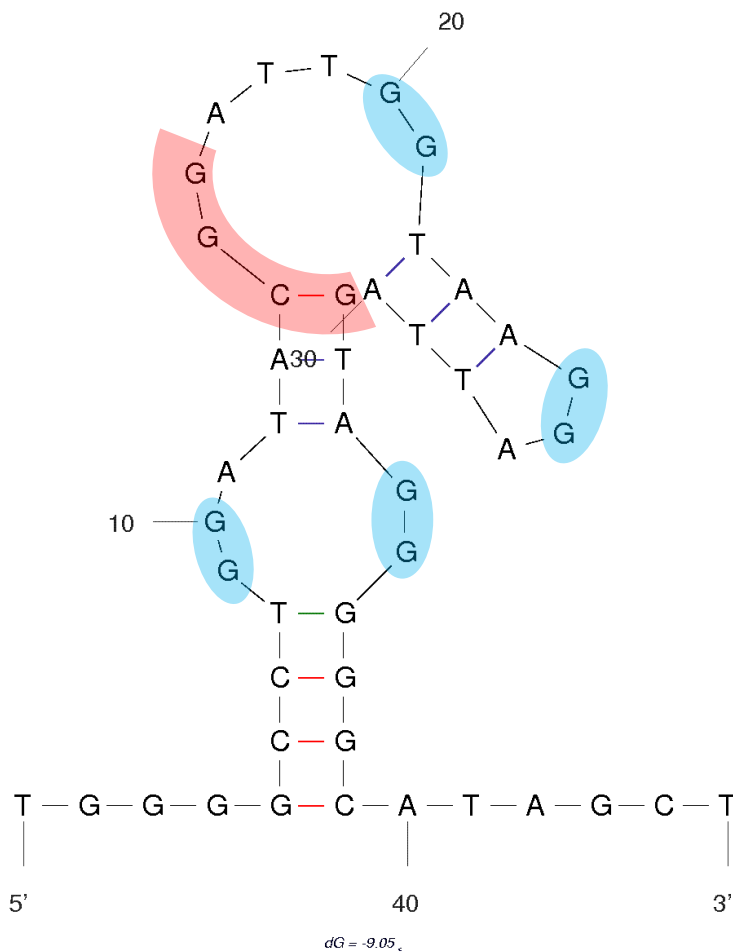
Σύμφωνα με αναφορές,^{138,139} η λειτουργικότητα των απταμερών στηρίζεται στη δημιουργία loops και stems καθ' όλο το μήκος της αλληλουχίας τους, με τη θέση αναγνώρισης (recognition site) του στόχου να εμπεριέχεται στα σχηματιζόμενα loops. Λαμβάνοντας υπόψη αυτήν την πληροφορία και δεδομένης της εξειδίκευσης που παρουσίασαν τα απταμερή Α, Αt και Γ, εντοπίζεται η αλληλουχία G-C-G-G στη δομή του loop και των τριών απταμερών, όπως φαίνεται στις *Εικόνες 6.2-6.4*. Η συγκεκριμένη αλληλουχία δεν εντοπίζεται στα απταμερή Β και Δ, δίνοντας μια πιθανή αιτία για την χαμηλότερη πρόσδεσή τους.



Εικόνα 6.2: Η πιθανή θέση αναγνώρισης, G-C-G-G (κόκκινο), του στόχου στο απταμερές Α.



Εικόνα 6.3: Η πιθανή θέση αναγνώρισης, G-C-G-G (κόκκινο), του στόχου στο απαμερές At και τα ζεύγη G-G (μπλε) που προωθούν το σχηματισμό δομής G-quadruplex.



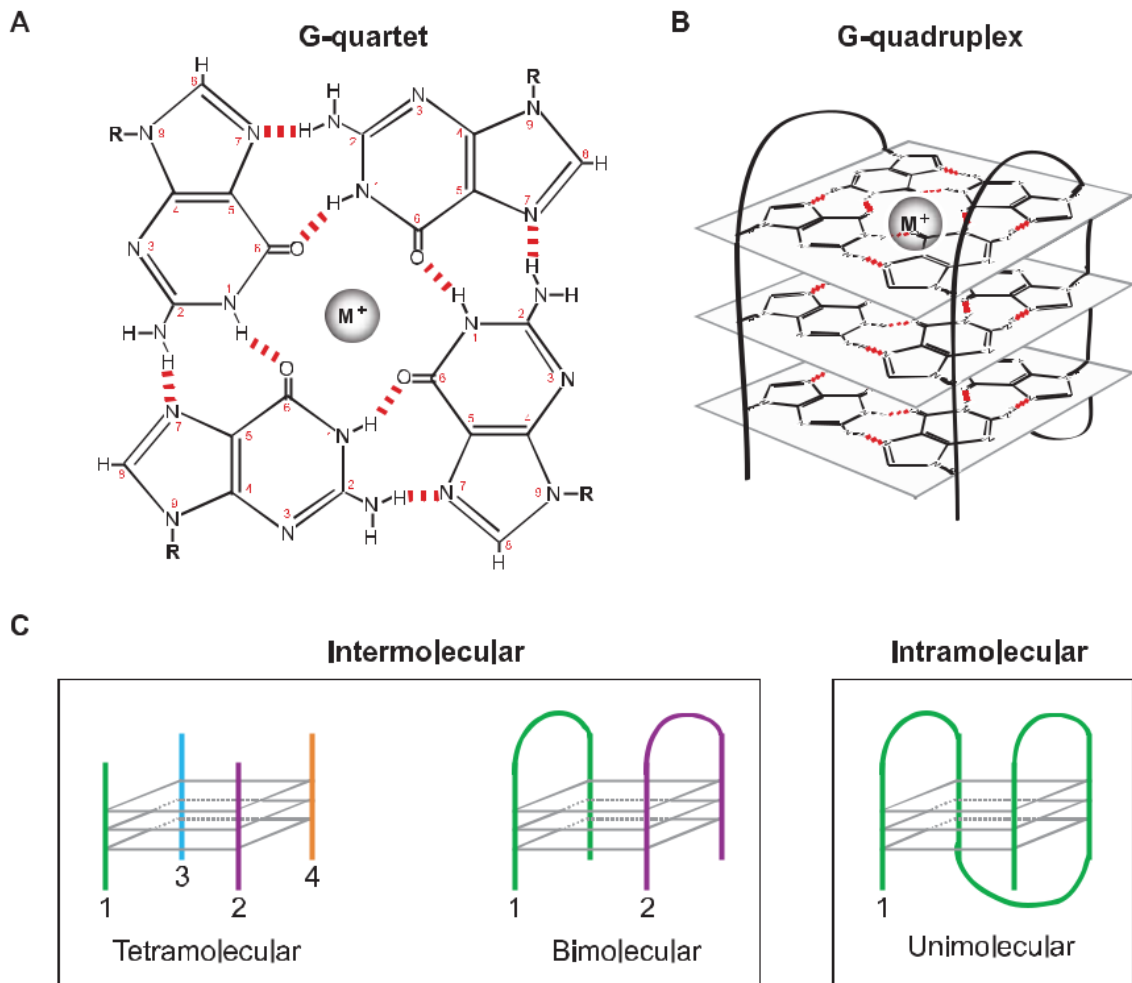
Εικόνα 6.4: Η πιθανή θέση αναγνώρισης, G–C–G–G (κόκκινο), του στόχου στο απταμερές Γ και τα ζεύγη G–G (μπλε) που προωθούν το σχηματισμό δομής G–quadruplex.

Πέραν τούτων, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι πολλά μόρια που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές στόχευσης εμφανίζουν ιδιότητες μετασχηματισμού της δομής τους (structure switching) παρουσία του αναλύτη–στόχου.¹⁴⁰ Πιο αναλυτικά, παρουσία του αναλύτη τα μόρια αποκτούν μια πιο ανταγωνιστική δομή ικανή να προσδεθεί στο στόχο, ενώ εν τη απουσία, αναδιπλώνονται χάνοντας τη δυνατότητα πρόσδεσης.¹⁴⁰ Αυτή η μεταβολή είναι πολύ κοινή στις ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες, φέρνοντας τα απταμερή στο προσκήνιο.¹⁴⁰ Οι αλυσίδες ανάλογα με τη σύστασή τους σε αζωτούχες βάσεις μπορούν να σχηματίσουν διαφορετικές δομές. Οι πλούσιες σε γουανίνη αλυσίδες οδηγούνται σε διαμόρφωση G–quadruplex, ενώ οι πλούσιες σε κυτοσίνη σχηματίζουν δομές i–motif.^{141,142}

Παρατηρώντας τις αζωτούχες βάσεις που συνιστούν τα απταμερή At και Γ, γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη αρκετών ζευγών G–G (σημασμένα με μπλε χρώμα στις *Εικόνες 6.3–*

6.4) τα οποία θα μπορούσαν μέσω της αναδίπλωσης του μορίου να σχηματίσουν μια G–quadruplex δομή, τέτοια ώστε να προεξέχει η αναγνωριστική αλληλουχία G–C–G–G. Δυστυχώς δεν υπάρχει κάποιο λογισμικό το οποίο να μπορεί να προβλέψει την δημιουργία αυτών των δομών. Παρόλα αυτά, η δυνατότητα των απταμερών At και Γ να αναδιπλωθούν στον χώρο αποκτώντας μια G–quadruplex δομή μπορεί να εξηγήσει την υψηλή εξειδίκευση που παρουσιάστηκε κατά τη στόχευση των καρκινικών σειρών, καθώς η τελευταία σταθεροποιεί την δομή του απταμερούς.

Αρκετά απταμερή παρουσιάζουν G–quadruplex δομές, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το υψηλά εξειδικευμένο απταμερές AS1411 που έχει αντικαρκινική δράση¹⁴³ (βλ. *Κεφάλαιο 2.2.3.2*). Η G–quadruplex δομή διαμορφώνεται μέσα από τη διαστρωμάτωση επιπέδων, τα οποία σχηματίζονται μεταξύ των γουανινών ενός ολιγονουκλεοτιδίου (κάθε επίπεδο ορίζεται από 4 γουανίνες).¹⁴² Η δομή αυτή σταθεροποιείται στο χώρο με την ύπαρξη ιόντων μονοσθενών μετάλλων, όπως Na⁺, Li⁺ και K⁺, με το τελευταίο να είναι το πιο σύνηθες.¹⁴² Ένα αντιπροσωπευτικό σχήμα της G–quadruplex δομής, δίνεται παρακάτω.¹⁴⁴



Σχήμα 6.1: Διαμόρφωση G–quadruplex, όπου (A): Η δομή μίας ομάδας 4 γουανινών (G–quartet) παρουσία ενός μονοσθενούς μετάλλου, (B): Η διαμοριακή διαμόρφωση του ολιγονουκλεοτιδίου σε G–quadruplex τριών επιπέδων/G–quartets και (C): Από αριστερά προς τα δεξιά, η διαμόρφωση G–quadruplex δομών με 4 διαφορετικούς κλώνους, με 2 διαφορετικούς κλώνους και με 1 μοναδικό κλώνο.¹⁴⁴

Ο Mahlknecht et al. που απομόνωσε τα απταμερή A και At⁶⁸ σε μια επόμενη δημοσίευση του το 2015,⁶⁸ κατέληξε στο συμπέρασμα πως η δομή του τριμερούς At συνίσταται από την τριπλή επανάληψη της δομής του μονομερούς A. Αυτή η θεώρηση έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα δεδομένα που παρατίθενται παραπάνω. Καταρχάς, οι προβλεπόμενες δομές των A και At από το λογισμικό mfold είναι αυτές των *Εικόνων* 6.2–6.3. Το απταμερές A δεν διαθέτει επαναλαμβανόμενα μοτίβα G–G ή C–C αζωτούχων βάσεων οπότε δεν χαρακτηρίζεται από ιδιότητες μετασχηματισμού δομής (switching structure). Αυτό σημαίνει ότι η αναγνώριση του υποδοχέα HER2 είναι δεδομένο ότι γίνεται μέσω της αλληλουχίας που προτάθηκε παραπάνω και η οποία βρίσκεται στο loop που δημιουργείται (βλ. *Εικόνα* 6.2). Σε περίπτωση που το απταμερές At αποκτούσε τη δομή 3 επαναλαμβανόμενων loops με βάση τη διαμόρφωση του A, όπως ισχυρίζεται ο

Mahlknecht et al., τότε το συγκεκριμένο μοτίβο θα έπρεπε να προκύπτει και στην πιθανή δομή που προκρίνεται από το mfold το οποίο δε συμβαίνει. Η πιο πιθανή λοιπόν εξήγηση για την αυξημένη πρόσδεση των απταμερών At και T σε σύγκριση με το A, έγκειται τόσο στην πιο σταθερή δομή τους όσο και στην δημιουργία G-quadruplexes, τα οποία λειτουργούν σταθεροποιητικά και για τα δύο απταμερή. Ειδικά στην περίπτωση του απταμερούς T, είναι πιθανόν, η διαμόρφωση G-quadruplex να συμβάλλει στην προβολή της κοινής αλληλουχίας αναγνώρισης που είναι ήδη εκτεθειμένη χωρίς την ανάγκη αναδίπλωσης του μορίου.

Τα απταμερή B και D, δεν παρουσιάζουν ούτε την παρατηρούμενη αλληλουχία G-C-G-G, αλλά ούτε και μεγάλο αριθμό αζωτούχων βάσεων G και C, ώστε να προσφέρεται η δυνατότητα σχηματισμού είτε G-quadruplex είτε i-motif διαμορφώσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται περισσότερες A και T βάσεις. Σύμφωνα με ένα πρόσφατο άρθρο του Cai et al.,¹⁴⁵ η μετάλλαξη των βάσεων στην θέση πρόσδεσης (binding site) ενός απταμερούς, από G και C σε A και T, μείωσε το affinity του απταμερούς κατά 100 φορές περίπου, αποδεικνύοντας τη μεγάλη σημασία των βάσεων G και C στην λειτουργικότητα των απταμερών.

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η τρισδιάστατη διαμόρφωση που λαμβάνει το εκάστοτε απταμερές στο χώρο, φαίνεται να παίζει πολύ ουσιαστικό ρόλο στην πρόσδεσή του στον υποδοχέα, και κατά συνέπεια στην εξειδίκευσή του, σε συνάρτηση με την θερμοδυναμική του σταθερότητα.

Καταλήγοντας, η στόχευση με τη χρήση απταμερών θεμελιώνεται πάνω σε πολύπλοκους μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι δεν είναι εύκολο να διερευνηθούν. Το επίτοπο της πρωτεΐνης που αναγνωρίζουν, η διαδικασία SELEX με την οποία επιλέχθηκαν, καθώς και η δομή τους που μπορεί να παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσδεσή τους, αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα τους και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης και βελτίωσης. Επιπλέον, η πρόωμη εφαρμογή των απταμερών σε ένα βιολογικό σύστημα που χαρακτηρίζεται από υψηλή πολυπλοκότητα, όπως ο καρκίνος, δυσκολεύει ακόμα περισσότερο τη μελέτη και την εξαγωγή συμπερασμάτων, τόσο καθολικών όσο και μεγάλης ακριβείας.

7. Μελλοντικοί στόχοι

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής όσον αφορά στην στόχευση καρκινικών κυττάρων και το γεγονός ότι αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα τη μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε σε κάθε πείραμα, καταδεικνύουν την έλλειψη κατανόησης των βιολογικών μηχανισμών δράσης των απταμερών, η οποία έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τις πολυάριθμες εφαρμογές τους που επιχειρούνται ερευνητικά.

Σε αυτό το πλαίσιο, και δεδομένης της πολυπλοκότητας του καρκίνου, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της εξειδικευμένης πρόσδεσης του κάθε απταμερούς σε ένα συγκεκριμένο επίτοπο (τμήμα πεπτιδίου) της πρωτεΐνης HER2, αλλά και η εξακρίβωση της διαμόρφωσης που λαμβάνει για την επίτευξη αυτού του σκοπού. Η δομή των απταμερών μπορεί να εξετασθεί με τη χρήση της μεθόδου του Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism, CD), μία τεχνική η οποία βασίζεται στη διαφορά της απορρόφησης ανάμεσα στο δεξιόστροφο και το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως και παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία στον εντοπισμό των δευτεροταγών δομών των νουκλεϊκών οξέων.¹⁴⁶ Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού συνήθως χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μετασχηματισμών στη διαμόρφωση ενός μορίου λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών, συγκέντρωσης αλάτων, κατιόντων ή πρόσδεσης κάποιου συνδέτη (ligand),¹⁴⁶ ενώ εφαρμόζεται ευρέως για τη μελέτη G-quadruplex δομών.¹⁴⁷

Ακόμη, ιδιότητες των απταμερών, όπως η χημική συγγένεια πρόσδεσης (affinity) και η εκλεκτικότητα, επιβάλλεται να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό, ενώ δύνανται να ενισχυθούν μέσω της εισαγωγής μεταλλάξεων ή την περικοπή (truncation) των αλληλουχιών των απταμερών.¹³⁹ Η περικοπή των απταμερών αυξάνει γενικά την ικανότητα πρόσδεσής τους, καθώς μειώνεται η μη εξειδικευμένη πρόσδεση (non-specific binding) μέσω της απομάκρυνσης των νουκλεοτιδίων που δεν εμπλέκονται στη στόχευση, μπορεί όμως να οδηγήσει και στην μείωση της σταθερότητας των απταμερών και των δομών τις οποίες αυτά λαμβάνουν.¹⁴⁵ Ακόμη, βελτίωση της εκλεκτικότητας έχει παρατηρηθεί τόσο με την μετάλλαξη μόλις μερικών αζωτούχων βάσεων, αλλά και μέσω πιο περίπλοκων διαδικασιών τροποποίησης των απταμερών που περιλαμβάνουν εισαγωγή συνθετικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων.¹⁴⁸

Αναφερόμενοι τακτικά στην εξειδίκευση των απταμερών και στα χαρακτηριστικά υπεροχής τους έναντι των αντισωμάτων (βλ. *Κεφάλαιο 2.2.2 Πλεονεκτήματα απταμερών*), σημαντική κρίνεται επίσης η ταυτόχρονη στόχευση των καρκινικών κυττάρων με

αντίσωμα και απταμερές (colocalization), ώστε να μελετηθεί η ανταγωνιστική ικανότητα πρόσδεσης των βιομορίων.¹⁴⁹ Αυτή η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα εντοπισμού της διανομής των βιομορίων μεταξύ των κυττάρων, τα οποία μπορεί είτε να διανεμηθούν στον ίδιο βαθμό, είτε το ένα να πάρει τη θέση του άλλου (displacement),¹⁵⁰ είτε να παρεμποδίζεται η πρόσδεση και των δύο (exclusion), ανάλογα με τον επίτοπο στον οποίο προσδένονται.¹⁴⁹

Επιπλέον, όσον αφορά στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων, εκκρεμεί η διασαφήνιση του ρόλου των απταμερών. Η επιβεβαίωση της δυνατότητας εξειδικευμένης στόχευσης με τα απταμερή μπορεί να αποτελεί ένα μόνο ρόλο των πολυδύναμων αυτών μορίων. Επιβάλλεται να διερευνηθεί η επίδραση, της πρόσδεσής τους στον HER2, στα σηματοδοτικά μονοπάτια (upregulation ή downregulation)^{151,152} και η ύπαρξη ή όχι, αναστολής της δράσης των υποδοχέων, ρόλοι που μέχρι σήμερα αποδίδονται κυρίως στα μονοκλωνικά αντισώματα.¹⁵³ Η πρόσδεση των απταμερών και οι συνέπειες αυτής, μπορούν να μελετηθούν από διαφορετικές σκοπιές. Σε περίπτωση που το απταμερές προσδένεται στον υποδοχέα HER2 και αναστέλλει τη σηματοδότηση για την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης, η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη θα εντοπίζεται σε πολύ μικρότερη ποσότητα εντός των κυττάρων. Σε αυτή τη βάση, για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση της φωσφορυλιωμένης τυροσίνης, μπορεί να διενεργηθεί ανάλυση Western blot¹⁵⁴ ή ένα pull-down assay.¹⁵⁵ Επίσης, μια ενδιαφέρουσα προοπτική ως προς τη δράση των απταμερών, αποτελεί η μελέτη αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή ακόμα και η προώθηση του κυτταρικού θανάτου μέσω της πρόσδεσής τους. Μία τέτοια μελέτη μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή MTT assay για την εξέταση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την επώαση με απταμερή για αρκετές ώρες/μέρες.¹⁵⁶

Η εξειδικευμένη στόχευση που προσφέρουν τα απταμερή μπορεί άμεσα να επιστρατευτεί στη ενεργή (active targeting)¹⁵⁷ χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, ενόσω η επίδραση στα σηματοδοτικά μονοπάτια παραμένει άγνωστη. Για το σκοπό αυτό, το απταμερές μπορεί είτε να συμπλοκοποιηθεί με τη χημειοθεραπευτική ουσία, είτε να ακινητοποιηθεί πάνω σε νανοφορείς που την φέρουν.¹⁵⁸ Η δημιουργία του συμπλόκου απταμερούς-φαρμάκου βασίζεται στην επέκταση του απταμερούς με νουκλεοτιδικές βάσεις, ώστε να δημιουργηθούν θέσεις πρόσδεσης του φαρμάκου, αυξάνοντας έτσι και το αποδιδόμενο φόρτωμα.¹⁵⁹ Με την εισαγωγή του κλάδου της Νανοτεχνολογίας στη φαρμακευτική χορήγηση, γεννώνται αμέτρητες δυνατότητες τροποποιημένων –με

απταμερή– νανοφορέων. Κάποια από τα παραδείγματα τροποποιημένων νανοφορέων αφορούν σε λιποσώματα,¹⁶⁰ μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4)¹⁶¹, νανοσωλήνες άνθρακα,¹⁶² κβαντικές τελείες,¹⁶³ νανοσωματίδια χρυσού,¹⁶⁴ δενδριμερή¹⁶⁵ και πολυμερικά νανοσωματίδια.¹⁶⁶

Πέραν τούτων, η ικανότητα ενδοκυττάρωσης των απταμερών όπως αναδείχθηκε και στην παρούσα εργασία, προσφέρει τη δυνατότητα εισαγωγής του φαρμακευτικού νανοφορέα εντός του κυττάρου. Οπότε, γεννάται η ανάγκη περαιτέρω μελέτης των μηχανισμών ενδοκυττάρωσης, η οποία θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την πιο εξειδικευμένη τροποποίηση των νανοφορέων.¹³⁵ Έτσι, θα επιτραπεί η στόχευση συγκεκριμένων τμημάτων εντός του κυττάρου και θα καθοριστούν πιο ελεγχόμενα παράμετροι όπως η διάσπαση και η απελευθέρωση του φαρμάκου.¹³⁵ Βέβαια, η χρήση νανοφορέων στη στοχευμένη θεραπεία και η ακόλουθη είσοδός τους εντός του κυττάρου, δεν έγκειται μόνο στην ικανότητα στόχευσης του απταμερούς, αλλά και στο σύνολο πρωτεϊνών που θα επικαθίσουν στο φορέα (protein corona) όντας μέρος του βιολογικού περιβάλλοντος ενός οργανισμού.¹⁶⁷ Αλληλεπιδράσεις τέτοιου είδους περιπλέκουν τη μελέτη της στόχευσης, ενώ ταυτόχρονα διευρύνουν το πεδίο έρευνας επί του θέματος.

Τέλος, η μελέτη της ενδοκυττάρωσης των απταμερών ανοίγει μία νέα πόρτα στις υφιστάμενες πρακτικές επιλογής απταμερών για τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων. Πιο αναλυτικά, η επιφανειακή πρόσδεση και η ενδοκυττάρωση είναι δύο καθ' όλα διαφορετικά προσκείμενες στη στόχευση μελέτες, οπότε και η διαδικασία SELEX που επιλέγεται πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο εξειδικευμένη σε κάθε περίπτωση. Δηλαδή, για τη μελέτη της ενδοκυττάρωσης, η διαλογή των απταμερών θα πρέπει να γίνει μεταξύ αυτών που κατάφεραν να μπουν εντός των κυττάρων και όχι με βάση την επιφανειακή πρόσδεση που ακολουθείται συμβατικά.¹²³

8. Παράρτημα

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 3.1	Κύτταρα της καρκινική σειράς μαστού MDA-MB-435 σε καλλιέργεια. ⁷⁸
Εικόνα 3.2	Gel αγαρόζης με τα σχηματισμένα κελιά-πηγάδια που φέρουν τα δείγματα νουκλεϊκών οξέων. ⁸⁸
Εικόνα 3.3	Κύτταρα της καρκινικής σειράς MDA-MB-453 σε καλλιέργεια. ⁹⁴
Εικόνα 3.4	Κύτταρα της καρκινικής σειράς στομάχου NCI-N87 σε καλλιέργεια. ⁹⁸
Εικόνα 3.5	Κύτταρα της καρκινικής σειράς ωθηκών SKOV3 σε καλλιέργεια. ¹⁰³
Εικόνα 3.6	Κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MDA-MB-231 σε καλλιέργεια. ¹⁰⁹
Εικόνα 4.1	Η διάταξη ενός αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer, σκιαγραφημένη (αριστερά) ¹¹⁸ και στην πραγματικότητα (δεξιά). ¹¹⁹
Εικόνα 5.1	Φθορισμός κυτταρικών σειρών MDA-MB-435 και 435eb1 μετά από επώαση με 1μM απταμερούς.
Εικόνα 5.2	Φθορισμός κυτταρικής σειράς MDA-MB-435 μετά από επώαση με 1μM At σε διαφορετικές συνθήκες μονιμοποίησης και ξεπλυμάτων.
Εικόνα 5.3	Μπάντες του γονιδίου αντίστασης στη νεομυκίνη ύστερα από Neo-PCR για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-435 και 435eb1.
Εικόνα 5.4	Φθορισμός κυτταρικών σειρών MDA-MB-435, 435eb1, MDA-MB-231 και NCI-N87 μετά από επώαση με 0.5μM απταμερούς.
Εικόνα 5.5	Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-435 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.6	Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.7	Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-453 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.8	Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά του στομάχου NCI-N87 (επώαση σε 0.5μM).

Εικόνα 5.9	Φθορισμός επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ στην καρκινική κυτταρική σειρά των ωοθηκών SKOV-3 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.10	Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-435 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.11	Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-231 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.12	Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού MDA-MB-453 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 5.13	Φθορισμός από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ εντός της καρκινικής κυτταρικής σειράς του στομάχου NCI-N87 (επώαση σε 0.5μM).
Εικόνα 6.1	Πιθανές δευτεροταγείς διαμορφώσεις των DNA απταμερών A, At, B, Γ και Δ, σύμφωνα με το λογισμικό mfold.
Εικόνα 6.2	Η πιθανή θέση αναγνώρισης του στόχου, G-C-G-G (κόκκινο), στο απταμερές A.
Εικόνα 6.3	Η πιθανή θέση αναγνώρισης, G-C-G-G (κόκκινο), του στόχου στο απταμερές At και τα ζεύγη G-G (μπλε) που προωθούν το σχηματισμό δομής G-quadruplex..
Εικόνα 6.4	Η πιθανή θέση αναγνώρισης, G-C-G-G (κόκκινο), του στόχου στο απταμερές Γ και τα ζεύγη G-G (μπλε) που προωθούν το σχηματισμό δομής G-quadruplex.

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2.1	Βασική δομή των διαμεμβρανιακών πρωτεϊνών της οικογενείας ErbB υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης. ²⁴
Σχήμα 2.2	Μοντέλο των διαμορφώσεων που λαμβάνουν οι ErbB υποδοχείς όντας μονομερή (αριστερά), αλλά και κατά το διμερισμό τους (δεξιά). ³⁹
Σχήμα 2.3	Αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν μετά την πρόσδεση του συνδέτη στον EGF υποδοχέα και το σχηματισμό πρωτεϊνικού διμερούς μεταξύ του πρώτου και του HER2. ²⁴
Σχήμα 2.4	Σύμπλοκο αντισώματος – φαρμάκου προσδεμένο στον στόχο (πράσινο). ⁴⁵
Σχήμα 2.5	Παρεμπόδιση του σχηματισμού του διμερούς HER2–HER3 μέσω της δράσης του pertuzumab. ⁵³ (αριστερά: φυσιολογική σύνδεξη μονομερών, δεξιά: παρεμπόδιση)
Σχήμα 2.6	Αναπαράσταση της εξειδικευμένης πρόσδεσης των απταμερών στο βιοδείκτη–στόχο καρκινικών κυττάρων. ⁵⁸
Σχήμα 2.7	Η μέθοδος επιλογής απταμερών SELEX, επαναλαμβανόμενων κύκλων. ⁶⁰
Σχήμα 3.1	Εισαγωγή ξένης αλληλουχίας DNA μέσα σε βακτηριακό πλασμίδιο. ⁸⁶
Σχήμα 3.2	Μετασχηματισμός βακτηρίου και απομόνωση πολλαπλασιασμένων αντιγράφων των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων. ⁸⁶
Σχήμα 3.3	Συνήθης διάταξη ηλεκτροφόρησης gel αγαρόζης. ⁹¹
Σχήμα 3.4	Τα βήματα για την εφαρμογή της μεθόδου QRT–PCR. ⁹³
Σχήμα 3.5	Καλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλίο Petri. Τα κύτταρα είναι προσκολλημένα στον πυθμένα του τρυβλίου, ενώ είναι βυθισμένα μέσα στο θρεπτικό μέσο (ροζ). ¹¹⁴
Σχήμα 4.1	Διαγράμμιση του θαλάμου μέτρησης του αιμοκυτταρομέτρου τύπου Neubauer. ¹²⁰
Σχήμα 4.2	Παρουσίαση της μεθόδου μέτρησης των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
Σχήμα 6.1	Διαμόρφωση G–quadruplex,

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.2	Σύγκριση μεταξύ απταμερών και συμβατικών αντισωμάτων. ⁵⁶
Πίνακας 4.1	Σχεδιασμός πειραμάτων προς βελτιστοποίηση των συνθηκών επώασης των απταμερών.
Πίνακας 4.2	Σύσταση μίγματος Neo-PCR.
Πίνακας 4.3	Σύσταση μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.
Πίνακας 4.4	Σύσταση μίγματος αντίδρασης qPCR.

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 5.1	Συγκριτική έκφραση της πρωτεΐνης HER2 μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, SKOV-3 και NCI-N87.
Διάγραμμα 5.2	Συγκριτική παρουσίαση του φθορίζοντος σήματος επιφανειακής πρόσδεσης των απταμερών A, At, B και Γ επί των σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3.
Διάγραμμα 5.3	Συγκριτική παρουσίαση του φθορίζοντος σήματος από την ενδοκυττάρωση των απταμερών A, At, B και Γ επί των σειρών MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, NCI-N87 και SKOV-3.

9. Βιβλιογραφία

1. World Health Organization. *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. (2018).
2. Eurostat. Causes of death statistics. Available at: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics. (Accessed: 3rd September 2019)
3. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2015). doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018
4. Golombek, S. K. *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2018). doi:10.1016/j.addr.2018.07.007
5. Roila, F. *et al.* 2016 MASCC and ESMO guideline update for the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting and of nausea and vomiting in advanced cancer patients. *Ann. Oncol.* (2016). doi:10.1093/annonc/mdw270
6. Side effects of cancer treatment. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>. (Accessed: 3rd September 2019)
7. Chen, C. *et al.* Promoter-Operating Targeted Expression of Gene Therapy in Cancer: Current Stage and Prospect. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (2018). doi:10.1016/j.omtn.2018.04.003
8. Zhou, Z. *et al.* Nonviral cancer gene therapy: Delivery cascade and vector nanoproperty integration. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017). doi:10.1016/j.addr.2017.07.021
9. Zaimy, M. A. *et al.* New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Therapy* (2017). doi:10.1038/cgt.2017.16
10. Qiao, Y. *et al.* Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2019). doi:10.1002/wnan.1527
11. Janku, F., Yap, T. A. & Meric-Bernstam, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018). doi:10.1038/nrclinonc.2018.28
12. Ferguson, F. M. & Gray, N. S. Kinase inhibitors: The road ahead. *Nature Reviews Drug*

- Discovery* (2018). doi:10.1038/nrd.2018.21
13. Imperial, R., Toor, O. M., Hussain, A., Subramanian, J. & Masood, A. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. *Seminars in Cancer Biology* (2019). doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.016
 14. Tian, T., Li, X. & Zhang, J. mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (2019). doi:10.3390/ijms20030755
 15. Iqbal, N. & Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol. Biol. Int.* (2014). doi:10.1155/2014/852748
 16. Omar, N., Yan, B. & Salto-Tellez, M. HER2: An emerging biomarker in non-breast and non-gastric cancers. *Pathogenesis* (2015). doi:10.1016/j.pathog.2015.05.002
 17. Brody, E. N. & Gold, L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology* (2000). doi:10.1016/S1389-0352(99)00004-5
 18. Famulok, M., Hartig, J. S. & Mayer, G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chemical Reviews* (2007). doi:10.1021/cr0306743
 19. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* (2007). doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001
 20. Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A. & Sharma, T. K. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics* (2018). doi:10.7150/thno.25958
 21. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Macugen. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process> . (Accessed: 15th September 2019)
 22. Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X. & Hoshida, Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Translational Cancer Research* (2015). doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04

23. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* (2010). doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
24. Lv, Q. *et al.* Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* (2016). doi:10.3390/ijms17122095
25. Dittrich, A., Gautrey, H., Browell, D. & Tyson-Capper, A. The HER2 Signaling Network in Breast Cancer—Like a Spider in its Web. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (2014). doi:10.1007/s10911-014-9329-5
26. Citri, A., Skaria, K. B. & Yarden, Y. The deaf and the dumb: The biology of ErbB-2 and ErbB-3. in *The EGF Receptor Family: Biologic Mechanisms and Role in Cancer* (2003). doi:10.1016/B978-012160281-9/50005-0
27. Rimawi, M. F., Schiff, R. & Osborne, C. K. Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. *Annu. Rev. Med.* (2015). doi:10.1146/annurev-med-042513-015127
28. Fry, E. A., Taneja, P. & Inoue, K. Oncogenic and tumor-suppressive mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. *International Journal of Cancer* (2017). doi:10.1002/ijc.30399
29. Roskoski, R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacological Research* (2019). doi:10.1016/j.phrs.2018.11.014
30. Zhong, B. L. *et al.* Identification of key genes involved in HER2-positive breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* (2016).
31. Fonkoua, L. K. & Yee, N. S. Molecular characterization of gastric carcinoma: Therapeutic implications for biomarkers and targets. *Biomedicines* (2018). doi:10.3390/biomedicines6010032
32. Siena, S. *et al.* Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Annals of Oncology* (2018). doi:10.1093/annonc/mdy100
33. Wang, Z. ErbB receptors and cancer. in *Methods in Molecular Biology* (2017). doi:10.1007/978-1-4939-7219-7_1
34. Ferreira, P. M. P. & Pessoa, C. Molecular biology of human epidermal receptors,

- signaling pathways and targeted therapy against cancers: New evidences and old challenges. *Brazilian J. Pharm. Sci.* (2017). doi:10.1590/s2175-97902017000216076
35. Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G. & Bennisroune, A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Frontiers in Pharmacology* (2015). doi:10.3389/fphar.2015.00283
 36. Jura, N. *et al.* Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment. *Cell* (2009). doi:10.1016/j.cell.2009.04.025
 37. Lemmon, M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Experimental Cell Research* (2009). doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.024
 38. Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T. & Kuriyan, J. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* (2015). doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034402
 39. Liu, P. *et al.* A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012). doi:10.1073/pnas.1201114109
 40. Pernas, S. & Tolaney, S. M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* (2019). doi:10.1177/1758835919833519
 41. Nelson, D. L. & Cox, M. M. The foundations of biochemistry. in *Lehninger Principles of Biochemistry* 20–28 (W. H. Freeman & Company, 2013).
 42. Guerrero-Zotano, A., Mayer, I. A. & Arteaga, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* (2016). doi:10.1007/s10555-016-9637-x
 43. Morita, Y., Leslie, M., Kameyama, H., Volk, D. E. & Tanaka, T. Aptamer therapeutics in cancer: Current and future. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10030080
 44. Nakada, T., Sugihara, K., Jikoh, T., Abe, Y. & Agatsuma, T. The Latest Research and Development into the Antibody–Drug Conjugate, [fam-] Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), for HER2 Cancer Therapy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (2019). doi:10.1248/cpb.c18-00744
 45. Coats, S. *et al.* Antibody–Drug Conjugates: Future Directions in Clinical and

- Translational Strategies to Improve the Therapeutic Index. *Clin. Cancer Res.* (2019). doi:10.1158/1078-0432.ccr-19-0272
46. Liu, M. *et al.* Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy. *Journal of Nanobiotechnology* (2017). doi:10.1186/s12951-017-0311-4
 47. Collins, D. M., Bossenmaier, B., Kollmorgen, G. & Niederfellner, G. Acquired resistance to antibody-drug conjugates. *Cancers (Basel)*. (2019). doi:10.3390/cancers11030394
 48. Zhou, G. *et al.* Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7178
 49. Nami, B., Maadi, H. & Wang, Z. Mechanisms underlying the action and synergism of trastuzumab and pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10100342
 50. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Herceptin. Available at: <https://www.google.com/search?q=εξανθρωπισμένο ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab>. (Accessed: 15th September 2019)
 51. Mandal, A. & Viswanathan, C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* (2015). doi:10.1016/j.hemonc.2014.11.006
 52. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Perjeta. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>. (Accessed: 15th September 2019)
 53. Watson, S. S. *et al.* Microenvironment-Mediated Mechanisms of Resistance to HER2 Inhibitors Differ between HER2+ Breast Cancer Subtypes. *Cell Syst.* (2018). doi:10.1016/j.cels.2018.02.001
 54. Parakh, S. *et al.* Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* (2017). doi:10.1016/j.ctrv.2017.06.005
 55. Canonici, A. *et al.* HER-targeted tyrosine kinase inhibitors enhance response to trastuzumab and pertuzumab in HER2-positive breast cancer. *Invest. New Drugs* (2019). doi:10.1007/s10637-018-0649-y
 56. Zhou, G. *et al.* Aptamer-based therapeutic approaches to target cancer stem cells.

- Theranostics* (2017). doi:10.7150/thno.20725
57. Mercier, M. C., Dontenwill, M. & Choulier, L. Selection of nucleic acid aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers. *Cancers* (2017). doi:10.3390/cancers9060069
 58. Sun, H. & Zu, Y. A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* (2015). doi:10.3390/molecules200711959
 59. Chen, C., Zhou, S., Cai, Y. & Tang, F. Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology. *npj Precis. Oncol.* (2017). doi:10.1038/s41698-017-0041-y
 60. Wu, Y. X. & Kwon, Y. J. Aptamers: The “evolution” of SELEX. *Methods* (2016). doi:10.1016/j.ymeth.2016.04.020
 61. Pang, X. *et al.* Bioapplications of cell-SELEX-generated aptamers in cancer diagnostics, therapeutics, theranostics and biomarker discovery: A comprehensive review. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10020047
 62. Hori, S. I., Herrera, A., Rossi, J. J. & Zhou, J. Current advances in aptamers for cancer diagnosis and therapy. *Cancers* (2018). doi:10.3390/cancers10010009
 63. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* (2010). doi:10.1038/nrd3141
 64. Maimaitiyiming, Y., Hong, D. F., Yang, C. & Naranmandura, H. Novel insights into the role of aptamers in the fight against cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (2019). doi:10.1007/s00432-019-02882-7
 65. Shen, Y. *et al.* A dual-functional her2 aptamer-conjugated, ph-activated mesoporous silica nanocarrier-based drug delivery system provides in vitro synergistic cytotoxicity in her2-positive breast cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* (2019). doi:10.2147/IJN.S201688
 66. Guo, X., Liu, S., Yang, M., Du, H. & Qu, F. Dual signal amplification photoelectrochemical biosensor for highly sensitive human epidermal growth factor receptor-2 detection. *Biosens. Bioelectron.* (2019). doi:10.1016/j.bios.2019.05.017
 67. Chai, Y., Li, X. & Yang, M. Aptamer based determination of the cancer biomarker

- HER2 by using phosphate-functionalized MnO₂ nanosheets as the electrochemical probe. *Microchim. Acta* (2019). doi:10.1007/s00604-019-3412-y
68. Mahlknecht, G. *et al.* Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013). doi:10.1073/pnas.1302594110
 69. Liu, Z. *et al.* Novel HER2 Aptamer Selectively Delivers Cytotoxic Drug to HER2-positive Breast Cancer Cells in Vitro. *J. Transl. Med.* (2012). doi:10.1186/1479-5876-10-148
 70. Chun, L. *et al.* Electrochemical detection of HER2 using single stranded DNA aptamer modified gold nanoparticles electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* (2013). doi:10.1016/j.snb.2013.06.046
 71. Gijis, M. *et al.* Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer. *Pharmaceuticals* (2016). doi:10.3390/ph9020029
 72. Haagensen, E. J. *et al.* Pre-clinical use of isogenic cell lines and tumours in vitro and in vivo for predictive biomarker discovery; Impact of KRAS and PI3KCA mutation status on MEK inhibitor activity is model dependent. *Eur. J. Cancer* (2016). doi:10.1016/j.ejca.2015.12.012
 73. Huang, H. *et al.* Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. *Clin. Cancer Res.* (2005). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2107
 74. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z. & Li, J. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer* (2017). doi:10.7150/jca.18457
 75. Hollestelle, A. *et al.* Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* (2010). doi:10.1007/s10549-009-0460-8
 76. Chakrabandhu, K., Huault, S. & Hueber, A. O. Distinctive molecular signaling in triple-negative breast cancer cell death triggered by hexadecylphosphocholine (miltefosine). *FEBS Lett.* (2008). doi:10.1016/j.febslet.2008.11.019
 77. Zhang, Q., Fan, H., Shen, J., Hoffman, R. M. & Xing, H. R. Human breast cancer cell lines co-express neuronal, epithelial, and melanocytic differentiation markers in vitro

- and in vivo. *PLoS One* (2010). doi:10.1371/journal.pone.0009712
78. ATCC®. MDA-MB-435S. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-129.aspx?geo_country=gr#generalinformation. (Accessed: 4th September 2019)
 79. Glynn, S. A. *et al.* A new superinvasive in vitro phenotype induced by selection of human breast carcinoma cells with the chemotherapeutic drugs paclitaxel and doxorubicin. *Br. J. Cancer* (2004). doi:10.1038/sj.bjc.6602221
 80. Nerlich, A. G. & Bachmeier, B. E. Density-dependent lineage instability of MDA-MB-435 breast cancer cells. *Oncol. Lett.* (2013). doi:10.3892/ol.2013.1157
 81. Tan, M., Yao, J. & Yu, D. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.* (1997).
 82. Liu, B., Sun, D., Xia, W., Hung, M. C. & Yu, D. Cross-reactivity of C219 anti-p170(mdr-1) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: Cautions on evaluating p170(mdr-1). *J. Natl. Cancer Inst.* (1997). doi:10.1093/jnci/89.20.1524
 83. Dihua, Y. *et al.* Overexpression of ErbB2 blocks taxol-induced apoptosis by upregulation of p21 Cip1 , which inhibits p34 Cdc2 kinase. *Mol. Cell* (1998).
 84. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010). doi:10.1007/s00216-010-3821-6
 85. Alberts, B. *et al.* Chapter 6. How Cells Read the Genome: From DNA to Protein. in *Molecular biology of the cell* (Garland Science, 2015).
 86. Alberts, B. *et al.* Chapter 10. Modern Recombinant DNA Technology. in *Essential Cell Biology* 325–354 (Garland Science, 2014).
 87. Kadri, K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. in *Perspectives on Polymerase Chain Reaction [Working Title]* (2019). doi:10.5772/intechopen.86491
 88. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* (2012). doi:10.3791/3923
 89. Ylmaz, M., Ozic, C. & Gok, Ihami. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose

- Gel Electrophoresis. in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (2012). doi:10.5772/38654
90. Barril, P. & Nates, S. Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities. in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (2012). doi:10.5772/38573
 91. Gel electrophoresis. in *Proteomic profiling and analytical chemistry* (eds. Ciborowski, P. & Silberring, J.) 119–120 (Elsevier, 2016).
 92. Carter, M. & Shieh, J. Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. in *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (2015). doi:10.1016/b978-0-12-800511-8.00010-1
 93. Basic Principles of RT-qPCR. Available at: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>. (Accessed: 9th September 2019)
 94. ATCC®. MDA-MB-453. Available at: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-131.aspx#generalinformation>. (Accessed: 9th September 2019)
 95. Chiang, C. Te, Way, T. Der & Lin, J. K. Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21WAF1/CIP1 expression with rapamycin. *Mol. Cancer Ther.* (2007). doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0107
 96. Stanley, A., Ashrafi, G. H., Seddon, A. M. & Modjtahedi, H. Synergistic effects of various Her inhibitors in combination with IGF-1R, C-MET and Src targeting agents in breast cancer cell lines. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-04301-8
 97. Yang, L. *et al.* NRG1-dependent activation of HER3 induces primary resistance to trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* (2017). doi:10.3892/ijo.2017.4130
 98. ATCC®. NCI-N87 [N87]. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-5822.aspx?geo_country=gr#generalinformation. (Accessed: 9th September 2019)
 99. Cui, H. *et al.* Correlation between HER-2/neu(erbB-2) expression level and therapeutic

- effect of combination treatment with HERCEPTIN and chemotherapeutic agents in gastric cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* (2014). doi:10.1186/1475-2867-14-10
100. Kim, S. Y. *et al.* Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int. J. Oncol.* (2008).
 101. Ko, B. K. *et al.* Combination of novel HER2-targeting antibody 1E11 with trastuzumab shows synergistic antitumor activity in HER2-positive gastric cancer. *Mol. Oncol.* (2015). doi:10.1016/j.molonc.2014.09.007
 102. Yoshioka, T. *et al.* Antitumor activity of pan-HER inhibitors in HER2-positive gastric cancer. *Cancer Sci.* (2018). doi:10.1111/cas.13546
 103. ATCC®. SK-OV-3. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-77.aspx?geo_country=gr#generalinformation. (Accessed: 9th September 2019)
 104. Lanitis, E. *et al.* Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 at Immunologically-Detectable Levels. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0049829
 105. DeFazio-Eli, L. *et al.* Quantitative assays for the measurement of HER1-HER2 heterodimerization and phosphorylation in cell lines and breast tumors: Applications for diagnostics and targeted drug mechanism of action. *Breast Cancer Res.* (2011). doi:10.1186/bcr2866
 106. Heyerdahl, H., Krogh, C., Borrebæk, J., Larsen, S. & Dahle, J. Treatment of HER2-expressing breast cancer and ovarian cancer cells with alpha particle-emitting ²²⁷Th-trastuzumab. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2011). doi:10.1016/j.ijrobp.2010.08.038
 107. Wang, W., Gao, Y., Hai, J., Yang, J. & Duan, S. HER2 decreases drug sensitivity of ovarian cancer cells via inducing stem cell-like property in an NFκB-dependent way. *Biosci. Rep.* (2019). doi:10.1042/BSR20180829
 108. Mota, A. de L. *et al.* Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol. Lett.* (2017). doi:10.3892/ol.2017.6093
 109. ATCC®. MDA-MB-231. Available at: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=gr#generalinformation. (Accessed: 9th September 2019)

110. Hall, J. E. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. (Elsevier, 2016).
111. Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. & Reece, J. B. Basic Principles of animal form and function. in *Campbell Biology* 870–880 (Pearson, 2017).
112. Yang, Z. & Xiong, H.-R. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. in *Biomedical Tissue Culture* (2012). doi:10.5772/52301
113. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Water. in *Lehninger Principles of Biochemistry* 47–67 (W. H. Freeman & Company, 2013).
114. Chow, A. Y. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nat. Educ.* (2010).
115. Mahlknecht, G., Maron, R., Schechter, B., Yarden, Y. & Sela, M. Multimerization of ERBB2/HER2 specific aptamer leads to improved receptor binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.157
116. Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. & Reece, J. B. A tour of the cell. in *Campbell Biology* 93–125 (Pearson, 2017).
117. Γιαννακούρης, Ν. & Νικολιουδάκης, Ν. Κοκκορόγιαννης, Θ. Άσκηση 1: Μικροσκοπία & Μικροσκόπηση. in *Οδηγός εργαστηριακών και φροντιστηριακών ασκήσεων βιολογίας [ηλεκτρ. βιβλ.]* (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015).
118. ThermoFisher Scientific. Counting Cells in a Hemacytometer. Available at: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemacytometer.html>. (Accessed: 15th September 2019)
119. Fisher Scientific. Hausser Scientific™ Levy™ Hemacytometer Chamber Set. Available at: <https://www.fishersci.com/shop/products/hausser-levy-hemacytometer-chamber-set/0267155a>. (Accessed: 15th September 2019)
120. Absher, M. CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting. in *Tissue Culture* (1973). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-427150-0.50098-X>
121. Perez-Gonzalez, C., Lafontaine, D. A. & Penedo, J. C. Fluorescence-based strategies to investigate the structure and dynamics of aptamer-ligand complexes. *Frontiers in Chemistry* (2016). doi:10.3389/fchem.2016.00033

122. Lu, B. *et al.* Screening and verification of ssDNA aptamers targeting human hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. (2014). doi:10.1093/abbs/gmt130
123. Ranches, G. *et al.* In Vitro Selection of Cell-Internalizing DNA Aptamers in a Model System of Inflammatory Kidney Disease. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* (2017). doi:10.1016/j.omtn.2017.06.018
124. Hu, Y., Li, X., An, Y., Duan, J. & Yang, X. Da. Selection of a novel CD19 aptamer for targeted delivery of doxorubicin to lymphoma cells. *Oncotarget* (2018). doi:10.18632/oncotarget.24902
125. Graham, J. C. & Zarbl, H. Use of cell-SELEX to generate DNA aptamers as molecular probes of HPV-associated cervical cancer cells. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0036103
126. Thiel, K. W. *et al.* Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* (2012). doi:10.1093/nar/gks294
127. Athyala, P. K. *et al.* Neocarzinostatin, aptamer conjugates for targeting epcam-positive tumor cells. *Anticancer Res.* (2017). doi:10.21873/anticancerS.11732
128. Lai, Z. *et al.* An 'activatable' aptamer-based fluorescence probe for the detection of HepG2 cells. *Oncol. Rep.* (2017). doi:10.3892/or.2017.5527
129. Hernandez, L. I. *et al.* Methods for evaluating cell-specific, cell-internalizing RNA aptamers. *Pharmaceuticals* (2013). doi:10.3390/ph6030295
130. Huang, Y. Z. *et al.* RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, TrkB. *Mol. Pharmacol.* (2012). doi:10.1124/mol.112.078220
131. De Castro, M. A. G., Hobartner, C. & Opazo, F. Aptamers provide superior stainings of cellular receptors studied under superresolution microscopy. *PLoS One* (2017). doi:10.1371/journal.pone.0173050
132. Thiel, W. H. & Giangrande, P. H. AFBI assay - Aptamer Fluorescence Binding and Internalization assay for cultured adherent cells. *Methods* (2016). doi:10.1016/j.ymeth.2016.03.005
133. Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K. & Ranganathan, K.

- Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* (2012). doi:10.4103/0973-029X.102496
134. Ma, Y., Poole, K., Goyette, J. & Gaus, K. Introducing membrane charge and membrane potential to T cell signaling. *Frontiers in Immunology* (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.01513
 135. Engelberg, S., Modrejewski, J., Walter, J. G., Livney, Y. D. & Assaraf, Y. G. Cancer cell-selective, clathrin-mediated endocytosis of aptamerdecorated nanoparticles. *Oncotarget* (2018). doi:10.18632/oncotarget.24772
 136. Wan, L. Y. *et al.* An exploration of aptamer internalization mechanisms and their applications in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* (2019). doi:10.1080/17425247.2019.1575808
 137. Merck. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) Formulation. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/dme.html>. (Accessed: 15th September 2019)
 138. Wang, S., Liu, J., Dong, Y., Su, H. & Tan, T. Conformational structure-dependent molecular recognition of two aptamers for tetracycline. *RSC Adv.* (2015). doi:10.1039/c5ra08050a
 139. Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K. & Ikebukuro, K. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules* (2016). doi:10.3390/molecules21040421
 140. Catherine, A. T., Shishido, S. N., Robbins-Welty, G. A. & Diegelman-Parente, A. Rational design of a structure-switching DNA aptamer for potassium ions. *FEBS Open Bio* (2014). doi:10.1016/j.fob.2014.08.008
 141. Guo, K. *et al.* Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *J. Am. Chem. Soc.* (2007). doi:10.1021/ja072185g
 142. Ida, J. *et al.* G-quadruplexes as an alternative recognition element in disease-related target sensing. *Molecules* (2019). doi:10.3390/molecules24061079
 143. O. Tucker, W., T. Shum, K. & A. Tanner, J. G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application. *Curr. Pharm. Des.* (2012). doi:10.2174/138161212799958477

144. Edwards, D. N., Machwe, A., Wang, Z. & Orren, D. K. Intramolecular telomeric G-quadruplexes dramatically inhibit DNA synthesis by replicative and translesion polymerases, revealing their potential to lead to genetic change. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0080664
145. Cai, S. *et al.* Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets. *Analyst* (2018). doi:10.1039/c8an01467a
146. Del Villar-Guerra, R., Gray, R. D. & Chaires, J. B. Characterization of quadruplex DNA structure by circular dichroism. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* (2017). doi:10.1002/cpnc.23
147. Nagatoishi, S., Tanaka, Y. & Tsumoto, K. Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-conditions-deficient conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007). doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.088
148. Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G. & Sharma, T. K. Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity. *Front. Mol. Biosci.* (2018). doi:10.3389/fmolb.2018.00041
149. Dunn, K. W., Kamocka, M. M. & McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (2011). doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
150. Zamay, G. S. *et al.* Development of DNA aptamers to native EpCAM for isolation of lung circulating tumor cells from human blood. *Cancers (Basel)*. (2019). doi:10.3390/cancers11030351
151. Yoon, S., Wu, X., Armstrong, B., Habib, N. & Rossi, J. J. An RNA Aptamer Targeting the Receptor Tyrosine Kinase PDGFR α Induces Anti-tumor Effects through STAT3 and p53 in Glioblastoma. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* (2019). doi:10.1016/j.omtn.2018.11.012
152. Conidi, A., van den Berghe, V. & Huylebroeck, D. Aptamers and their potential to selectively target aspects of EGF, Wnt/ β -catenin and TGF β -smad family signaling. *International Journal of Molecular Sciences* (2013). doi:10.3390/ijms14046690
153. Weiner, G. J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews*

- Cancer* (2015). doi:10.1038/nrc3930
154. Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* (2012). doi:10.4103/1947-2714.100998
 155. Louche, A., Salcedo, S. P. & Bigot, S. Protein–protein interactions: Pull-down assays. in *Methods in Molecular Biology* (2017). doi:10.1007/978-1-4939-7033-9_20
 156. Nalini, V. *et al.* Targeting HMGA2 in Retinoblastoma Cells in vitro Using the Aptamer Strategy. *Ocul. Oncol. Pathol.* (2016). doi:10.1159/000447300
 157. Wu, X., Chen, J., Wu, M. & Zhao, J. X. Aptamers: Active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics* (2015). doi:10.7150/thno.10257
 158. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* (2017). doi:10.1038/nrd.2016.199
 159. Porciani, D. *et al.* Aptamer-mediated codelivery of doxorubicin and NF- κ B decoy enhances chemosensitivity of pancreatic tumor cells. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* (2015). doi:10.1038/mtna.2015.9
 160. Dou, X. Q. *et al.* Aptamer–drug conjugate: Targeted delivery of doxorubicin in a HER3 aptamer-functionalized liposomal delivery system reduces cardiotoxicity. *Int. J. Nanomedicine* (2018). doi:10.2147/IJN.S149887
 161. Patitsa, M. *et al.* Magnetic nanoparticles coated with polyarabic acid demonstrate enhanced drug delivery and imaging properties for cancer theranostic applications. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-00836-y
 162. Taghavi, S., Nia, A. H., Abnous, K. & Ramezani, M. Polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes tagged with AS1411 aptamer for combination gene and drug delivery into human gastric cancer cells. *Int. J. Pharm.* (2017). doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.027
 163. Akbarzadeh, M. *et al.* Hybrid silica-coated Gd-Zn-Cu-In-S/ZnS bimodal quantum dots as an epithelial cell adhesion molecule targeted drug delivery and imaging system. *Int. J. Pharm.* (2019). doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118645
 164. Chen, D. *et al.* Dual targeting luminescent gold nanoclusters for tumor imaging and deep tissue therapy. *Biomaterials* (2016). doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.017

165. Alibolandi, M. *et al.* Smart AS1411-aptamer conjugated pegylated PAMAM dendrimer for the superior delivery of camptothecin to colon adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* (2017). doi:10.1016/j.ijpharm.2017.01.044
166. Saravanakumar, K. *et al.* Enhanced cancer therapy with pH-dependent and aptamer functionalized doxorubicin loaded polymeric (poly D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Arch. Biochem. Biophys.* (2019). doi:10.1016/j.abb.2019.07.004
167. Dimitriou, N. M. *et al.* Gold nanoparticles, radiations and the immune system: Current insights into the physical mechanisms and the biological interactions of this new alliance towards cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics* (2017). doi:10.1016/j.pharmthera.2017.03.006