

1. שם ההצעה: בחינת כושר הדיכוי של סרטן באמצעות יישום אנאלוגים לסטריגולקטונים
2. שותפים ושטח פעולה

ד"ר עיסאם חלילה isam@bgu.ac.il	ריכוז ניסויי העכברים, תכנון הניסויים ופיקוח על ביצוען	עובד בתקן- אוניברסיטת בן-גוריון
ד"ר חננית קולטאי	ריכוז ניסויי השמרים, תכנון הניסויים ופיקוח על ביצוען	עובד בתקן-מכון וולקני
פרופ' יורם קפולניק	ליווי של הפרוייקט בנושא סטריגולקטונים,	עובד בתקן- מכון וולקני

3. צוות ההיגוי אליו מוגשת ההצעה: "מחקרי היתכנות"; קוד צוות ההיגוי הינו: 02-6482.

4. מבוא ותיאור הבעיה, מטרת המחקר והתועלת הצפויה מביצועו:

סטריגולקטונים (Strigolactones), שהינם חומרי טבע בצמחים וזהו לאחרונה כמעורבים בקביעת הארכיטקטורה של צמחים בטבע ובעיקר בתכונת השלטון הקודקודי והסתעפות מערכת השורשים. בצמחים מצאנו כי חומרים אלו מביאים לשינויים בחלוקות תאים במריסטמות קודקודיות בנצר ובשורש. עובדה זו הובילה את המחקר למציאת ההשפעה שיש לחומרים אלו על מידת וקצב חלוקות התאים, על מחזור התא ועל מוות תאים מתוכנן (אפופטוזיס). כפועל יוצא מממצאי העבודה עם צמחים ממינים שונים נערכו ניסויי יישום של סטריגולקטונים (GR24) על רקמות אנימליות, על תרביות של 5 קוים של תאים סרטניים ממקורות שונים. בכל המקרים נצפתה האטה בהתפתחות התרביות ונקבעו מדדי גדילת תאים נמוכים יותר מאשר התקבלו בביקורת. ממצאי העבודה מצורפים להצעה הנוכחית (מאמר מדעי שפורסם ע"י חלק ממציעי ההצעה הנוכחית; Pollock et al., 2012) ונכתב פטנט להגנה על ראשוניות הגילוי. הממצאים מצביעים על הפחתה משמעותית בכניסת התאים למחזור התא, ובעליה משמעותית באפופטוזיס. שתי השפעות אלו הן בעלות משמעות מבחינת התפתחות תאי הסרטן, מכיוון שמחד מפחיתות חלוקות תאים, ומאידך מביאות לירידה במספר התאים הסרטניים. זאת ועוד, בידינו מספר חומרים שהינם סטריגולקטונים סינטטיים (אנאלוגים) והם בעלי השפעה סיגניפיקנטית על קווי הסרטן (Pollock et al., 2012). חומרים אלו סונתזו במיוחד למטרה זו, הביאו לתופעות דומות לאלו שנמצאו עבור החומר GR24 ויכולים לשמש כבסיס לפיתוח תרופות.

יתרה מכך, קבוצת חומרים אלו הוכחה כיעילה כנגד קווי סרטן שונים, בהם סרטן השד, הפרוסטטה, סרטן הדם (לאוקמיה) וסרטן ריאות. על כן- ההשפעה רחבת הטווח של חומרים אלו, יעילותם המוכחת כנגד קווי תאים, חדשנותם וזמינותם הופכים אותם ליעד אטרקטיבי לפיתוח תרופות כנגד סרטן.

בנוסף, החילונו בהבנת מנגנון הפעולה של חומרים אלו, תוך שימוש בתרביות שמרים. התוצאות ההקדמיות מראות כי החומרים פועלים על תרביות שמרים בצורה דומה לפעילותם בתרביות תאים סרטניים: הם מביאים לירידה באוכלוסיית התאים ולירידה במידת התחלקותם.

בהצעה זו אנו מבקשים להמשיך ולבחון את פעילות החומרים האלו בעכברים ובשמרים. ניסויי העכברים יאפשרו בחינה *in vivo* של פעילות החומרים, תוך קביעת השפעתם על התפתחות גידולים סרטניים, ויהוו צעד חשוב לקראת פיתוחם של החומרים לקראת תרופה אנטי-סרטנית. השימוש בשמרים כמודל יאפשר הבנה עמוקה של מנגנון הפעולה של החומרים, זיהוי תכונות קישורם לרצפטור, וזיהוי המסלולים התאיים אשר משופעלים על ידי חומרים אלו, ומביאים לאפופטוזיס ולהפחתה בחלוקת התאים.

חדשנות הרעיון ומוצקות בסיס ההיפותזה של ההצעה:

הרעיון בבסיס הצעה מתבסס על תוצאות מקדימות שפרסמנו זה עתה בספרות המדעית (Pollock et al., 2012). תוצאות מקדימות אלו הוכיחו כי קבוצת החומרים, שהינם אנאלוגים לחומר צמחי טבעי, הורמוני הסטריגולקטון, הם בעל פעילות מוכחת אנטי-סרטנית, כפי שנקבע בקווי תאים סרטניים. חומרים אלו לא נבדקו קודם לכן כנוגדי פעילות סרטנית, ועל כן מהווים יעד אטרקטיבי לפיתוח תרופה חדשה לסרטן. התוצאות החיוביות בקווים הסרטניים מהוות יסוד מוצק לניסויי

העכברים ותאי השמרים. ניסויי העכברים הם שלב חיוני בפיתוח החומרים לתרופה חדשה ואילו ניסויי השמרים יביאו להבנה טובה יותר של מנגנון הפעולה של החומרים, נדבך חשוב בפיטונט התרופה ובפיתוחה.

תרומת המחקר לאנושות וסכויי המחקר להוביל לפריצת דרך טכנולוגית:

המחקר מציע לעשות צעד חשוב וחיוני לקראת פיתוח של תרופה אנטי סרטנית, כאשר במקורו הוא מתבסס על מחקר חקלאי של התפתחות צמחים. מכיוון שקבוצת חומרים אלו הוכחה כיעילה כנגד קווי סרטן שונים, בהם סרטן השד, הפרוסטטה, סרטן הדם (לאוקמיה) וסרטן ריאות, השפעתם רחבת הטווח של חומרים אלו, יעילותם המוכחת כנגד קווי תאים, חדשנותם וזמינותם הופכים אותם ליעד אטרקטיבי לפיתוח תרופות כנגד סרטן. בכך הם צפויים להביא לפריצת דרך טכנולוגית משמעותית ולתרומה לאנושות. התוצאות שיתקבלו ממחקר זה צפויים לאפשר צעד חשוב לקראת פיתוח תרופה, ויאפשרו הגשת הצעה מקיפה שתתמקד בלימוד של מנגנון פעילות החומרים, דרכי מתן החומר (הזרקה, האכלה וכו'), מינונים ושילוב עם חומרים נוספים נוגדי סרטן.

רמת השלוב הבין-תחומי של המחקר הצפוי

המחקר משלב פעילות מחקרית בין חוקרים מתחומים שונים: בין חוקר מתחום הסרטן, התפתחות גידולים סרטניים ודיכויים, לבין חוקרים מתחום מדעי הצמח העושים שימוש במודלים צמחיים ושמרים. שיתוף הפעולה בין הקבוצות צפוי להביא מחד לבחינת פעילות החומרים *in vivo*, בעכברים כמודל, ומאידך להבנת מנגנון פעילות החומרים תוך שימוש בתאי שמרים.

מטרות המחקר

1. בחינת פעילות אנאלוגים לסטריגולקטונים על התפתחות גידולים בעכברי, תוך קביעת השפעתם על התפתחות גידולים סרטניים, ועל התפתחות גרורות.
2. בחינת פעילות אנאלוגים לסטריגולקטונים על התפתחות תרביות שמרים, תוך קביעת מנגנון הפעולה של החומרים, וזיהוי תכונות קישורם לרצפטור, וזיהוי המסלולים התאיים אשר משופעלים על ידי חומרים אלו, ומביאים לאפופטוזיס ולהפחתה בחלוקת התאים.

5. מידת ההתאמה של המחקר לתחומי העדיפויות של צוותי ההיגוי:

ההצעה עונה על יעדי הקול הקורא בכך שמציעה לפתח לעשות את הצעדים הראשונים וההכרחיים לפיתוח תרופה חדשנית כנגד מחלת הסרטן, כרעיון חדש ומקורי, שלא מומן בעבר על-ידי קרן מחקר כלשהי. הצלחת המחקר תביא לפיתוח תרופה חדשה דבר זה יתרום למינוף השימוש בחומר הצמחי לתרופה כנגד סרטן, שיכול לכלול בתוכו מערכי ייצור חקלאיים, המשולבים בתעשייה הפרמקולוגית. למרות חדשנותה וראשוניותה של ההצעה, היא נסמכת על תוצאות מבוססות בקווי תאים, שמעלות את הסבירות להצלחת המחקר.

6. תמצית תוכנית מחקר כולל שיטות ניסיוניות:

1. בחינת פעילות אנאלוגים לסטריגולקטונים על התפתחות גידול ים בעכברים, תוך קביעת השפעתם על התפתחות גידולים סרטניים, ועל התפתחות גרורות.

בהסתמך על הניסויים המקדימים *in vitro*, בהם סטריגולקטונים גרמו לירידה בחלוקת תאים של סרטן השד. תאי סרטן שד ישמשו כמודל לבדיקת השפעת סטריגולקטונים על התפתחות גושים סרטניים ואו מוות מתוכנן של תאים סרטניים בניסוי *in vivo*.

על מנת לבדוק השפעת סטריגולקטון על התפתחות סרטן השד *in vivo*. תאי סרטן שד מסוג MCF7 יוזרקו בהזרקה תת עורית אל עכברים ערומים (BALBc/athemic nude mice). לעכברים יוזרקו $10^6 \times 3$ תאים בתמיסת PBS סטרילית. שלושה ימים לאחר הזרקת התאים נתחיל מתן סטריגולקטון או PBS לקבוצת הביקורת. פעם בשבוע נזריק סטריגולקטון אל חלל הבטן במינון שימצא אופטימלי (מניסוי המקדים). הניסוי ימשך בין 6-8 שבועות בתקופה זו העכברים יוחזקו בתנאים הולמים לפי

החוקים המקובלים לעבודה עם בעלי החיים ולפי התנאים בבית החיות האוניברסיטאי באוניברסיטת בן-גוריון (אישור ביואתיקה מספר 012_b4884_31). במהלך הניסוי העכברים יבדקו באופן שבועי הגושים התת עוריים יבדקו וקוטרם ימדד באמצעות סרגל מדידה (קליבר). בתום הניסוי העכברים יוקרבו והגידולים התת עוריים באם יתפתחו ילקחו מהחיות, ימדד הקוטר והמשקל של הגידולים. יערך חיפוש וספירה של גרורות באיזורים כמו רקמת שריר, כבד טחול וריאות. הגידולים מהעכברים ילקחו ויעברו קיבוע ופרפיניזציה עלמנת ליצור חתכים דקים לאימונוהיסטוכימיה. באימונוהיסטוכימיה יבדקו מרקרים של מוות תאים כמו TUNEL. חלק מהגידולים שיתפתחו בעכברי הניסוי ילקחו ויופקו מהם כלל החלבונים. החלבונים של הגידולים יופרדו על גבי גיל SDS-PAGE ויועברו לממברנת ניטרצולוז. הממברנות יודגרו עם נוגדנים מסחריים שפותחו כנגד חלבונים פרו-אפופטוטיים כגון Bax או חלבונים אנטי-אפופטוטיים כמו Bcl-2 או Bcl-xL. בנוסף, חלבוני סיגנלים המעורבים בחלוקה וגדילת תא כמו PI3K/AKT ומסלולים המושפעים מסטרס כמו JNK1/MAPK יבדקו עם הנוגדנים המתאימים ותתבצע הערכה של רמת הביטוי שלהם כתוצאה של טיפול עם סטריגולקטונין (Pollock et al., 2012).

2. בחינת פעילות אנאלוגים לסטריגולקטונין על התפתחות תרביות שמרים, תוך קביעת מנגנון הפעולה של החומרים, זיהוי תכונות קישורם לרצפטור, וזיהוי המסלולים התאיים אשר משופעלים על ידי חומרים אלו, ומביאים לאפופטוזיס ולהפחתה בחלוקת התאים.
אנאלוגים שונים לסטריגולקטונין המצויים בידניו ישמשו לבחינת השפעתם על תרביות תאי שמרים. המחקר בנושא זה יכלול מספר קווי פעולה.

1. בחינת השפעת החומרים על חלוקת תאי שמרים: תרביות שמרים יגודלו בנוכחות האנאלוגים השונים, בריכוזים שונים, ותבחן התפתחות התרבית, חלוקת התאים ומספר התאים המתים בתרבית מול ביקורת.
2. בחינת אפיניות לרצפטור/ים ויחסי אנטגוניזם/סינרגיזם בין המולקולות: השפעת האנאלוגים על תרביות השמרים תבחן במשרעת ריכוזים. מתוך כך תחושב הפעילות המקסימלית, יחושב ה-EC50 והאפיניות לרצפטור הקולט את החומר ומביא לתגובה הביולוגית, על פי (Weyers et al., 1987). טיפול התרביות בצירופי האנאלוגים השונים, תוך שימוש מושכל בריכוזים המתאימים (המביאים לרמת פעילות מדודה) יאפשרו בחינה של יחסי אנטגוניזם/סינרגיזם/קומפלמנטציה שבין האנאלוגים השונים, והערכה של מספר הרצפטורים השונים המשתתפים בתהליך.
3. בחינת ביטוי גנים המקושרים למסלולים חלוקת התא ואפופטוזיס: לאחר קביעת הריכוזים האפטימליים של האנאלוגים היעילים ביותר, הנותנים את ההשפעה הברורה ביותר על תאי השמרים, יטופלו התרביות בריכוזים אלו וילקחו להפקת RNA. יבחנו רמות ביטוי גנים שונים על ידי PCR כמותי, תוך שימוש בפריימרים לגנים לפי הטבלה בנספח. בחינה זו תאפשר זיהוי מסלולי האפופטוזיס המופעלים על ידי החומרים, וכן אפיון מדויק של שלבי מחזור התא עם הטיפולים השונים מול ביקורת.

8. הערכה כלכלית במידה ונושא תוכנית המחקר מאפשר זאת

תוכנית המחקר עוסקת בפיתוח עתידי של תרופה או תוסף שמביאים לדיכוי מוקדי התרבות סרטנית. מהערכות מקובלות בעולם מידי שנה מתגלים 12.5 מיליון מיקרים חדשים של חולים הזקוקים לטיפול. עלות רב התרופות לחולה, לשנה הינה \$100,000. על כן, פיתוח תרופה או תוסף לתרופה לסרטן מוערך במאות מיליונים של דולרים לשנה לכל אחד מסוגי הסרטן הנפוצים. ההצעה הנוכחית בודקת אנאלוגים שהוכחו כמדכאים חלוקת תאי סרטן מלפחות 5 סוגים, מהנפוצים שבהם. על כן חשיבות ההצעה רבה מבחינה כלכלית.

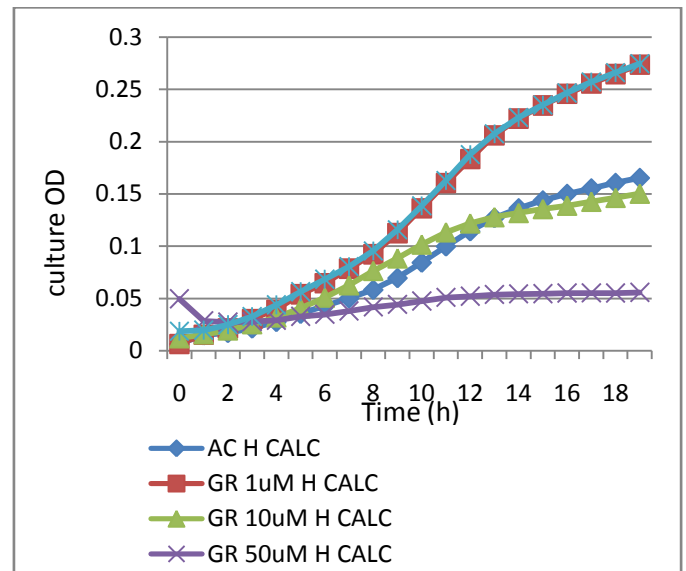
9. אין לחוקרים לנושא זה, או דומה לו, כל מימון ממקורות תקציב שאינם קרן המדען, תוכנית זו או דומה לה לא הוגשה למקור מימון אחר.

תוצאות הקדמיות

1. מאמר Pollock et al., 2012

2. תוצאות ראשוניות של השפעת האנאלוגים לסטריגולקטונים על תרביות שמרים

תרביות שמרים גודלו עם אחד מהאנאלוגים השונים (GR24). התפתחות התרביות נבדקה, ונמצא כי האנאלוג הזה הביא לירידה בהתפתחות תרביות התאים. נצפתה ירידה בהתרבות מחד, ומאידך, ירידה במספר התאים הקיימים (תמונה 1). במחקר המוצע נרחיב את המחקר בשמרים, דבר זה יאפשר אפיון של מנגנון הפעולה של החומרים השונים.



תמונה 1: התפתחות תרביות שמרים בנוכחות GR24 וביקורת (AC)

3. גנים שייבחנו לביטויים בתרביות השמרים המטופלות בחומרים מול ביקורת

Apoptosis

ROS (early events): RHO5; **Caspases-dependent:** YCA1; **YCA1 (caspases) independent:** AIF1, Nuc1p; **Ras pathway of apoptosis:** Pho36p; **MAP kinase-signaling cascade:** Ste20p; **Proteosome:** CDC48/vcp;

Cell cycle:

Initiation (DNA rep): Dbf4, Cdc7; **the G1/S and G2/M transitions:** Cdc2; Pol3; **G1:** B-type cyclins Cig2, Cdc13; **G2 specific:** CLB1

References

Pollock et al., 2012. Breast Cancer Res Treat. DOI 10.1007/s10549-012-1992-x.
Weyers et al., 1987. Plant, Cell and Environment. 10, 1-10.