

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

Μελέτη μηχανισμών μεταγωγής σήματος μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον ανθρώπινο καρκίνο

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παναγιώτης Κ. Καρκούλης, M.Sc.

Βιολόγος

Αθήνα, Ιούλιος 2011

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δ.Ι. Στραβοπόδης	Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)
Λ.Χ. Μαργαρίτης	Ομ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ι.Σ. Παπασιδέρη	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δ.Ι. Στραβοπόδης	Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)
Λ.Χ. Μαργαρίτης	Ομ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Αικ. Γαϊτανάκη	Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
Ι.Σ. Παπασιδέρη	Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
Γ.Ε. Βουτσινάς	Ερευνητής Β', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
Π. Κόλλια	Επ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
Ι.Π. Τρουγκάκος	Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα

Ν. 5343/1932, άρθρο 202

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης (Διευθυντής, Δρ. Γ.Ε. Βουτσινάς), Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Αγ. Παρασκευή 15310, Αθήνα, Ελλάδα

Στους πολυαγαπημένους μου γονείς,
Κωνσταντίνο και Πηνελόπη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Διδακτορικών Διπλωμάτων, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με αντικείμενο *Μελέτη μηχανισμών μεταγωγής σήματος μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον ανθρώπινο καρκίνο*. Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης του Δρ. Γ. Βουτσινά, στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών, «Δημόκριτος».

Το χρονικό διάστημα της διεξαγωγής της διδακτορικής μου διατριβής προσπάθησα σκληρά να πετύχω του ερευνητικούς στόχους που οραματίστηκα ξεκινώντας αυτή την προσπάθεια. Στα χρόνια εκπόνησης της συγκεκριμένης ερευνητικής δουλειάς, μέσα από όλες τις στιγμές που πέρασα στο εργαστήριο, καλές και δύσκολες, έμαθα καλύτερα τις αντοχές και τα όριά μου, βίωσα το ζήλο για την έρευνα και τον εργαστηριακό πάγκο, ενώ παράλληλα κατάφερα να εξελιχθώ ως νέος επιστήμονας και ως άνθρωπος. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να αφιερώσω τις παρακάτω γραμμές στους ανθρώπους που με στήριξαν όλα αυτά χρόνια, ήταν δίπλα μου και συνέβαλαν ο καθένας με το δικό του τρόπο, στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής καθώς και στη δική μου επιστημονική, οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή της διδακτορικής μου διατριβής, Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη, καθώς αποτελεί τον άνθρωπο που ενέπνευσε την ενασχόλησή μου με την έρευνα και μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη συγκεκριμένη διατριβή. Του είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, όταν πριν από περίπου πέντε χρόνια μπήκα στο γραφείο του και του ζήτησα να δουλέψουμε μαζί, για την απλόχερη βοήθεια και συμπαράστασή του σε επίπεδο τόσο επιστημονικό, όσο και προσωπικό, καθώς και για τις υποδείξεις και τις πολύτιμες επισημάνσεις του σε ερευνητικό επίπεδο. Σε όλο το χρονικό διάστημα διεξαγωγής της διατριβής μου υπήρξε εξαιρετικός επιστημονικός

υπεύθυνος, παρέχοντας απλόχερα τη γνώση και την εμπειρία του. Σε όλο το διάστημα διεξαγωγής της διατριβής συνεργαστήκαμε στενά, η καθοδήγησή του ήταν πολύ σημαντική για εμένα, τόσο σε επίπεδο επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό, καθώς ήξερα ότι είχα διαρκώς τη στήριξη και τη βοήθειά του. Τον ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψουμε μαζί και να μοιραστούμε συναισθήματα χαράς, προσμονής, αγωνίας και (ελάχιστες φορές) απογοήτευσης.

Επίσης, δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Ομότιμο Καθηγητή Λουκά Χ. Μαργαρίτη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους, τις διάφορες επισημάνσεις και τις επιστημονικές συμβουλές τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, την Καθηγήτρια Αικατερίνη Γαϊτανάκη, την Επίκουρη Καθηγήτρια Παναγούλα Κόλλια και τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο, για την ευγενική τους συμμετοχή στην επταμελή εξεταστική επιτροπή και τη συνεισφορά τους στη διαμόρφωση της τελικής μορφής της συγκεκριμένης διατριβής.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά τον Ερευνητή Β' και Διευθυντή του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Δρ. Γεράσιμο Ε. Βουτσινά. Αποτελεί μεγάλη μου τιμή το γεγονός ότι με φιλοξένησε για σχεδόν μια πενταετία στο εργαστήριό του, παρέχοντας απλόχερα τη γνώση, την τεχνική εμπειρία και τον εξοπλισμό που διαθέτει, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να υλοποιήσω και να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη διατριβή. Είναι ο άνθρωπος με τον οποίο είχα την πλέον στενή συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, καθώς υπήρξε επιστημονικός καθοδηγητής και συμπαραστάτης μου για όλο το χρονικό διάστημα που βρέθηκα στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου για όσα μου προσέφερε, τόσο σε επίπεδο επιστημονικό, όσο και προσωπικό. Είναι ο άνθρωπος που έδειξε αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη προς το πρόσωπό μου όλο αυτά τα χρόνια, με βοήθησε σημαντικά στη συγγραφή και τη διόρθωση της συγκεκριμένης διατριβής, ενώ οι ατέλειωτες επιστημονικές μας συζητήσεις υπήρξαν τροφή για τον νου και το

έναυσμα πειραματικών διαδικασιών που ενίσχυσαν σημαντικά το επιστημονικό υπόβαθρο της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας. Του είμαι ευγνώμων για όλα, η συνεργασία μας τόσα χρόνια ήταν εξαιρετική και τον ευχαριστώ πάρα πολύ για την επιστημονική καθοδήγησή του και τη βοήθειά του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Ευμορφία Κωνσταντάκου, με την οποία είχα τη χαρά και την τιμή να δουλέψω στενά όλο το χρονικό διάστημα της εκπόνησης της διατριβής μου. Πρόκειται για μια εξαιρετική επιστήμονα και αξιόλογη φίλη μου, την ευχαριστώ πολύ για όλα, τις συμβουλές της, την απλόχερη βοήθειά της και την υπομονή της. Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης· τους υποψήφιους διδάκτορες Δήμητρα Αναστασίου και Στέφανο Καχρίλα, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Σοφία Μελαχροινού και Κατερίνα Βεστάκη, την προπτυχιακή φοιτήτρια Στεφανία Μπασογιάννη, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Αντώνη Λαμπιδώνη και τον Σωκράτη Αυγέρη, τεχνικό του εργαστηρίου. Τους ευχαριστώ όλους για την ομαλή συνεργασία, δίπλα τους έμαθα πολλά και ελπίζω και να άφησα και εγώ θετικά συναισθήματα σε όλους. Είναι δύσκολο να αποτυπωθούν στο χαρτί όλες οι όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, καθώς οι σκέψεις, οι εμπειρίες, οι άφθονες στιγμές γέλιου και δουλειάς στον πάγκο διαμόρφωσαν ένα όμορφο παζλ συναισθημάτων το οποίο θα με συντροφεύει πάντα.

Στο σημείο αυτό, δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω το Δρ. Δημήτρη Κλέτσα, Ερευνητή Α' και Διευθυντή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και το Δρ. Χάρη Πρατσίνη, Ερευνητή Δ' και μέλος της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης για την συνεισφορά τους στην αποπεράτωση των πειραμάτων της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και για τις χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης, θα πρέπει να ευχαριστήσω και τους επιστημονικούς συνεργάτες της ερευνητικής μας ομάδας, τη Δρ. Έμα Αναστασιάδου (Ερευνήτρια Δ') και την υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Θανασοπούλου, μέλη του Τομέα Γενετικής και

Γονιδιακής Θεραπείας, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.), καθώς και τον Δρ. Γεώργιο Τσάγκαρη (Ερευνητή Α'), μέλος του Τομέα Βιοτεχνολογίας, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.), για τη συμβολή τους στην εκπόνηση των πειραμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω θερμά τους Δρ. Αθανάσιο Βελέντζα, Δρ. Παναγιώτη Βελέντζα και Δρ. Βασιλική Μπάκου για τη βοήθειά τους στον χειρισμό του Συνεστιακού Σαρωτικού Μικροσκοπίου Laser που εδάζεται στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής.

Από τα βάθη της καρδιάς μου, το πιο μεγάλο ευχαριστώ πηγαίνει στην οικογένειά μου, τον πατέρα μου Κωνσταντίνο, την μητέρα μου Πηνελόπη και την αδερφή μου Μαρία για την στήριξή τους, ψυχολογική και οικονομική. Τους χρωστώ πολλά και ελπίζω να συνεχίσω να τους κάνω υπερήφανους. Στο πλευρό μου στάθηκαν και συνεχίζουν να στέκονται πολλοι καλοί μου φίλοι, τους οποίους ευχαριστώ όλους που με στηρίζουν και με ανέχονται. Τέλος, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην Μαρία, το δικό μου άνθρωπο, για τη στήριξη, την υπομονή και την αμέριστη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια.

Παναγιώτης Κ. Καρκούλης, M.Sc.

Ιούλιος 2011

«Η επιστημονική ανακάλυψη συνίσταται στο να βλέπεις αυτό που βλέπει ο καθένας και να σκέφτεσαι αυτό που δεν σκέφτεται κανένας»

Albert von Szent-Gyorgyi
1893-1986
Ούγγρος Φυσιολόγος

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ-ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ

Συντμήσεις-Συμβολισμοί-Λεξιλόγιο

17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-αλλυλάμινο-17-διμεθοξυτζελνταναμυκίνη
17-DMAG	17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-διμεθυλ άμινο-αιθυλάμινο-διμεθόξυ-τζελνταναμυκίνη
ABP	Aminobiphenyl, αμινοδιφαινύλιο
ACN	Acetonitrile, ακετονιτρίλιο
ADP	Adenosine diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη
Aha1	Activator of Hsp90 ATPase, ενεργοποιητής της Hsp90 ενεργότητας ATPάσης
AJCC	American joint committee on cancer, Αμερικανική κοινή επιτροπή για τον καρκίνο
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1, παράγοντας 1 ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης
APS	Ammonium persulfate, υπερθειικό αμμώνιο
As	Arsenic, αρσενικό
ATP	Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
BA	Benzoquinone ansamycins, ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, λέμφωμα Β-λεμφοκυττάρων 2
BSA	Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός
Cdc37	Cell division cycle 37 homologue, ομόλογο 37 του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης
Cdk4	Cyclin dependent kinase 4, κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 2Α
cDNA	complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
CED	Cell death abnormality (*C.elegans*), γονίδιο ανωμαλίας κυτταρικού θανάτου
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate, 3-[(3-χολαμιδοπροπύλ)-διμεθυλαμμώνιο]-1-προπανοσουλφονικό οξύ
CHIP	carboxy-terminus of Hsp70 interacting protein, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό τμήμα της Hsp70

cIAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1, πρωτεΐνη 1 κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης
cIAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2, πρωτεΐνη 2 κυτταρικός αναστολέας της απόπτωσης
CIS	Carcinoma *in situ*, καρκίνος *in situ* (επί τόπου)
CMA	Chaperone-mediated autophagy, αυτοφαγία μεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς
CML	Chronic myelogenous leukemia, χρόνια μυελογενής λευχαιμία
DAPK	Death associated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση συνδεδεμένη με θάνατο
DBCCR1	Deleted in bladder cancer chromosome region 1, χρωμοσωμική περιοχή 1 με ελλείψεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης
ddH_2O	Double distilled water, νερό διπλής απόσταξης
DNA	Deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DTT	Ditheiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
ECL	Enhanced chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωτεαύγεια
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid, αιθυλενοδιάμινο-τετραοξικό οξύ
EGF	Epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Epidermal growth factor receptor, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinases ½, κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα ½
EtBr	Ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
FACS	Fluorescent activated cell sorting, κυτταρομετρία ροής ενεργού φθορισμού
FGF	Fibroblast growth factor, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
FGFR	Fibroblast growth factor receptor, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών
FKBP52	FK506 binding protein 4, πρωτεΐνη 4 συνδεδεμένη με το FK506
FOXO	Forkhead box O, μεταγραφικοί παράγοντες FOXO
GA	Geldanamycin, τζελνταναμυκίνη
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης Mu 1

GTP	Guanosine triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη
HDAC6	Histone deacetylase 6, αποακετυλάση των ιστονών 6
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-υδροξυ αιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2, υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
HGF-R	Hepatocyte growth factor receptor, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1α, παράγοντας επαγόμενος από υποξία 1α
Hip	Hsc70 interacting protein, αλληλεπιδράζουσα με την Hsc70 πρωτεΐνη
Hop	Hsp70/Hsp90 organizing protein, πρωτεΐνη οργάνωσης συμπλόκου Hsp70/Hsp90
HPV	Human papilloma virus, ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene, ιϊκό ογκογονίδιο σαρκώματος του αρουραίου Harvey
HRP	Horseradish peroxidase, υπεροξειδάση αγριοραφανίδας
Hsc70	Heat shock cognate 70,
Hsp90	Heat shock protein 90, πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90
Hsp70	Heat shock protein 70, πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70
IARC	International agency for research on cancer, Παγκόσμια υπηρεσία έρευνας για τον καρκίνο
ICE	Interleukin-1beta-converting enzyme, ένζυμο μετατροπής της ιντερλευκίνης 1-βήτα
IGF-I	Insulin-like growth factor I, προσομοιάζων στην ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας I
IGF-IR	Insulin-like growth factor I receptor, υποδοχέας προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I
IκB	Inhibitor of NF-κB, αναστολέας του NF-κB
IKK	IκB Kinase, κινάση των IκB
IL-8	Interleukin-8, ιντερλευκίνη-8
IP	Immunophilins, ανοσοσφιλίνες
IPG	Immobilized pH gradient strips, ταινίες κλίσης ακινητοποιημένου pH
JAK	Janus kinase, κινάση Ιανός
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene, ιϊκό ογκογονίδιο σαρκώματος του αρουραίου Kirsten

LAMP2A	Lysosomal-associated membrane protein 2A, μεμβρανική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με λυσοσώματα
LOH	Loss of heterozygosity, απώλεια ετεροζυγωτίας
MAPK	Mitogen activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση επαγόμενη από μιτογόνο (α)
MEK	(or MAP2K) Mitogen activated protein kinase kinase, κινάση της πρωτεϊνικής κινάσης επαγόμενης από μιτογόνο (α)
Mdm2	Murine double minute oncogene 2, διπλό λεπτό ογκογονίδιο 2 ποντικού
MMP	Matrix metalloproteinase, μεταλλοπρωτεϊνάση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
mRNA	messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
MSK1	Mitogen and stress activated protein kinase 1, πρωτεϊνική κινάση 1 ενεργοποιημένη από μιτογόνο (α) και στρες
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4,5-Διμεθυλθειαζόλ-2υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο του βρωμίου
MVAC	Methotrexate-Vinblastine-Adriamycin-Cisplatin, μεθοτρεξάτη-βινμπλαστίνη-αδριαμυκίνη-σισπλατίνη
NAT1	N-acetyltransferase 1, N-ακετυλοτρανσφεράση 1
NAT2	N-acetyltransferase 2, N-ακετυλοτρανσφεράση 2
NEMO	NF-κB essential modulator, ουσιαστικός ρυθμιστής του NF-κB
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων της κ-ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών σε ενεργοποιημένα Β-κύτταρα
NQO1	NAD(P) quinone oxidoreductase 1, οξειδοαναγωγάση της NAD (P) κινόνης
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου
PARP	Poly-ADP ribose polymerase, πολυμεράση της πολυ-ADP ριβόζης
PBS	Phosphate buffer saline, διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase chain reaction, αλυσ(ιδ)ωτή αντιδραση πολυμεράσης
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase-isozyme 1, ισοένζυμο της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος
PI	Propidium iodide, ιωδιούχο προπίδιο

PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase, κινάση 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, φαινυλμεθυλ-θειώδες φθορίδιο
PP5	Protein phosphatase 5, πρωτεϊνική φωσφατάση 5
pRb	Retinoblastoma protein, πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, ομόλογο της φωσφατάσης και της τενσίνης
Ras	Rat sarcoma gene, γονίδιο σαρκώματος ποντικού
RASSF1A	RAS association domain family 1A, οικογένεια πρωτεϊνών 1A σχετιζόμενη με περιοχή του RAS
RNA	Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ
RTK	Receptor tyrosine kinase, υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης
RT	Reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή
rpm	Rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
SCC	Squamous cell carcinoma, καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων
SCID	Severe combined immunodeficiency, ισχυρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
SDS	Sodium dodecyl sulfate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SKY	Spectral karyotyping, φασματοσκοπική καρυοτύπηση
TBE	Buffer solution containing Tris-base [Tris(hydroxymethyl)-aminomethane], boric acid and EDTA, διάλυμα που περιέχει Tris-(υδροξυμεθύλ)-αμινομεθάνιο, βορικό οξύ και EDTA
TBS	Tris buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα Tris
TBS-T	Tris buffered saline – Tween-20, ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει Tween-20
TCC	Transitional cell carcinoma, καρκίνωμα κυττάρων του μεταβατικού επιθηλίου
TEMED	Tetramethylethylenediamine, τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
TF's	Transcription factors, μεταγραφικοί παράγοντες
TNM	Tuomr-Node-Metastasis, όγκος-λεμφαδένας-μετάσταση (σύστημα σταδιοποίησης νεοπλασμάτων)
TNF	Tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
TORC2	Target of rapamycin complex 2, στόχος του συμπλόκου ραπαμυκίνης 2
TP	Thymidine phosphorylase, φωσφορυλάση της θυμιδίνης

TPR	Tetratricopeptide repeat, τετρατρικοπεπτιδικές επαναλήψεις
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane, τρι-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1, πρωτεΐνη 1 που συμμετέχει στο σύμπλοκο της Οζώδους Σκλήρυνσης
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2, πρωτεΐνη 2 που συμμετέχει στο σύμπλοκο της Οζώδους Σκλήρυνσης
v/v	volume/volume, συγκέντωση κατ' όγκο (ml διαλυμένης ουσίας ανά ml διαλύτη)
VEGF	vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
v-Src	viral sarcoma, ιϊκό ογκογονίδιο του σαρκώματος
w/v	weight/volume, συγκέντρωση κατά βάρος (g διαλυμένης ουσίας ανά ml διαλύτη)
WHO	World health organization, Παγκόσμιος οργανισμός υγείας
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein, πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης, συνδεδεμένη με το Χ χρωμόσωμα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγικά στοιχεία 2

1.1 Ουροποιητικό σύστημα 2

1.1.1 Γενικά 2

1.1.2 Ουροδόχος κύστη 3

1.1.2.1 Κατασκευή της ουροδόχου κύστης 6

1.1.2.2 Αρτηριακή παροχή της ουροδόχου κύστης 7

1.1.2.3 Φλεβική παροχέτευση της ουροδόχου κύστης 7

1.1.2.4 Λεμφική παροχεύτευση της ουροδόχου κύστης 7

1.1.2.5 Νεύρωση της ουροδόχου κύστης 8

1.1.2.6 Ιστολογικά χαρακτηριστικά της ουροδόχου κύστης 8

1.2 Καρκίνος της ουροδόχου κύστης 12

1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία 12

1.2.2 Παράγοντες κινδύνου 16

1.2.3 Διαβάθμιση κακόηθων νεοπλασμάτων (Grading) 22

1.2.4 Σταδιοποίηση κακόηθων νεοπλασμάτων (Staging) 23

1.2.5 Γενετική προσέγγιση 29

1.2.5.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3) 33

1.2.5.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Ras-MAPK) 35

1.2.5.3 Μονοπάτι της πρωτεΐνης p53 36

1.2.5.4 Μονοπάτι της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) 38

1.2.5.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3 κινάσης 39

1.2.5.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι καρκινικής αγγειογένεσης 43

1.2.6 Αντιμετώπιση - Θεραπευτικά Πρωτόκολλα 44

1.2.6.1 Εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο της ουροδόχου κύστης 46

1.2.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν συγκεκριμένες γενετικές μεταβολές 47

1.2.7 Εθισμός καρκινικών κυττάρων σε ογκογονίδιο (Oncogene addiction) 50

1.3 Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Heat shock proteins) 51

1.3.1 Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90 (Hsp90) 54

1.3.1.1 Μοριακή ανατομία της Hsp90 55

1.3.1.2 Σύμπλοκο Hsp90 **-** Συνοδευτικές πρωτεΐνες 59

1.3.2 Οι πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90 61

1.3.2.1 Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης 63

Υποδοχέας HER2 ($p185^{erbB2}$) 63

Υποδοχείς στεροειδών ορμονών 64

1.3.2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες 65

Κινάση Akt 65

Πρωτεϊνική κινάση Raf-1 66

Σύμπλοκο κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4/κυκλίνης D 66

Κινάσες του ΙκΒ 67

Πρωτεΐνη p210$^{bcr-abl}$ 68

1.3.2.3 Μεταγραφικοί παράγοντες 68

Μεταλλαγμένη p53 68

Παράγοντας επαγόμενος από υποξία 1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α, HIF-1α) 69

1.3.3 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και καρκινογένεση 71

1.4 Αντιβιοτικά Ανσαμυκίνης τύπου Βενζοκινόνης (Benzoquinone Ansamycins BA) 74

1.4.1 Ειδικότητα στόχευσης καρκινικών κυττάρων από τα ημισυνθετικά ανάλογα της τζελνταναμυκίνης 80

2. Σκοπός της διατριβής 83

3. Υλικά και μέθοδοι 85

3.1 Βιολογικό Σύστημα 85

3.1.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης 85

3.1.2 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών 87

3.1.3 Φύλαξη καρκινικών κυττάρων – Κατάψυξη και απόψυξη 89

3.1.4 Υλικά κυτταροκαλλιεργειών 90

3.2 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου 92

3.2.1 Δοκιμασία FACS – Κυτταρομετρία ροής 92

3.3 Δοκιμασία MTT 94

3.3.1 Προσδιορισμός της μεταβολικής δραστηριότητας των μιτοχονδρίων 94

3.4 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα 96

3.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) 98

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 99

3.7 Ηλεκτροφόρηση RNA και προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 103

3.8 Χορήγηση IGF-I σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 105

3.9 Συλλογή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων 106

3.10 Ανίχνευση και μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών 108

3.10.1 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών 108

3.10.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών 112

3.10.3 Ανάλυση ανοσοστυπώματος Western 114

3.10.4 Αφαίρεση ανοσοσυμπλόκων από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping) 118

3.11 Ανοσοκυτταροχημεία 120

3.12 Πρωτεωμική τεχνολογία 122

3.12.1 Ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων 123

3.12.2 Χρώση και ανίχνευση πρωτεϊνών 126

3.12.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματογράφο μάζας 127

3.13 Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων 129

3.14 Δοκιμασία μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω πρόσδεσης (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 131

3.15 Ανίχνευση ενεργοποίησης λυσοσωμάτων και ανάπτυξη αυτοφαγίας 136

3.16 Δοκιμασία Επούλωσης Πληγής 137

3.17 Στατιστική Ανάλυση 138

3.18 Εργαστηριακός Εξοπλισμός 139

3.18.1 Συσκευές 139

3.18.2 Γυάλινα-Πλαστικά Σκεύη 141

4. Αποτελέσματα 143

4.1 Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 143

4.1.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου 143

4.1.2 Η τζελνταναμυκίνη εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 149

4.1.3 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης ενεργοποιεί μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου 152

4.1.4 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης ενεργοποιεί εναλλακτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης – Αυτοφαγία 158

4.1.5 Τζελνταναμυκίνη και αναστολή της Hsp90 159

4.1.6 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της σηματοδότησης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 163

4.2 Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 175

4.2.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου 175

4.2.2 Το 17-AAG εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 181

4.2.3 Το 17-AAG ενεργοποιεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου 184

4.2.4 17-AAG και αναστολή της Hsp90 187

4.2.5 Η χορήγηση 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης 191

4.2.6 Η χορήγηση 17-AAG οδηγεί σε αναστολή της κινητικότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης 204

4.2.7 Αναστολή της Hsp90 από το 17-AAG – Μεταβολές σε επίπεδο πρωτεώματος 207

4.2.7.1 Πρωτεϊνικά μόρια που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24 210

4.2.7.2 Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24 217

4.3 Επίδραση του ημισυνθετικού αναλόγου 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 227

4.3.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου 227

4.3.2 Το 17-DMAG εκδηλώνει τοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης 235

4.3.3 Το 17-DMAG ενεργοποιεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου 238

4.3.4 Η χορήγηση 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης ενεργοποιεί εναλλακτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου – Αυτοφαγία 243

4.3.5 17-DMAG και αναστολή της Hsp90 245

4.3.6 Η χορήγηση 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης 249

4.3.7 Η χορήγηση 17-DMAG οδηγεί σε αναστολή της κινητικότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης 260

5. Συζήτηση 271

6. Βιβλιογραφικές αναφορές 296

7. Περίληψη 318

7.1 Summary 324

8. Παράρτημα ii

8.1 Δημοσιεύσεις εργασιών ii

8.2. Συμμετοχή σε συνέδρια iii

8.2.1. Εθνικά συνέδρια iii

8.2.2. Διεθνή συνέδρια iii

8.3 Βιογραφικό σημείωμα xxvi

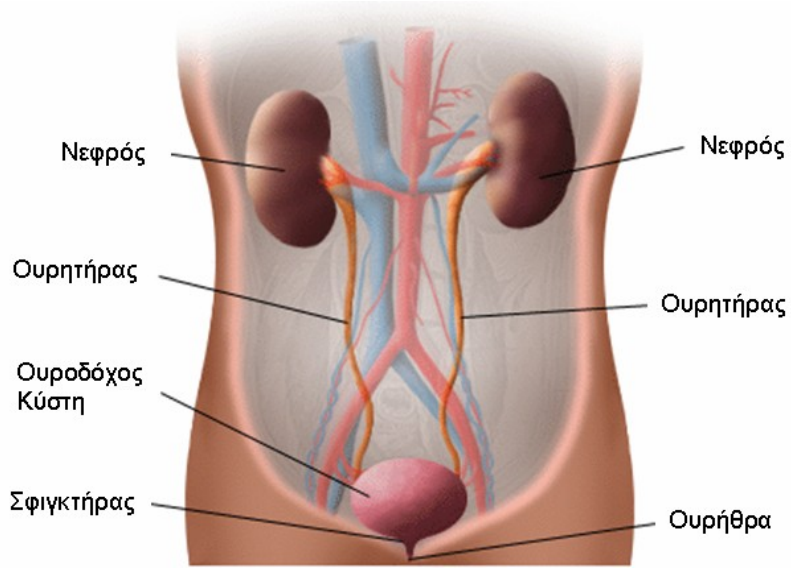
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1. Εισαγωγικά στοιχεία

1.1 Ουροποιητικό Σύστημα

1.1.1 Γενικά

Το ουροποιητικό σύστημα των ανώτερων θηλαστικών συνιστά ένα πολύπλοκο σύνολο οργάνων, κύριες λειτουργίες του οποίου αποτελούν η απομάκρυνση άχρηστων και τοξικών ουσιών από τον οργανισμό, η ρύθμιση των υγρών και των ηλεκτρολυτών του σώματος και η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας [1-3]. Τα κυριότερα μεταβολικά προϊόντα του ουροποιητικού συστήματος αποτελούν το νερό και οι αζωτούχες ενώσεις, όπως η αμμωνία (NH_3), το ουρικό οξύ ($C_5H_4N_4O_3$) και η ουρία (CH_4N_2O). Τα αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού είναι τελικά προϊόντα της αποικοδόμησης των αμινοξέων και των νουκλεϊκών οξέων [2, 3]. Οι πολύπλοκες διεργασίες που επιτελούνται στα επιμέρους όργανα του ουροποιητικού συστήματος συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης των ανώτερων οργανισμών και περιλαμβάνουν τη διήθηση μιας ποικιλίας μικρομοριακών συστατικών του πλάσματος του αίματος, την ενεργητική και παθητική επαναπορρόφηση ποσότητας νερού και θρεπτικών συστατικών και τέλος, την απέκκριση προϊόντων από το αίμα στο διήθημα. Αποτέλεσμα του συνόλου των λειτουργικών διεργασιών είναι η παραγωγή των ούρων και η επίτευξη οσμωρρύθμισης. Τα επιμέρους όργανα που απαρτίζουν το ουροποιητικό σύστημα παρέχουν τους μηχανισμούς εκείνους, μέσω των οποίων αποβάλλεται από το σώμα η περίσσεια νερού και ηλεκτρολυτών [1, 2].



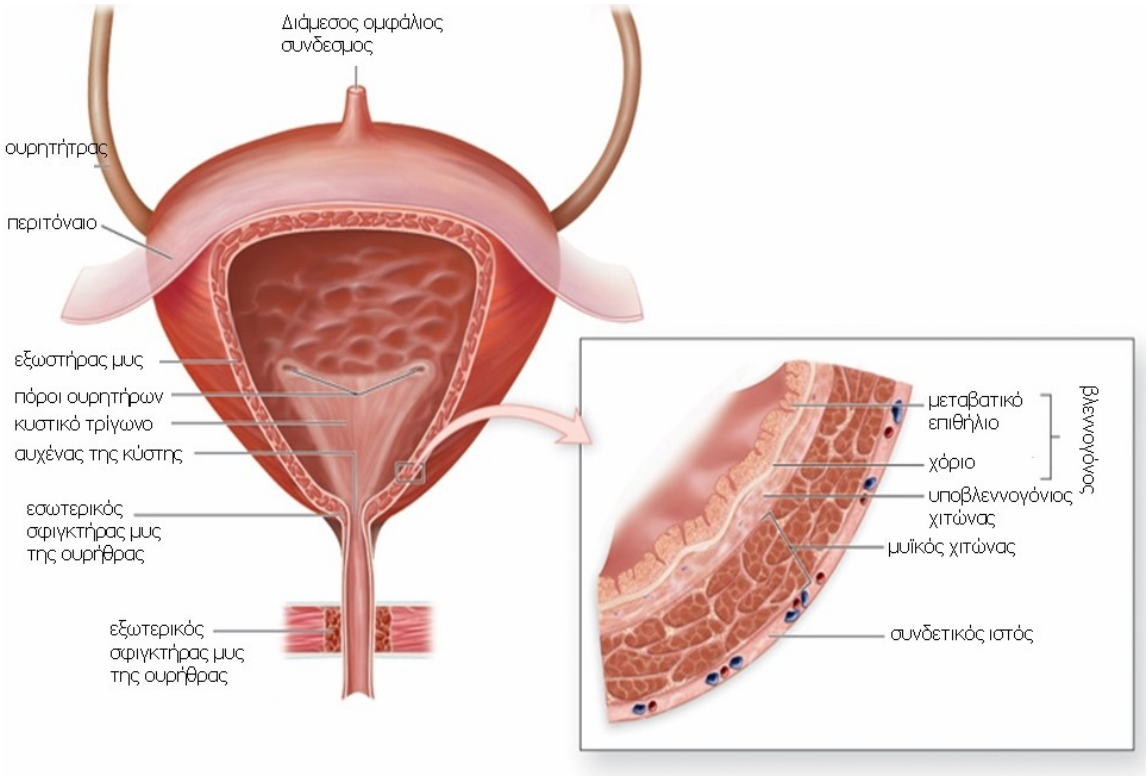
Εικόνα 1: Το ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Διακρίνονται οι νεφροί, το ζεύγος των ουρητήρων, η θέση και το σχήμα της ουροδόχου κύστης και η ουρήθρα (πηγή: http://www.yalemedicalgroup.org).

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελείται από τους δύο (2) νεφρούς, τους δύο (2) ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα (Εικόνα 1). Τα ούρα παράγονται στους νεφρούς και ακολούθως μεταφέρονται μέσω των ουρητήρων στην ουροδόχο κύστη, όπου και αποθηκεύονται μέχρι την αποβολή τους στο εξωτερικό περιβάλλον μέσω της ουρήθρας. Οι νεφροί αιματώνονται από τις νεφρικές αρτηρίες, οι οποίες εκφύονται από την αορτή. Η φλεβική παροχέτευση γίνεται μέσω μιας ή περισσότερων νεφρικών φλεβών οι οποίες εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα. Κατά τη διάρκεια ενός εικοσιτετραώρου, περνά και διηθείται από τους νεφρούς όλη η ποσότητα του αίματος ενός ενήλικα περίπου τριακόσιες (300) φορές [3-5].

1.1.2 Ουροδόχος Κύστη

Η ουροδόχος κύστη είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο στο οποίο αποθηκεύονται παροδικά τα ούρα, μέχρι την τελική απέκκρισή τους στο εξωτερικό περιβάλλον [1]. Στους ενήλικες, η κενή κύστη εντοπίζεται μέσα στην ελάσσονα πύελο, πίσω και επάνω από τα ηβικά οστά. Η ουροδόχος κύστη χωρίζεται από τα ηβικά οστά με την παρεμβολή του οπισθο-ηβικού χώρου. Στα μικρά παιδιά, η ουροδόχος κύστη εντοπίζεται στο κύτος της

κοιλιάς, ακόμα και όταν αυτή είναι κενή. Η κύστη κατέρχεται στην περιοχή της ελάσσονος πυέλου, περίπου στο έκτο ($6^{ο}$) έτος της ηλικίας, αλλά δεν παίρνει την οριστική της θέση, παρά μόνο με την παρέλευση της εφηβείας. Στους ενήλικες, όταν η κύστη είναι άδεια, εντοπίζεται εξ' ολοκλήρου μέσα στην ελάσσονα πύελο, στο πυελικό έδαφος, πίσω από την ηβική σύμφυση. Καθώς η ουροδόχος κύστη γεμίζει, μετατοπίζεται προς την μείζονα πύελο, ενώ όταν πληρωθεί κατά το μεγαλύτερο μέρος της, ανέρχεται μέχρι και το επίπεδο του ομφαλού [1, 6].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της ουροδόχου κύστης των ανώτερων θηλαστικών. Στο σχήμα διακρίνονται η μακροσκοπική δομή και το σχήμα της ουροδόχου κύστης, ενώ σε μεγέθυνση (δεξιά) απεικονίζεται η χαρακτηριστική ιστολογική δομή του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης, όπου εντοπίζονται ο βλεννογόνος, ο μυϊκός και ο ορογόνος χιτώνας συνδετικού ιστού [7].

Η ουροδόχος κύστη περιβάλλεται με ισχυρό μυϊκό τοίχωμα, το οποίο της προσδίδει χαρακτηριστική διατασιμότητα. Ο βλεννογόνος χιτώνας συνδέεται χαλαρά με το μυϊκό τοίχωμα, με εξαίρεση μια τριγωνική περιοχή στον πυθμένα της ουροδόχου κύστης, γνωστή και ως κυστικό τρίγωνο. Ο βλεννογόνος της κενής κύστης εμφανίζει πολυάριθμες πτυχές, οι οποίες δεν

παρατηρούνται στην περιοχή του κυστικού τριγώνου, όπου εξ' αιτίας της σταθερής σύνδεσής του με τον υποκείμενο μυϊκό χιτώνα ο βλεννογόνος είναι λείος. Πίσω από το έσω στόμιο της ουρήθρας παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό, μικρό εξόγκωμα, γνωστό και ως κιονίδα της κύστης, η ιστολογική προέλευση της οποίας τοποθετείται στον μέσο λοβό του προστατικού αδένα [1, 6].

Η ουροδόχος κύστη εμφανίζει σχετική ελευθερία κινήσεων, καθώς εντοπίζεται στον εξωπεριτοναϊκό λιπώδη ιστό, εκτός από τον αυχένα της, ο οποίος συγκρατείται σταθερά από τους ηβο-προστατικούς συνδέσμους. Καθώς η κύστη πληρούται, εύκολα επεκτείνεται προς τα πάνω, μέσα στον εξωπεριτοναϊκό λιπώδη ιστό του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Η μετατόπιση της ουροδόχου κύστης ανυψώνει το περιτόναιο, οδηγώντας σε απομάκρυνσή του από την εγκάρσια περιτονία του κοιλιακού τοιχώματος [1].

Η κενή ουροδόχος κύστη έχει σχήμα τρίγωνης πυραμίδας, ενώ στη διάρκεια της ζωής περιέχει σχεδόν πάντα κάποια (έστω και μικρή) ποσότητα ούρων και έχει σχήμα, λίγο ή πολύ σφαιρικό. Η κενή πυραμιδοειδής κύστη παρουσιάζει τέσσερις (4) επιφάνειες, την άνω επιφάνεια, τις δύο (2) πλάγιες-κάτω επιφάνειες και μια (1) οπίσθια-κάτω επιφάνεια. Η οπίσθια-κάτω επιφάνεια της ουροδόχου κύστης είναι γνωστή και ως πυθμένας. Στις γυναίκες, ο πυθμένας έρχεται σε στενή επαφή με το πρόσθιο τοίχωμα του κολεού, ενώ στον άνδρα, έρχεται σε άμεση επαφή με το ορθό. Το πρόσθιο άκρο, γνωστό και ως κορυφή της κύστης, στρέφεται προς τα εμπρός, προς το άνω χείλος της ηβικής σύμφυσης. Η κατώτερη μοίρα της κύστης, όπου ο πυθμένας και οι πλάγιες-κάτω επιφάνειες συνέχονται, ονομάζεται αυχένας της κύστης. Στους άνδρες, στο σημείο αυτό ο αυλός της κύστης εκβάλλει στην προστατική μοίρα της ουρήθρας. Από την κορυφή της ουροδόχου κύστης ξεκινά η μέση ομφαλοκυστική πτυχή του περιτοναίου, η οποία φέρεται προς τα επάνω ως τον ομφαλό [1, 4, 6].

Το σχήμα της ουροδόχου κύστης υπαγορεύεται από τις δομές που έρχονται σε στενή σχέση με αυτή. Ολόκληρο το όργανο περιβάλλεται από χαλαρό συνδετικό ιστό, την κυστική περιτονία, μέσα στην οποία εντοπίζεται το κυστικό φλεβικό πλέγμα. Η κοίτη της ουροδόχου κύστης σχηματίζεται δεξιά

και αριστερά από τα ηβικά οστά και τους έσω θυρεοειδείς μύες, μαζί με τους ανελκτήρες μύες του πρωκτού και το ορθό. Στη γυναίκα, ο πυθμένας της κύστης χωρίζεται από το ορθό με τον τράχηλο της μήτρας και την ανώτερη μοίρα του κολεού. Ο αυχένας της κύστης εντοπίζεται πάνω στην πυελική περιτονία και περιβάλλει την ουρήθρα. Στον άνδρα, ο πυθμένας της κύστης χωρίζεται από το ορθό με τη λήκυθο του σπερματικού πόρου και τις σπερματοδόχους κύστεις [1, 6].

1.1.2.1 Κατασκευή της ουροδόχου κύστης

Το μυϊκό τοίχωμα της ουροδόχου κύστης συνίσταται εξ' ολοκλήρου από λείες μυϊκές ίνες, που αποτελούν τον εξωστήρα μυ της κύστης. Οι τρεις (3) στιβάδες του μυϊκού τοιχώματος διατάσσονται σε ποικίλες κατευθύνσεις. Σε εγκάρσιες τομές του μυϊκού τοιχώματος, κατά την μικροσκοπική παρατήρηση, αναγνωρίζονται η έξω και έσω επιμήκης στιβάδα, καθώς και μια (1) μέση κυκλοτερής. Κοντά στον αυχένα της κύστης οι μυϊκές αυτές δεσμίδες σχηματίζουν τον ακούσιο έσω σφιγκτήρα μυ. Επίσης, εντοπίζεται μια ομάδα μυϊκών ινών οι οποίες διατάσσονται ακτινοειδώς και ενισχύουν το άνοιγμα του έσω στομίου της ουρήθρας. Στον άνδρα, οι μυϊκές ίνες στην περιοχή του αυχένα συνέχονται με το ινομυώδες στρώμα του προστάτη, ενώ στη γυναίκα, με τις μυϊκές ίνες του τοιχώματος της ουρήθρας [4, 5].

Ο βλεννογόνος χιτώνας της κύστης επενδύεται εσωτερικά από μεταβατικό επιθήλιο, το οποίο επίσης, εμφανίζει σημαντική ικανότητα διάτασης. Τα στόμια των ουρητήρων και το έσω στόμιο της ουρήθρας εντοπίζονται στις γωνίες του κυστικού τριγώνου. Οι ουρητήρες πορεύονται λοξά, μέσα στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης με κατεύθυνση προς τα κάτω και έσω, γεγονός που εμποδίζει την παλινδρόμηση των ούρων προς τον ουρητήρα. Η αύξηση της πίεσης στο εσωτερικό της κύστης, προκαλεί σύμπτωση των τοιχωμάτων των ουρητήρων, εμποδίζοντας έτσι τα ούρα να παλινδρομήσουν και να προκαλέσουν βλάβη των νεφρών. Τα μικρά, σχισμοειδή στόμια των ουρητήρων συνδέονται με μια λεπτή μεσοουρητηρική πτυχή, η οποία αφορίζει προς τα επάνω το κυστικό τρίγωνο [5].

1.1.2.2 Αρτηριακή παροχή της ουροδόχου κύστης

Οι κύριες αρτηρίες οι οποίες διανέμονται στην κύστη αποτελούν κλάδους των έσω λαγόνιων αρτηριών. Οι άνω κυστικές αρτηρίες, κλάδοι των έσω λαγόνιων αρτηριών, αιματώνουν το πρόσθιο-άνω τμήμα της κύστης. Στους άνδρες, οι κάτω κυστικές αρτηρίες, επίσης κλάδοι των έσω λαγόνιων αρτηριών, κατανέμονται στον πυθμένα της ουροδόχου κύστης. Στις γυναίκες, οι μητροκολεϊκές αρτηρίες αντικαθιστούν τις κάτω κυστικές αρτηρίες και στέλνουν μικρούς κλάδους στο οπίσθιο-κάτω τμήμα της κύστης. Οι θυρεοειδείς και κάτω γλουτιαίες αρτηρίες παρέχουν επίσης, μικρούς κλάδους στην αιμάτωση της ουροδόχου κύστης [1, 3, 6].

1.1.2.3 Φλεβική παροχέτευση της ουροδόχου κύστης

Οι φλέβες της κύστης εκβάλλουν στις έσω λαγόνιες φλέβες. Στον άνδρα, το κυστικό φλεβικό πλέγμα, το οποίο αναστομώνεται με το προστατικό πλέγμα, περικλείει τη βάση της κύστης και του προστάτη, τις σπερματοδόχους κύστεις, τους σπερματικούς πόρους και την κατώτερη μοίρα των ουρητήρων. Το κυστικό φλεβικό πλέγμα εκβάλλει συνήθως μέσω των κάτω κυστικών φλεβών στις έσω λαγόνιες φλέβες, αλλά μπορεί να εκβάλλει μέσω των ιερών φλεβών στα σπονδυλικά φλεβικά πλέγματα. Στη γυναίκα, το κυστικό φλεβικό πλέγμα περιβάλλει το ενδοπυελικό τμήμα της ουρήθρας και τον αυχένα της ουροδόχου κύστης [1, 3, 6].

1.1.2.4 Λεμφική παροχέτευση της ουροδόχου κύστης

Λεμφαγγεία από την ανώτερη μοίρα της ουροδόχου κύστης κατευθύνονται προς τους έξω λαγόνιους λεμφαδένες, ενώ τα λεμφαγγεία από την κατώτερη μοίρα κατευθύνονται προς τους έσω λαγόνιους λεμφαδένες. Μερικά λεμφαγγεία της περιοχής του αυχένα, εκβάλλουν στους ιερούς ή κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες [1, 3, 6].

1.1.2.5 Νεύρωση της ουροδόχου κύστης

Οι παρασυμπαθητικές ίνες που νευρώνουν την ουροδόχο κύστη προέρχονται από κλάδους των πυελικών σπλαγχνικών νεύρων. Τα νεύρα του παρασυμπαθητικού είναι κινητικά (ευοδωτικά) για τον εξωστήρα μυ, αλλά ασκούν ανασταλτική δράση στον έσω σφιγκτήρα μυ της ουροδόχου κύστης. Όταν οι μυϊκές ίνες της ουροδόχου διεγείρονται από τη διάταση λόγω αυξημένης ποσότητας ούρων, η κύστη συσπάται, ο έσω σφιγκτήρας χαλαρώνει και τα ούρα ρέουν προς την ουρήθρα, από όπου ακολουθεί η τελική απέκκρισή τους στο εξωτερικό περιβάλλον. Οι συμπαθητικές ίνες για την κύστη προέρχονται από τα νεύρα της κατώτερης θωρακικής και οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού. Οι ίνες αυτές είναι πιθανότατα ανασταλτικές για την κύστη. Τα νεύρα που διανέμονται στην ουροδόχο κύστη σχηματίζουν το κυστικό νευρικό πλέγμα, το οποίο αποτελείται τόσο από συμπαθητικές, όσο και από παρασυμπαθητικές ίνες. Το πλέγμα αυτό αποτελεί συνέχεια του κάτω υπογαστρίου πλέγματος. Οι αισθητικές ίνες που προέρχονται από την ουροδόχο κύστη είναι σπλαγχνικές και μεταφέρουν την αίσθηση του πόνου στο κεντρικό νευρικό σύστημα [1, 3, 6]

1.1.2.6 Ιστολογικά χαρακτηριστικά της ουροδόχου κύστης

Τα επιμέρους όργανα που απαρτίζουν το ουροποιητικό σύστημα, όπως είναι οι νεφρικοί κάλυκες, η νεφρική πύελος, οι ουρητήρες και η ουροδόχος κύστη έχουν το ίδιο βασικό ιστολογικό υπόβαθρο, ενώ τα τοιχώματα των ουρητήρων αυξάνουν βαθμιαία σε πάχος όσο πλησιάζουν την ουροδόχο κύστη. Τα όργανα του ουροποιητικού συστήματος περιβάλλονται εξωτερικά από περιτόναιο, ενώ η σύσταση των τοιχωμάτων από έξω προς τα μέσα είναι η εξής: ορογόνος χιτώνας, υποορογόνιος χιτώνας και περικυστικό λίπος. Εσωτερικά, οι χιτώνες αυτοί επαλείφονται από τον μυϊκό χιτώνα ο οποίος χωρίζεται σε τρεις (3) στιβάδες, την έξω επιμήκη, την μέση κυκλοτερή και την έσω επιμήκη. Ο μυϊκός χιτώνας επαλείφεται εσωτερικά από την υποβλεννογόνια στιβάδα και στο εσωτερικό της εντοπίζεται ο βλεννογόνος

χιτώνας, ο οποίος αποτελείται από τη βλεννογόνια στιβάδα και το μεταβατικό επιθήλιο [1, 4, 5].

Ο βλεννογόνος των οργάνων που απαρτίζουν το ουροποιητικό σύστημα περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο μεταβατικό επιθήλιο και χόριο, το οποίο φέρει χαλαρό μέχρι και πυκνό συνδετικό ιστό. Το χόριο αυτών των οργάνων περιβάλλεται από ένα στρώμα πυκνά διαπλεκομένων λείων μυϊκών ινών [2, 4].



Εικόνα 3: Ανοσοϊστοχημική παρατήρηση του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης. Απεικονίζονται ο βλεννογόνος χιτώνας, ο οποίος φέρει καλυπτήριο, πολύστιβο μεταβατικό επιθήλιο και ο μυϊκός χιτώνας, ο οποίος απαρτίζεται από δεσμίδες λείων μυϊκών ινών (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση x40, πηγή: http://www.med.auth.gr/db/histology/gr/13-4-1.htm).

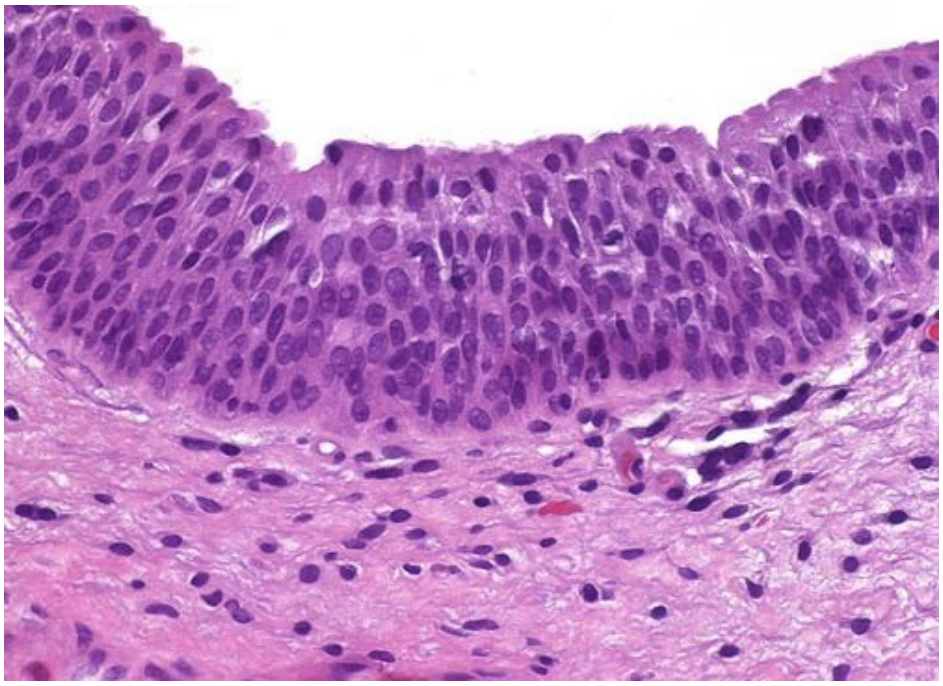
Το επιθήλιο του βλεννογόνου χιτώνα της ουροδόχου κύστης χαρακτηρίζεται ως μεταβατικό επιθήλιο, ενώ είναι γνωστό και ως ουροθήλιο. Το ουροθήλιο αποτελείται συνήθως από τρία (3) έως έξι (6) στρώματα επιθηλιακών κυττάρων. Ο αριθμός των επιμέρους στρωμάτων καθώς και το σχήμα των κυττάρων που απαρτίζουν το κάθε στρώμα βρίσκεται σε στενή συνάρτηση με το βαθμό πληρότητας της ουροδόχου κύστης. Σε διατεταμένη κύστη, το ουροθήλιο φέρει λιγότερες στιβάδες, και είναι πιο λεπτό σε σύγκριση με εκείνο μιας άδειας κύστης. Σε τελείως διατεταμένη κύστη το ουροθήλιο μπορεί να έχει πάχος δύο-τριών (2-3) κυττάρων, ενώ σε κενή

κύστη το αντίστοιχο πάχος της επιθηλιακής στιβάδας μπορεί να φθάσει μέχρι και τα δέκα (10) κυτταρικά στρώματα. Τα κυτταρικά στρώματα του μεταβατικού ουροθηλίου απαρτίζουν τρία (3) διακριτά τμήματα, που παρατίθενται πιο κάτω:

- το βασικό στρώμα (basal layer). Αποτελεί το μικρότερο σε μέγεθος τμήμα του ουροθηλίου. Τα κύτταρα που απαρτίζουν το βασικό στρώμα έχουν κυβοειδή ή ατρακτοειδή μορφή και φέρουν έναν (1) πυρήνα, ο οποίος είναι ο μικρότερος σε μέγεθος από τους πυρήνες των υπόλοιπων κυττάρων του μεταβατικού επιθηλίου.
- Το ενδιάμεσο στρώμα. Τα κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής έχουν ενδιάμεσο μέγεθος και σχήμα, ενώ αντίστοιχα είναι και τα μορφολογικά στοιχεία των πυρήνων που φέρουν τα συγκεκριμένα επιθηλιακά κύτταρα. Στο ενδιάμεσο στρώμα κάθε κύτταρο φέρει έναν (1) μόνο πυρήνα. Στα κύτταρα του ενδιαμέσου στρώματος εντοπίζεται μικρός αριθμός επιπέδων κυστιδίων (flat vesicles) που περιβάλλονται από χαρακτηριστική μεμβράνη. Η λειτουργία αυτών των κυστιδίων δεν είναι γνωστή. Έχει όμως προταθεί ότι αποτελούν μια διαθέσιμη πηγή κυτταρικής μεμβράνης, προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια της κύστης σε περίπτωση διάτασής της.
- Το επιπολής στρώμα. Αποτελείται από τα μεγαλύτερα κύτταρα του ουροθηλίου, τα οποία είναι πλακώδη, πολυγωνικά, επίπεδα και φέρουν δύο (2) ή περισσότερους πυρήνες.

Τα επιφανειακά κύτταρα του μεταβατικού επιθηλίου φέρουν μια ειδική μεμβράνη από χονδρές πλάκες που χωρίζονται μεταξύ τους από στενές ζώνες μιας λεπτότερης μεμβράνης. Αυτές οι μεμβρανικές πλάκες είναι υπεύθυνες για τον ωσμωτικό φραγμό μεταξύ ούρων και ιστικών υγρών [1, 2, 4]. Όταν η ουροδόχος κύστη συστέλλεται, η μεμβράνη πτυχώνεται κατά μήκος των λεπτότερων περιοχών, ενώ οι παχύτερες εγκολπώνονται, σχηματίζοντας ατρακτοειδή κυτταροπλασματικά κυστίδια. Τα κυστίδια αντιπροσωπεύουν ένα αποθετήριο των χονδρών μεμβρανικών πλακών, οι οποίες φυλάσσονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της κενής κύστης και επιστρατεύονται για να

καλύψουν την αυξημένη επιφάνεια που χρειάζονται τα κύτταρα, όταν η κύστη είναι πλήρης. Η μεμβράνη αυτή συναρμολογείται στη συσκευή Golgi των επιθηλιακών κυττάρων και έχει μια ασυνήθιστη χημική σύνθεση, με την κερεβροσίδη να αποτελεί την μείζονα συνιστώσα του πολικού λιπιδικού κλάσματός της.



Εικόνα 4: Τομή του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης, γνωστό και ως ουροθήλιο. Φαίνεται ξεκάθαρα ο βλεννογόνος χιτώνας και το καλυπτήριο πολύστιβο επιθήλιο (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση x50, πηγή: http://www.webpathology.com/).

Η διάταξη του μυϊκού τοιχώματος στους νεφρικούς κάλυκες, τη νεφρική πύελο και τους ουρητήρες παρουσιάζει ελικοειδές πρότυπο. Καθώς τα μυϊκά κύτταρα των ουρητήρων πλησιάζουν στην ουροδόχο κύστη, παρατηρείται μεγαλύτερη ευθυγράμμιση των μυϊκών ινών. Ακολούθως, οι ίνες που απαρτίζουν το μυϊκό τοίχωμα της ανώτερης μοίρας της ουροδόχου κύστης πορεύονται χωρίς συγκεκριμένη διάταξη προς όλες τις κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται συγκεκριμένοι χιτώνες. Το μυϊκό τοίχωμα της ουροδόχου κύστης εμφανίζει τρεις (3) διακριτούς χιτώνες κοντά στην περιοχή του αυχένα. Στους άνδρες, ο εσωτερικός επιμήκης χιτώνας, ο οποίος εντοπίζεται περιφερικά του αυχένα της κύστης, γίνεται κυκλοτερής γύρω από την προστατική ουρήθρα και το προστατικό παρέγχυμα. Στις

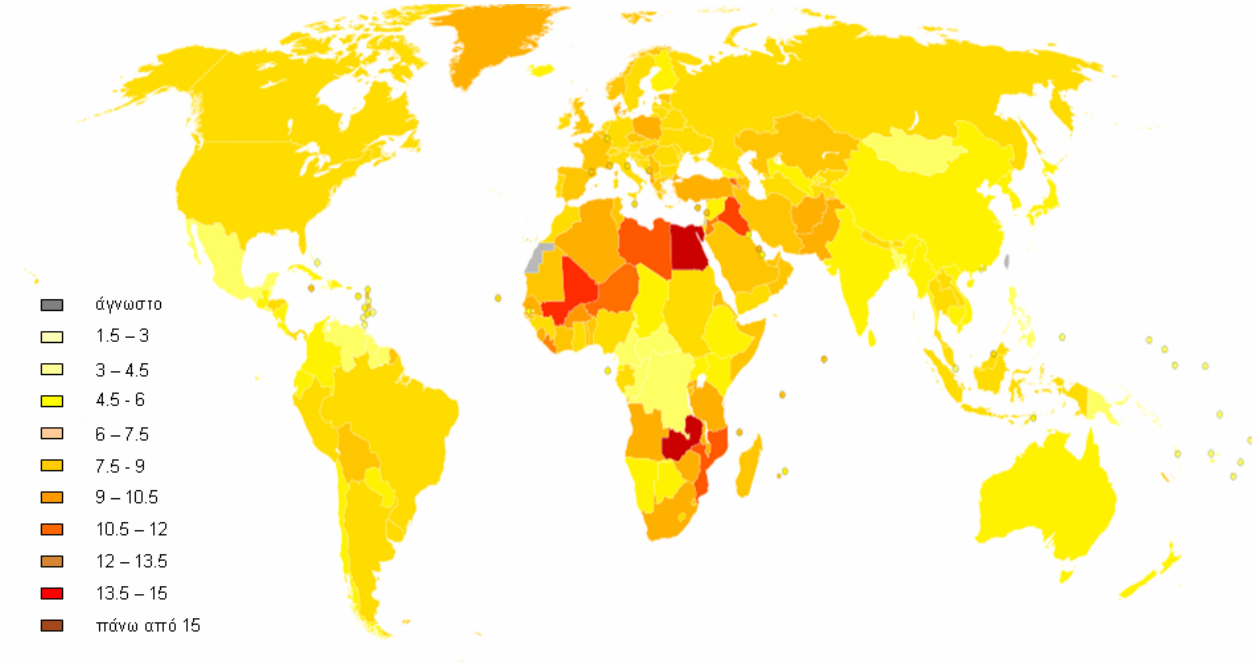
γυναίκες, ο εσωτερικός επιμήκης χιτώνας επεκτείνεται στο εξωτερικό στόμιο της ουρήθρας. Οι ίνες του εσωτερικού χιτώνα σχηματίζουν τον πραγματικό οπίσθιο σφιγκτήρα της ουρήθρας. Ο μέσος χιτώνας καταλήγει στον αυχένα της κύστης, και ο έξω επιμήκης χιτώνας συνεχίζεται μέχρι το πέρας του προστάτη στους άνδρες, και το έξω στόμιο της ουρήθρας στις γυναίκες [1, 4, 5].

1.2 Καρκίνος της ουροδόχου κύστης

1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί τη δεύτερη ($2^{η}$) σε συχνότητα κακοήθεια του ουροποιητικού συστήματος (μετά τον καρκίνο του προστάτη), αντιπροσωπεύοντας περίπου το 4% του συνόλου των κακοηθειών παγκοσμίως (6% στους άνδρες και 3% στις γυναίκες), ενώ παράλληλα ευθύνεται για περισσότερο από το 4% των θανάτων που προκαλούνται από καρκίνο, σε ετήσια βάση [8-10]. Με γνώμονα τις στατιστικές μελέτες της Παγκόσμιας Υπηρεσίας Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC, International Agency for Research on Cancer), υπολογίζονται περισσότερα από 350000 νέα περιστατικά διάγνωσης καρκίνου της ουροδόχου κύστης ετησίως, σε ολόκληρο τον κόσμο [11, 12]. Οι θάνατοι που καταγράφονται σε παγκόσμια κλίμακα και συνδέονται με κακοήθεια της κύστης ξεπερνούν τις 130000 κάθε χρόνο, ταξινομώντας τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης ως την ένατη ($9^{η}$) μορφή κακοήθειας παγκοσμίως [12]. Τα επιμέρους ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας αυξάνονται με δραματικό τρόπο στις ανεπτυγμένες κοινωνίες Δυτικού τύπου: μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες εμφανίστηκαν περίπου 70500 νέα περιστατικά κακοηθειών της ουροδόχου κύστης για το έτος 2010, εκ των οποίων τα 52760 αφορούσαν άνδρες και τα 17770 γυναίκες [12, 13], με τον αντίστοιχο αριθμό θανάτων να ξεπερνά τους 14500 (10.400 άνδρες και 4.270 γυναίκες αντίστοιχα) [11, 12, 14]. Το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου 80%) των περιπτώσεων διάγνωσης καρκίνου της ουροδόχου κύστης

πραγματοποιείται μεταξύ της ηλικίας των 60 και 80 ετών, με την μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου να αποτελούν τα 68 χρόνια [8, 12].



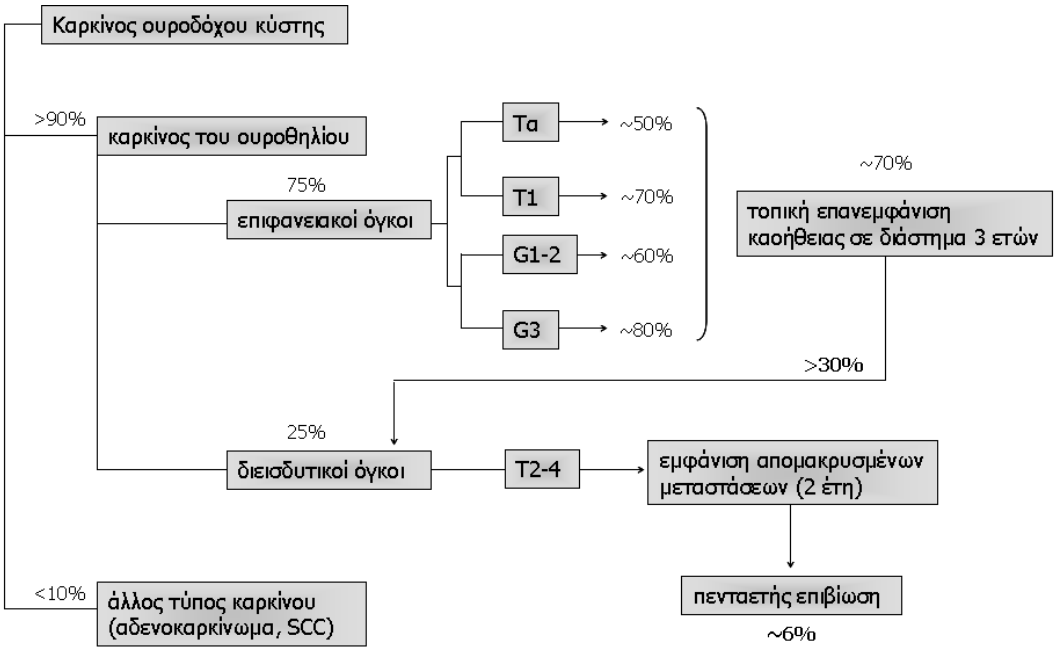
Εικόνα 5: Συχνότητα θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης, σε παγκόσμια κλίμακα (θάνατοι ανά 100000 κατοίκους). Η επιδημιολογική ανάλυση είναι βασισμένη σε στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το έτος 2004. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα υψηλά ποσοστά που εμφανίζονται στην Αφρικανική ήπειρο συνδέονται με την υψηλή συχνότητα εμφάνισης σχιστοσωμίασης, η οποία προδιαθέτει για νεοπλασίες της ουροδόχου κύστης (πηγή: http://www.who.int)

Με βάση τα στατιστικά στοιχεία σε παγκόσμια κλίμακα, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί την τέταρτη ($4^{η}$) πιο συχνή μορφή κακοήθειας στους άνδρες και την ένατη ($9^{η}$) στις γυναίκες [14-16]. Σε ότι αφορά την επιμέρους σχέση της συχνότητας εμφάνισης μεταξύ ανδρών και γυναικών, ο συγκεκριμένος λόγος προσδιορίζεται περίπου στο 3:1, με τους άνδρες να υπερτερούν, επιδεικνύοντας ωστόσο ισχυρή αυξητική τάση για τις γυναίκες [14, 15]. Παρά το γεγονός ότι οι γυναίκες έχουν λιγότερες πιθανότητες ανάπτυξης της συγκεκριμένης κακοήθειας σε σχέση με τους άνδρες, σε περίπτωση διάγνωσης της νόσου, οι γυναίκες έχουν κατά κανόνα χειρότερη πρόγνωση, ενώ τα επιμέρους ποσοστά επιβίωσης σε χρονικό ορίζοντα μιας πενταετίας από την αρχική διάγνωση, μειώνονται σημαντικά [14, 17]. Η

διαφοροποίηση της εμφάνισης κακοήθειας της ουροδόχου κύστης ανάμεσα στα άτομα διαφορετικών φύλων είχε συνδεθεί παλαιότερα με περιβαλλοντικούς και επαγγελματικούς παράγοντες, όπως είναι το κάπνισμα και η εργασία σε βιοτεχνίες και τη βαριά βιομηχανία. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της κακοήθειας και τη διαφοροποίηση των επιμέρους ποσοστών μεταξύ των δύο (2) φύλων παίζουν συγκεκριμένες ορμόνες και οι κυτταρικοί υποδοχείς τους [18]. Τα ανδρογόνα και οι υποδοχείς των ανδρογόνων πιστεύεται πως εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου και θεωρούνται υπεύθυνα για την εγγενή, αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου σε άρρενα άτομα. Επίσης, κάποιοι ενεργοποιητές του υποδοχέα των ανδρογόνων, όπως είναι η θρομβοσπονδίνη-1 και οι β-υποδοχείς των οιστρογόνων φέρεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την καρκινική εξαλλαγή της ουροδόχου κύστης [19-22]. Σε ότι αφορά τη σύνδεση της νόσου με φυλετικά χαρακτηριστικά, στατιστικά δεδομένα παγκόσμιας κλίμακας καταδεικνύουν ότι η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι διπλάσια στους εκπροσώπους της Ινδοευρωπαϊκής φυλής (λευκοί) σε σχέση με αυτούς της Αφρικανικής και Ασιατικής φυλής [12, 13, 23, 24].

Ένας σημαντικός αριθμός ασθενών (25%) με καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρουσιάζεται με έναν επιθετικό όγκο χαμηλής διαφοροποίησης, στον οποίο εντοπίζεται διήθηση της βασικής μεμβράνης και διείσδυση στους υποκείμενους ιστούς [25-27]. Οι υπόλοιποι ασθενείς εμφανίζουν κατά κανόνα επιφανειακούς, μη διεισδυτικούς όγκους υψηλής διαφοροποίησης. Παρ' όλα αυτά, ένα αρκετά υψηλό ποσοστό των ασθενών που αρχικά διαγνώστηκαν με επιφανειακούς όγκους (Εικόνα 6), ακόμα και μετά την εφαρμογή επιτυχημένων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως είναι η αφαίρεση του όγκου με μερική κυστεκτομή και η χημειοθεραπεία, τελικά αναπτύσσει διεισδυτική νόσο σε χρονικό διάστημα μικρότερο των τριών (3) ετών [9, 25, 26, 28, 29]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, ένα μεγάλο ποσοστό επιφανειακών, μη διεισδυτικών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης (~70%) επανεμφανίζονται τοπικά, σε χρονικό διάστημα μικρότερο των τριών (3) ετών [9, 27, 30-32]. Από τους ασθενείς που θα εμφανίσουν κακοήθεια της ουροδόχου κύστης,

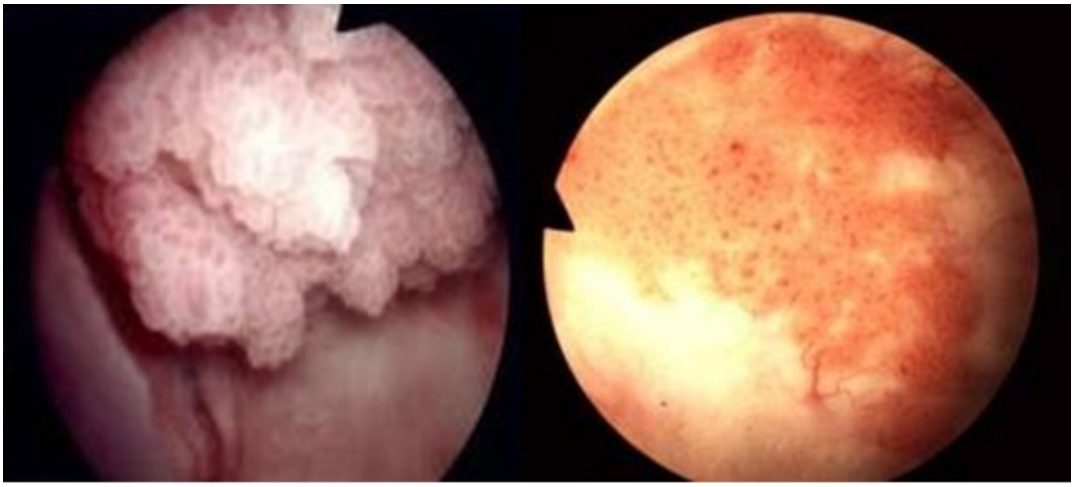
μετά την αντιμετώπιση του αρχικού όγκου, ένα σημαντικό ποσοστό (~30%) θα παρουσιάσει διεισδυτική νόσο, με την ανάπτυξη όγκων που διηθούν παρακείμενους ιστούς και εμφανίζουν αυξημένη επιθετικότητα. Σε χρονικό διάστημα μικρότερο από δύο (2) χρόνια, ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ασθενών που παρουσίασαν όγκους με διήθηση των παρακείμενων ιστών, θα εμφανίσει απομακρυσμένες μεταστάσεις [29, 32, 33].



Εικόνα 6: Τύποι καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης και τα επιμέρους ποσοστά εμφάνισής τους. Επίσης, παρουσιάζονται τα ποσοστά επανεμφάνισης εξαλλαγής ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας των αρχικών όγκων, καθώς και η επιβίωση σε χρονικό διάστημα πέντε ετών από την εμφάνιση διεισδυτικής ασθένειας.

Σε περίπτωση ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστατικών εστιών, η πρόγνωση είναι ιδιαίτερα χαμηλή, καθώς η πενταετής επιβίωση δεν ξεπερνά το 6% των ασθενών στους οποίους πραγματοποιήθηκε η αρχική διάγνωση διεισδυτικών όγκων [34-36]. Είναι λοιπόν προφανής η ανάγκη για την σε βάθος μελέτη και αξιολόγηση των υπαρχόντων αλλά και νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, τον εντοπισμό και την αξιολόγηση νέων κυτταρικών και υπο-κυτταρικών στόχων για τη θεραπεία, καθώς και την ανάπτυξη νέων σχημάτων χημειοθεραπείας που ενδεχομένως θα συνδυάζουν συμβατικούς με στοχεύοντες παράγοντες για την εξατομίκευση της θεραπείας,

σε συνδυασμό με την ανάπτυξη και αξιολόγηση υπαρχόντων και νέων καρκινικών δεικτών για την αποσαφήνιση του πρωτεωμικού και γονιδιωματικού προφίλ κάθε όγκου.



Εικόνα 7: Τύποι καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης. Αριστερά, τυπική κλινική εικόνα θηλώδους καρκίνου της κύστης με εμφανείς προεκβολές συστάδων καρκινικών κυττάρων προς το εσωτερικό της κύστης. Το τοίχωμα της κύστης εντοπίζεται δεξιά και κάτω στην εικόνα. Δεξιά, επιφανειακό καρκίνωμα *in situ* (CIS) ουροδόχου κύστης. Είναι εμφανείς οι περιοχές εξαλλαγής του μεταβατικού επιθηλίου. Οι εικόνες προέρχονται από λαπαροσκοπική κυστεοσκόπηση ασθενών στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί διάγνωση κακοήθειας της ουροδόχου κύστης (πηγή: http://emedicine.medscape.com).

1.2.2 Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου που είναι στενά συνυφασμένοι με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης καλύπτουν μια πλειάδα ετερόλογων συντελεστών, όπως είναι οι συνθήκες εργασίας, οι επικίνδυνες χημικές ενώσεις, οι καθημερινές συνήθειες, το γενετικό υπόβαθρο κ.λπ. [37-41]. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινική εξαλλαγή της ουροδόχου κύστης παρουσιάζονται και αναλύονται παρακάτω:

- Επαγγελματικοί παράγοντες. Από το 1895 έχει ανιχνευθεί συσχέτιση ανάμεσα στην εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης και την έκθεση σε χημικούς παράγοντες που αποτελούν συστατικά των βαφών ανιλίνης [42-44]. Υπολογίζεται ότι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της έκθεσης και της κλινικής εκδήλωσης

συμπτωμάτων καρκίνου της ουροδόχου κύστης κυμαίνεται μεταξύ δεκαπέντε (15) και σαράντα (40) ετών [42-44]. Ομάδες υψηλού κινδύνου θεωρούνται οι εργαζόμενοι σε βιομηχανίες παραγωγής αρωματικών αμινών (π.χ. β-ναφθυλαμίνη, βενζιδίνη και φαινακετίνη), χρωμάτων, ελαστικών, ηλεκτρικών συσκευών, οι βαφείς υφασμάτων και οι εργαζόμενοι που έρχονται σε επαφή με βιομηχανικά αέρια και πετρελαιοειδή [42-44]. Οι αρωματικές αμίνες, καθώς και τα υδροξυλιωμένα μεταβολικά προϊόντα τους (στη θέση όρθο-) φέρεται να έχουν καρκινογενετική επίδραση στο μεταβατικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστης. Οι πηγές των αρωματικών αμινών στις οποίες δύναται να εκτεθεί ένας οργανισμός είναι είτε εξωγενείς (π.χ. χρωστικές ανιλίνης, φαινακετίνη κ.λπ.), είτε ενδογενείς (π.χ. μεταβολικά προϊόντα του αμινοξέος τρυπτοφάνη) [42-46]. Οι χρωστικές ανιλίνης και οι αρωματικές αμίνες συνδέονται μη-αντιστρεπτά με τα δίκλωνα μόρια του DNA, μειώνοντας την ενδογενή δυνατότητα των κυττάρων για αναδιπλασιασμό και επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, οδηγώντας εν τέλει σε αυξημένη γενετική αστάθεια [44-46]. Τέλος, στατιστικές επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι κάτοικοι των σύγχρονων αστικών κέντρων παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου ουροδόχου κύστης σε σχέση με τους μόνιμους κατοίκους αγροτικών περιοχών [43, 47, 48].

- Κάπνισμα. Το κάπνισμα θεωρείται ο πιο σημαντικός μη επαγγελματικός προδιαθεσικός παράγοντας ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης [49, 50]. Στατιστικές επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν πως η εμφάνιση νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης είναι περίπου τέσσερις (4) φορές πιο συχνή σε καπνιστές, σε σχέση με τους μη καπνίζοντες [50]. Έχει παρατηρηθεί πως άτομα τα οποία υπήρξαν καπνιστές στο παρελθόν αλλά διέκοψαν το κάπνισμα, παρουσιάζουν μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου σε σχέση με μόνιμους καπνιστές. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ευθέως ανάλογη σχέση μεταξύ του καπνίσματος και του βαθμού

κακοήθειας, της σταδιοποίησης, του αριθμού και του μεγέθους των όγκων της ουροδόχου κύστης κατά την κλινική διάγνωση των ασθενών [49-51]. Το κάπνισμα εμπλέκεται αιτιοπαθογενετικά στην ανάπτυξη κακοήθειας του μεταβατικού επιθηλίου της κύστης εξαιτίας των πολυάριθμων, τοξικών χημικών ενώσεων που παράγονται κατά την καύση του καπνού. Μια από τις χημικές ενώσεις που ενοχοποιείται για την ανάπτυξη νεοπλασμάτων αποτελεί η β-ναφθυλαμίνη, η οποία αποβάλλεται από τον οργανισμό με τα ούρα, καθώς και άλλες αρωματικές αμίνες όπως το 4-αμινοδιφαινύλιο, η βενζιδίνη, το 4-νιτροδιφαινύλιο και η ο-τολουϊδίνη [49-51]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι στα ούρα των καπνιστών αποβάλλονται καρκινογόνοι ορθο-αμινοφαινολικοί μεταβολίτες τρυπτοφάνης, γεγονός που έμμεσα υποδηλώνει, μεταξύ άλλων, την έλλειψη βιταμίνης Β6 (πυριδοξίνη). Η πυριδοξίνη θεωρείται πως συνεισφέρει στην μετατροπή των τοξικών φαινολικών μεταβολιτών της τρυπτοφάνης σε αβλαβές νικοτινικό οξύ, διορθώνοντας τις πιθανές ανωμαλίες στον μεταβολισμό του συγκεκριμένου αμινοξέος. Επιστημονικές μελέτες συνδέουν το κάπνισμα με μείωση των επιπέδων της πυριδοξίνης στην κυκλοφορία, καθώς προκαλείται ισχυρή ελάττωση της βιολογικής της ενεργότητας [52]. Επίσης, ακόρεστες α- και β-αλδεΰδες (π.χ. η ακρολεΐνη), που παράγονται με το κάπνισμα, έχουν συνδεθεί με την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής [49]. Παράλληλα, έχουν διαπιστωθεί στους καπνιστές γενετικές διαταραχές ορισμένων εξειδικευμένων ενζυμικών συστημάτων αποτοξίνωσης των βλαβερών συστατικών του καπνού (όπως το αμινοδιφαινύλιο, aminobiphenyl, ABP). Οι διαταραχές αυτές αφορούν μετατροπές στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης Μ1, *GSTM1* και του γενετικούς τόπους των Ν-ακετυλο-τρανσφερασών, *NAT1* και *NAT2*. Ελλείψεις, μεταλλαγές καθώς και πολυμορφισμοί των συγκεκριμένων γενετικών τόπων

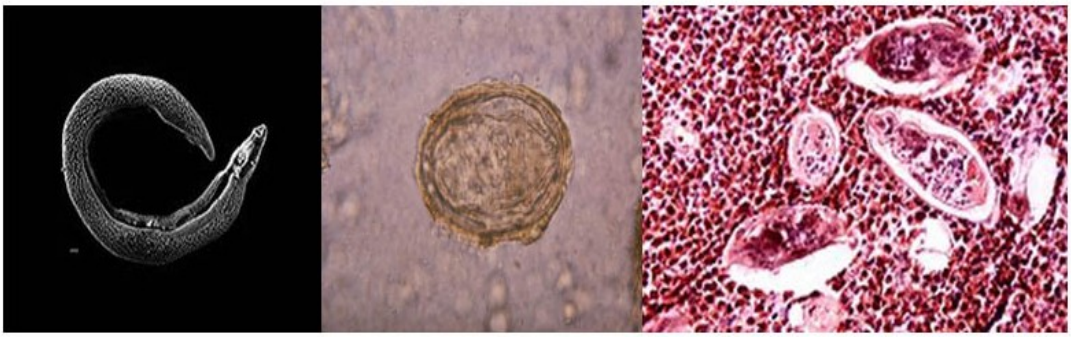
συνδέονται με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης σε άνδρες και γυναίκες [49, 53].

- Φαρμακευτικά σκευάσματα. Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει πως άτομα τα οποία λαμβάνουν αναλγητικά τύπου φαινακετίνης παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του ουροθηλίου [54]. Η φαινακετίνη αποτελεί παράγωγο της ανιλίνης και η καρκινογόνος δράση της οφείλεται στους ορθο-υδροξυ-άμινο μεταβολίτες της (π.χ. η χημική ένωση 2-υδροξυ-φαινακετιδίνη). Η φαινακετίνη και τα παράγωγα του μεταβολισμού της δημιουργούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA (single strand DNA breaks), επιδεικνύοντας ισχυρή γενοτοξική δράση [55]. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων αναλγητικών που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε φαινακετίνη οδηγούν σε τετραπλασιασμό των πιθανοτήτων ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης [54, 55]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς που λαμβάνουν υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης (μεταβολίζεται στην καρκινογόνο χημική ένωση ακρολεΐνη) διατρέχουν εννέα (9) φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [55]. Επίσης, ως παράγοντες κινδύνου έχουν ενοχοποιηθεί και διάφορες χημειοθεραπευτικές ενώσεις, όπως η βινκριστίνη, η προκαρβαζίνη, η χλωραμβουκίλη και ο αζωθυπερίτης [56].
- Σχιστοσωμίαση. Τα μέλη του παρασιτικού γένους πλατυελμίνθων *Schistosoma* (φύλο *Platyhelminthes*, τάξη *Trematoda*) προκαλούν μια ασθένεια που προσβάλλει τους ανώτερους οργανισμούς, γνωστή ως σχιστοσωμίαση. Με βάση τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η σχιστοσωμίαση αποτελεί τη δεύτερη ($2^{η}$) σε συχνότητα παρασιτική ασθένεια (μετά την ελονοσία), καθώς προσβάλλει εκατομμύρια ασθενείς σε παγκόσμια κλίμακα [57, 58]. Το γένος *Schistosoma* περιλαμβάνει εικοσιένα (21) παρασιτικά είδη, τα οποία προσβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία της κατώτερης μοίρας του γαστρεντερικού συστήματος, την ουροδόχο

κύστη, το δέρμα και το νευρικό σύστημα [59]. Στην περίπτωση της ουροδόχου κύστης, ενοχοποιείται το είδος *Schistosoma haematobium*, το οποίο εναποθέτει τα αυγά του κάτω από τη βλεννογόνο στιβάδα, προκαλώντας χρόνια αδενική κυστίτιδα, απόπτωση των κυττάρων του μεταβατικού επιθηλίου και επαγωγή κακοήθειας της κύστης (Εικόνα 8). Συχνά κλινικά συμπτώματα τα οποία παρατηρούνται σε ασθενείς που πάσχουν από σχιστοσωμίαση είναι η ίνωση του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης και η παρουσία ποσοτήτων αίματος στα παραγόμενα ούρα (αιματουρία). Έχει διαπιστωθεί ότι πάνω από το δέκα τοις εκατό (10%) των ασθενών με σχιστοσωμίαση, πάσχουν τελικά από καρκίνο της κύστης [57-59]. Με βάση πρόσφατες επιδημιολογικές στατιστικές μελέτες σε χώρες της Αφρικανικής ηπείρου, όπου η σχιστοσωμίαση ενδημεί, υπολογίζεται ότι ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης καταλαμβάνει σημαντικό ποσοστό (ξεπερνά το 30%) μεταξύ όλων των τύπων καρκίνου που ταυτοποιούνται ετησίως και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα σαράντα πέντε (45) έτη [57-59].

- Χρόνιος ερεθισμός και φλεγμονή της κύστης. Η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος με βακτήρια που παράγουν νιτροσαμίνες είναι στενά συνδεδεμένη με την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης [40, 41]. Στα βακτήρια αυτά, τα νιτρικά άλατα και οι δευτεροταγείς αμίνες μεταβολίζονται προς τις καρκινογόνες νιτροσαμίνες, με μια σειρά χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από το ένζυμο αναγωγάση των νιτρικών. Η χρόνια φλεγμονή, ο μηχανικός τραυματισμός της κύστης και η φλεγμονώδης λιθίαση αυξάνουν την πιθανότητα πλακώδους ή αδενικής μεταπλασίας, προδιαθέτοντας σε ανάπτυξη κακοήθειας της ουροδόχου κύστης. Επιπλέον, η επίδραση ακτινοβολίας στην περιοχή της πυέλου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης [40, 41]. Για παράδειγμα, γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση διάφορων νεοπλασιών γυναικολογικών οργάνων παρουσίασαν

αύξηση των ποσοστών εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης κατά τέσσερα τοις εκατό (4%) [60]. Επίσης, σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί αρκετοί RNA- και DNA-ιοί (π.χ. στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, human papilloma virus, HPV), χωρίς όμως ακόμα να έχει διαπιστωθεί κάποια αιτιοπαθογενετική σχέση.



Εικόνα 8: Αριστερά, τρηματώδης του γένους *Schistosoma* σε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (πηγή: http://www.bio.davidson.edu/). Στο μέσο απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό αυγό των παρασίτων του συγκεκριμένου γένους (πηγή: http://phil.cdc.gov/phil/home.asp). Δεξιά, μικροσκοπική παρατήρηση τοιχώματος ουροδόχου κύστης ασθενούς που έχει προσβληθεί από *Schistosoma haematobium*. Φαίνονται ξεκάθαρα τα εναποθετημένα αυγά του παρασίτου, καθώς και η διήθηση του περιβάλλοντος ιστού από κύτταρα της ανοσολογικής απόκρισης (χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης-εωσίνης, μεγέθυνση x40, πηγή: http://www.wrongdiagnosis.com).

- Ανεπάρκεια βιταμινών. Έχει αποδειχθεί ότι άτομα που καταναλώνουν χαμηλές ποσότητες βιταμίνης Α ή β-καροτένιου παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης. Πειραματικές δοκιμασίες που διεξήχθησαν σε ζωικά μοντέλα (ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς SCID) απέδειξαν ότι η χορήγηση βιταμίνης Α και Β6 (πυριδοξίνη) αποτρέπουν την ανάπτυξη καρκίνου της κύστης που προκαλείται από χημικά καρκινογόνα [61-66].
- Γλυκαντικές ουσίες, καφές. Η υπερκατανάλωση γλυκαντικών ουσιών (π.χ. κυκλαμίνη), ενδέχεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης, αλλά μέχρι σήμερα η συσχέτιση αυτή δεν έχει τεκμηριωθεί πειραματικά, παρά μόνο σε

δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντικούς [67-69]. Επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπους δεν κατέληξαν σε ασφαλές συμπέρασμα που να συσχετίζει την κατανάλωση γλυκαντικών ουσιών με την ανάπτυξη κακοήθειας στην ουροδόχο κύστη [70]. Επίσης, επιδημιολογικές μελέτες ενοχοποιούν την υπερκατανάλωση καφεΐνης ως προδιαθεσικό παράγοντα ανάπτυξης καρκίνου της κύστης, σε συνδυασμό με άλλους καρκινογόνους παράγοντες [69].

- Χλωρίωση. Η κατανάλωση πόσιμου ύδατος που περιέχει υψηλές ποσότητες χλωρίου, καθώς και παραπροϊόντα χλωρίωσης, φαίνεται πως εμπλέκεται στην αύξηση των πιθανοτήτων ανάπτυξης κακοηθειών της ουροδόχου κύστης [71].
- Υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλοειδών. Έχει δειχθεί πειραματικά πως υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού (As) σε πόσιμο νερό σχετίζονται με την προώθηση της καρκινογένεσης σε κύτταρα του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης [72]. Σε χώρες όπως η Αργεντινή, η Χιλή, το Μπανγκλαντές και η Ταϊβάν, όπου καταγράφονται υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού στο πόσιμο νερό, εμφανίζονται υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης στον πληθυσμό [72]. Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού έχει συνδεθεί με την μεθυλίωση του υποκινητή του γενετικού τόπου *RASSF1A*, καθώς και με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και ελλείψεις, κυρίως αυτές που αφορούν τον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p) [72-74].

1.2.3 Διαβάθμιση κακόηθων νεοπλασμάτων (Grading)

Ο όρος διαβάθμιση (grading) νεοπλάσματος αναφέρεται στο βαθμό της ιστολογικής επιθετικότητας των εξαλλαγμένων κυττάρων που αποτελούν έναν όγκο. Η διαφορική κατηγοριοποίηση των καρκινικών κυττάρων με βάση συγκεκριμένα κριτήρια όπως είναι η πυρηνική ατυπία, η συχνότητα εμφάνισης μιτωτικών ατράκτων και ο αριθμός των στιβάδων του όγκου, οδήγησαν στη

δημιουργία εξειδικευμένων συστημάτων βαθμολόγησης των όγκων για κάθε όργανο, με συγκεκριμένα εκάστοτε κριτήρια. Για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης υπάρχουν τέσσερις (4) βαθμοί κακοήθειας (grade 1-4) [75]:

- ✓ **Grade 1** (υψηλά διαφοροποιημένο νεόπλασμα)
- ✓ **Grade 2** (μέτρια διαφοροποιημένο νεόπλασμα)
- ✓ **Grade 3** (χαμηλά διαφοροποιημένο νεόπλασμα)
- ✓ **Grade 4** (αδιαφοροποίητο νεόπλασμα).

1.2.4 Σταδιοποίηση κακόηθων νεοπλασμάτων (Staging)

Η πλειονότητα (~90%) των κακοηθειών της ουροδόχου κύστης εντοπίζονται στο μεταβατικό επιθήλιο (TCC: transitional cell carcinoma, or urothelial carcinoma), ενώ τα υπόλοιπα περιστατικά (~10%) ανιχνεύονται κύρια ως καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου (SCC: squamous cell carcinoma), καθώς και ως αδενοκαρκινώματα [12, 13]. Η σταδιοποίηση του καρκίνου αποτελεί μια διαδικασία συλλογής πληροφοριών από εξετάσεις και διαγνωστικά τεστ ώστε να εξακριβωθεί το μέγεθος και η διασπορά της καρκινικής εξαλλαγής σε παρακείμενους ιστούς. Επίσης, η σταδιοποίηση του καρκίνου είναι πολύ σημαντική σε ότι αφορά το είδος της θεραπευτικής αντιμετώπισης που θα πραγματοποιηθεί, καθώς και για την πρόγνωση του ασθενούς. Τα ευρήματα των χειρουργικών επεμβατικών μεθόδων καθώς και οι βιοψίες της ουροδόχου κύστης αξιολογούνται ώστε να διαπιστωθεί ο τύπος της εξαλλαγής, το μέγεθος του όγκου, η επιθετικότητα και ο βαθμός διήθησης των παρακείμενων ιστών. Η σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αποτελεί έναν αξιόπιστο τρόπο περιγραφής της έκτασης της κακοήθειας, ενώ το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική διάγνωση είναι εκείνο της Αμερικανικής Κοινής Επιτροπής για τον Καρκίνο, των Η.Π.Α. (American Joint Committee on Cancer, AJCC), το οποίο ονομάζεται και σύστημα TNM [76]. Το στάδιο του καρκίνου της ουροδόχου κύστης καθορίζεται με βάση τα αποτελέσματα των ιατρικών και εργαστηριακών

εξετάσεων, τις βιοψίες και τη χειρουργική αφαίρεση τμημάτων του όγκου με τη βοήθεια του κυτταροσκοπίου.

Το σύστημα TNM (AJCC, έκδοση 2010) κατηγοριοποιεί τους όγκους της ουροδόχου κύστης με βάση τα επιμέρους στάδια T (Tumor, όγκος), N (Node, λεμφαδένας) και M (Metastasis, μετάσταση):

- Το γράμμα T ακολουθείται από έναν αριθμό που φέρει τιμές από το ένα (1) έως το τέσσερα (4) και περιγράφει τη διείσδυση του όγκου στο τοίχωμα της κύστης, καθώς και στους παρακείμενους ιστούς. Υψηλότεροι αριθμοί T αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη εξάπλωση του όγκου.
- Το γράμμα N ακολουθείται από έναν αριθμό που φέρει τιμές από το ένα (1) έως και το τρία (3) και αντιπροσωπεύει την εξάπλωση της κακοήθειας σε γειτονικούς λεμφαδένες.
- Το γράμμα M συνοδεύεται από έναν αριθμό που φέρει τις τιμές μηδέν (0) και ένα (1) και περιγράφει την ανίχνευση μεταστάσεων του όγκου σε απομακρυσμένα όργανα και λεμφαδένες.

Παρακάτω παρατίθεται η επιμέρους σταδιοποίηση των κακοηθειών της ουροδόχου κύστης με βάση την επιμέρους κατηγορία T (Εικόνα 9):

- **Ta** – Θηλώδες καρκίνωμα που δεν εμφανίζει διήθηση της βασικής μεμβράνης, με ταυτόχρονες προεκβολές καρκινικών συστάδων προς το εσωτερικό της κύστης.
- **Tis** – Θηλώδες καρκίνωμα *in situ* (Cancer *in situ*, CIS), μη διηθητικό, επίπεδο καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου.
- **T1** – Καρκίνωμα το οποίο έχει εξαπλωθεί κατά μήκος του βλεννογόνου χιτώνα αλλά δεν εμφανίζει διήθηση της μυϊκής στιβάδας της ουροδόχου κύστης. Συναντώνται δύο (2) υποκατηγορίες:
  - **T1a** – Η διείσδυση φτάνει ως την υποβλεννογόνια στιβάδα.
  - **T1b** – Η διείσδυση ξεπερνά την υποβλεννογόνια στιβάδα.
- **T2** – Παρατηρείται διήθηση του μυϊκού χιτώνα. Επίσης, συναντώνται δύο (2) υποκατηγορίες:

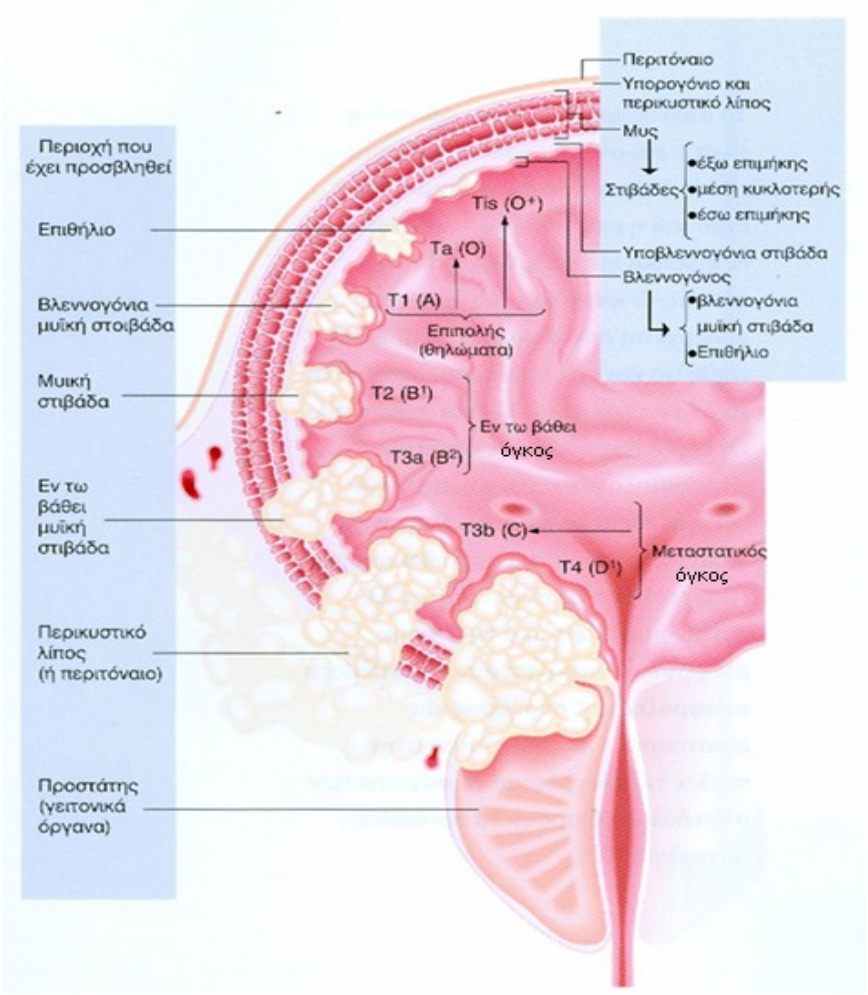
- **T2a** – Επιφανειακή διήθηση του μυϊκού χιτώνα.
- **T2b** – Εν τω βάθει διήθηση του μυϊκού χιτώνα.

- **T3** – Ο όγκος έχει ξεπεράσει τα τοιχώματα της ουροδόχου κύστης και πλέον εντοπίζεται και στο περικυστικό λίπος. Εντοπίζονται και εδώ δύο (2) επιμέρους κατηγορίες:
  - **T3a** – Η διήθηση είναι ορατή μόνο μικροσκοπικά.
  - **T3b** – Η διήθηση είναι ορατή μακροσκοπικά, καθώς μπορεί να εντοπιστεί η κακοήθης μάζα είτε με μεθόδους απεικόνισης, είτε με ψηλάφιση από τον κλινικό ιατρό.
- **T4** – Ο όγκος έχει επεκταθεί πέραν της ουροδόχου κύστης και παρατηρείται εκτεταμένη διήθηση παρακείμενων οργάνων και δομών. Υπάρχουν δύο (2) επιμέρους κατηγορίες:
  - **T4a** – Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο βασικό στρώμα του προστάτη, της μήτρας ή του κόλπου.
  - **T4b** – Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο τοίχωμα της πυέλου ή της κοιλιακής χώρας.

Τα επιμέρους στάδια του καρκίνου της ουροδόχου κύστης που αφορούν την κατηγορία Ν αναφέρονται σε τύπους καρκινωμάτων που εμφανίζουν διήθηση ή μη γειτονικών λεμφαδένων, οι οποίοι εντοπίζονται εντός της λεκάνης. Επομένως, ο αριθμός που αντιστοιχεί στην κατηγορία Ν αφορά μόνο λεμφαδένες που βρίσκονται περιφερειακά της ουροδόχου κύστης και όχι απομακρυσμένα λεμφικά όργανα. Η κατηγοριοποίηση που ακολουθείται είναι η εξής:

- **NX** – Είναι αδύνατη η διάγνωση διηθήσεων των περιφερειακών λεμφαδένων λόγω έλλειψης ενδείξεων.
- **N0** – Δεν παρατηρείται επέκταση της κακοήθειας σε γειτονικούς λεμφαδένες.
- **N1** – Διήθηση ενός (1) παρακείμενου λεμφαδένα στην περιοχή της πυέλου.
- **N2** – Διήθηση δύο (2) ή περισσότερων παρακείμενων λεμφαδένων εντός της πυέλου.

- **N3** – Διήθηση παρακείμενων λεμφαδένων, καθώς και επέκταση της κακοήθειας σε λεμφικά όργανα που εντοπίζονται περιφερειακά της λαγόνιας αρτηρίας.



Εικόνα 9: Σταδιοποίηση (κατηγορία Τ) κακοήθων νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης. Απεικονίζονται οι στιβάδες της ουροδόχου κύστης, καθώς και η σταδιοποίηση των κακοηθειών με βάση την περιοχή που έχει προσβληθεί, το βαθμό διείσδυσης του όγκου και τις μεταστάσεις σε γειτονικά όργανα (πηγή: http://www.e-urology.gr/).

Τέλος, πραγματοποιείται επιμέρους διαφοροποίηση των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης με βάση την κατηγορία Μ, η οποία παρατίθεται παρακάτω:

- **M0** – Δεν εντοπίζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις.
- **M1** – Παρατηρούνται απομακρυσμένες μεταστάσεις σε λεμφικούς αδένες, όργανα και ιστούς (π.χ. πνεύμονες, οστά, ήπαρ, κ.λπ.).

Όταν ο κλινικός γιατρός καθορίσει τις επιμέρους τιμές με βάση το σύστημα σταδιοποίησης TNM, ακολουθεί μια διαδικασία που αφορά την ενοποίηση των αποτελεσμάτων και την κατηγοριοποίηση της κακοήθειας σε ευρύτερο πλαίσιο. Το ισχύον σύστημα κατηγοριοποίησης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αναγνωρίζει πέντε (5) διακριτά στάδια κακοήθειας, βασισμένα τόσο στο βαθμό επιθετικότητας όσο και στο επίπεδο διαφοροποίησης των προσβεβλημένων κυττάρων του γειτονικού ιστού, ως ακολούθως:

- Στάδιο **0**. Μη διηθητικός όγκος, που περιορίζεται στην επιθηλιακή στιβάδα της ουροδόχου κύστης. Τα επιμέρους στάδια που παρατηρούνται είναι τα κάτωθι:
  - Στάδιο **0a**: **Ta, N0, M0**. Πρόκειται για μη διεισδυτικά θηλώματα της επιφάνειας του ουροθηλίου τα οποία επεκτείνονται προς το εσωτερικό της κοιλότητας της κύστης. Παρατηρείται επέκτασή τους στη βλεννογόνο στιβάδα, ωστόσο δεν εντοπίζεται διήθηση των μυϊκών στιβάδων του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης. Δεν παρατηρείται επέκταση του όγκου σε παρακείμενους λεμφαδένες ούτε και απομακρυσμένες μεταστάσεις.
  - Στάδιο **0is**: **Tis, N0, M0**. Πρόκειται για επίπεδα, μη διεισδυτικά καρκινώματα του ουροθηλίου γνωστά και ως καρκινώματα *in situ*. Δεν παρατηρείται διήθηση των μυϊκών στιβάδων του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης, ούτε και επέκταση του όγκου σε παρακείμενους λεμφαδένες και απομακρυσμένες μεταστάσεις.
- Στάδιο **I**: **T1, N0, M0**. Επέκταση του όγκου σε όλη την επιφάνεια του μεταβατικού επιθηλίου και της υποβλεννογόνιας στιβάδας, χωρίς όμως να παρατηρείται διείσδυση της μυϊκής στιβάδας. Δεν εντοπίζονται διηθήσεις παρακείμενων λεμφαδένων ούτε και απομακρυσμένες μεταστάσεις.
- Στάδιο **II**: **T2, N0, M0**. Επέκταση του όγκου στην μυϊκή στιβάδα, χωρίς ωστόσο να ξεπερνά τα όρια του μυϊκού τοιχώματος της

κύστης. Δεν εντοπίζεται διήθηση του παρακείμενου λιπώδους ιστού. Επίσης, δεν ανιχνεύονται μακρινές μεταστατικές εστίες, ούτε και διήθηση λεμφαδένων.

- Στάδιο **III**: **T3, N0, M0** ή **T4a, N0, M0**. Επέκταση του όγκου πέρα της μυϊκής στιβάδας και διήθηση του παρακείμενου λιπώδους ιστού (T3) ή οργάνων και ιστών (προστάτης, μήτρα, κόλπος) που περιβάλλουν την ουροδόχο κύστη (T4a). Δεν παρατηρείται διήθηση λεμφαδένων ούτε και μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα.
- Στάδιο **IV**. Γενικευμένη επέκταση του όγκου. Οι επιμέρους κατηγορίες του συγκεκριμένου σταδίου είναι οι παρακάτω:
  - Στάδιο **IV**: **T4b, N0, M0**. Εντοπίζεται ολική διείσδυση του όγκου στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης και εμφανίζεται διήθηση των τοιχωμάτων της πυέλου και της κοιλιακής χώρας. Δεν εντοπίζεται διήθηση παρακείμενων λεμφαδένων ούτε και απομακρυσμένες μεταστάσεις.
  - Στάδιο **IV**: **T0-4, N1-3, M0**. Παρατηρείται επέκταση της κακοήθειας σε παρακείμενα λεμφικά όργανα (N1-3). Δεν εντοπίζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις.
  - Στάδιο **IV**: **T0-4, N1-3, M1**. Εντοπίζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις σε όργανα και ιστούς (M1), όπως είναι τα οστά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, κ.λπ.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι παρά την εξαιρετικά υψηλή σημασία της κατηγοριοποίησης και της σταδιοποίησης των νεοπλασμάτων του ουροθηλίου στην πρόγνωση και την επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, ιδιαίτερη κλινική αξία παρουσιάζει και το μοριακό προφίλ του εκάστοτε όγκου [77]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν όγκοι που κατατάσσονται στο στάδιο 0 (Ta και Tis), οι οποίοι αν και δεν εμφανίζουν φαινοτυπική εξάπλωση σε υποκείμενους ιστούς και απομακρυσμένες μεταστάσεις, θεωρούνται νεοπλάσματα υψηλού κινδύνου, καθώς παρά το γεγονός ότι βρίσκονται σε αρχικό στάδιο τη στιγμή της διάγνωσης, εμφανίζουν συχνά κακή πρόγνωση [78]. Η εξέλιξη και προώθηση της

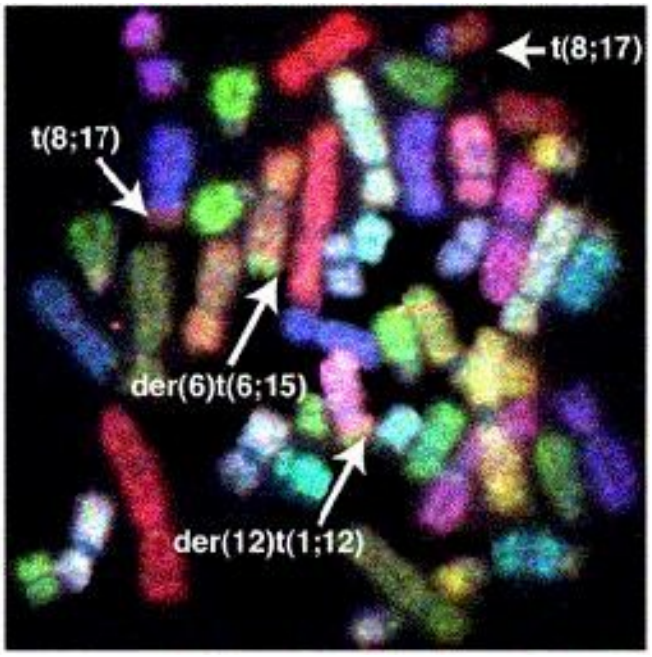
επιθετικότητας των συγκεκριμένων κακοηθειών πραγματοποιείται λόγω της ύπαρξης συγκεκριμένων, σημαντικών αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό των εξαλλαγμένων κυττάρων, που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ισχυρών ογκογονικών σηματοδοτικών μονοπατιών, προωθώντας την εξέλιξη της ογκογένεσης και την επανεμφάνιση επιθετικών νεοπλασμάτων (βλέπε Κεφάλαιο 1.2.5) [78-80].

1.2.5 Γενετική προσέγγιση

Η εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης στον άνθρωπο φαίνεται να συσχετίζεται με την ύπαρξη τόσο δομικών αλλαγών (ελλείψεων) στο χρωμόσωμα 9 (για το 50–70% των περιστατικών), όσο και μεταλλαγών σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, χαρακτηριστικότεροι των οποίων είναι οι *HRAS*, *KRAS2*, *TP53*, *FGFR3*, *Rb1* και *TSC1* [79-82]. Οι ελλείψεις στις χρωμοσωμικές περιοχές 9p21 και 9q32-33 περιέχουν, μεταξύ άλλων, τα γονίδια *CDKN2A* (*p16*^{INK4}) και *DBCCR1* αντιστοίχως, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων καταστέλλουν την ανάπτυξη κακοήθειας (ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες) σε πληθώρα διαφορετικών ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης [83-86]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη του πρωτο-ογκογονιδίου *HRAS* (Harvey RAS) αποκαλύφθηκε δια μέσου της δυνατότητας μετασχηματισμού NIH-3T3 κυττάρων μετά από διαμόλυνση αυτών με γονιδιωματικά θραύσματα της καρκινικής κυτταρικής σειράς της ουροδόχου κύστης EJ, και εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11p15.5) [86].

Η πλειονότητα των γενετικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης δε φαίνεται να υπόκεινται σε κληρονομικό έλεγχο από γονείς σε απογόνους, αλλά αποκτώνται σποραδικά (*de novo* σωματικές μεταλλαγές) κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου, με βάση κυρίως τις διατροφικές, εργασιακές και πολιτισμικές του επιλογές και συνήθειες [87]. Παρόλα αυτά, κάποια άτομα εμφανίζονται να κληρονομούν μια ιδιαίτερα ελαττωμένη ικανότητα αποικοδόμησης συγκεκριμένων κυτταροτοξικών ουσιών, η οποία τους καθιστά περισσότερο ευάλωτους στις

καρκινογενετικές δράσεις των ενεργών συστατικών τόσο του καπνού όσο και των βιομηχανικών χημικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, πλήθος μελετών συσχετίζουν το κάπνισμα ως κύριο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης, με τη δομική ακεραιότητα και λειτουργική ικανότητα διακριτών γενετικών τόπων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι *NAT1*, *NAT2* και *GSTM1* [49, 87-90].



Εικόνα 10: Καρυότυπος RT4 καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης με εμφανείς χρωμοσωμικές μεταλλαγές (ελλείψεις και μετατοπίσεις), υπεύθυνες για την ανάπτυξη καρκινικού φαινοτύπου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική φασματοσκοπικής καρυοτύπησης (Spectral karyotyping, τεχνική SKY) [91].

Οι κλινικοί παθολογοανατόμοι έχουν ταυτοποιήσει δύο (2) τύπους μη διεισδυτικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης [85]. Τα θηλώδη καρκινώματα, έχουν τη δυνατότητα να επανεμφανίζονται τοπικά, όμως σπανίως παρουσιάζουν διήθηση και μεταστάσεις. Από την άλλη, τα επίπεδα καρκινώματα *in situ* (carcinoma *in situ*, CIS) έχουν αποδειχτεί πολύ επικίνδυνες βλάβες του μεταβατικού επιθηλίου, με υψηλά ποσοστά διείσδυσης σε υποκείμενους ιστούς και ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων [85]. Την τελευταία δεκαετία, η επιστημονική κοινότητα έχει αποδείξει την ύπαρξη δύο (2) διακριτών μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε ογκογένεση στην

ουροδόχο κύστη [10, 92]. Τα θηλώδη καρκινώματα υψηλής διαφοροποίησης εμφανίζουν πολύ συχνά συστατική ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, παρουσιάζοντας μεταλλαγές στους γενετικούς τόπους των *HRAS* και *FGFR3* γονιδίων. Ένα μεγάλο ποσοστό νεοπλασμάτων χαμηλού βαθμού κακοήθειας (~70%) παρουσιάζουν μεταλλαγές του *FGFR3* γενετικού τόπου, με το αντίστοιχο ποσοστό να περιορίζεται σημαντικά (<15%) σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, υποδηλώνοντας πιθανή συμμετοχή του γονιδίου *FGFR3* στην ανάπτυξη μη διεισδυτικών καρκινωμάτων χαμηλής κακοήθειας [93-95]. Από την άλλη, σε ότι αφορά τα καρκινώματα *in situ* (CIS) και τους διεισδυτικούς όγκους υψηλής κακοήθειας, οι συχνότερες μεταλλαγές που ανιχνεύονται αφορούν στους γενετικούς τόπους των γονιδίων *p53* (*TP53*) και του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) [77, 85, 87, 89]. Η αναγνώριση των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στη συστατική ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται τα δύο (2) αυτά γονιδιακά προϊόντα είναι πολύ σημαντική, καθώς ο εντοπισμός γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που εμφανίζονται κατά την καρκινική εξαλλαγή μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην ταυτοποίηση μοριακών δεικτών και να βοηθήσουν στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης [96, 97].

Η συχνότερα εμφανιζόμενη σωματική μεταλλαγή του γονιδίου *FGFR3* που συνδέεται με επιθηλιακούς καρκίνους αφορά στην αντικατάσταση του αμινοξικού καταλοίπου σερίνη (S^{249}) από κυστεΐνη (C^{249}) στη θέση 249 της αντίστοιχης πεπτιδικής αλυσίδας, αποτέλεσμα της οποίας είναι η ανεξέλεγκτη συστατική ενεργοποίηση του σχετικού μονοπατιού μεταγωγής σήματος και η επακόλουθη ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης [83-85, 87]. Η σημειακή μεταλλαγή της αδενίνης (A) σε θυμίνη (T) στο κωδικόνιο 227 του *TP53* (*p53*) γενετικού τόπου δημιουργεί μια δευτερογενή θέση ωρίμανσης-ματίσματος στο έβδομο (7^{o}) εξώνιο του πρόδρομου RNA και τον επακόλουθο σχηματισμό μιας ακρωτηριασμένης πρωτεΐνης p53, με σοβαρά αλλοιωμένο ογκοκατασταλτικό δυναμικό, αποτέλεσμα του οποίου είναι, μεταξύ άλλων, η ανάπτυξη κακοήθειας της ουροδόχου κύστης [85, 87, 97].



Εικόνα 11: Αναπαράσταση τυπικών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, όπως διαφοροποιούνται με βάση τη δομή, την έκταση και το βαθμό διείσδυσης στον υποκείμενο μυϊκό ιστό (πηγή: http://training.seer.cancer.gov/).

Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων *p53* και *Rb* εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, με τα εξωκυτταρικά μηνύματα προώθησης του πολλαπλασιασμού να μεταβιβάζονται μέσω του μονοπατιού των ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών και της Ras πρωτεΐνης (σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-MAPK) [85, 97]. Η συστατική ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών που συμμετέχουν στο δίκτυο της κυτταρικής σηματοδότησης ενδέχεται να υποδηλώνει και την ανάπτυξη πολλαπλών επιγενετικών τροποποιήσεων σε μια πλειάδα γενετικών τόπων των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, όπως π.χ. η μη φυσιολογική υπερ-μεθυλίωση υποκινητών, σε περιπτώσεις διεισδυτικών καρκινωμάτων του ουροθηλίου, μερικές από τις οποίες έχει δειχθεί πως έχουν υψηλή σημασία για την πρόγνωση του ασθενούς [85]. Σημαντικό στοιχείο της ογκογένεσης αποτελεί και η ανάπτυξη νεο-αγγείωσης, καθώς η αυξημένη αγγειογένεση συνεισφέρει στην προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής. Οι κλάδοι των νεοσύστατων αιμοφόρων αγγείων προσφέρουν οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες στα κύτταρα του όγκου, ευνοώντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό [98-101]. Στη συνέχεια, παρατίθενται σημαντικά στοιχεία που αφορούν γενετικούς τόπους και σηματοδοτικά μονοπάτια, η

απορρύθμιση των οποίων κατευθύνει και ενορχηστρώνει την ανάπτυξη κακοηθειών στο μεταβατικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστης.

1.2.5.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα 3 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3)

Η οικογένεια των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (fibroblast growth factor receptor, FGFR) αποτελείται από τέσσερα (4) μέλη, τα οποία συνιστούν κυτταρικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας (FGFR's 1-4), οι οποίοι παρέμειναν εξαιρετικά συντηρημένοι κάτω από το πρίσμα της εξέλιξης [102]. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εμφανίζουν κοινές τρισδιάστατες δομές, καθώς περιέχουν μια (1) εξωκυτταρική περιοχή που φέρει ειδικό ολιγοπεπτίδιο σηματοδότησης (υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα), το οποίο ακολουθείται από τρεις (3) περιοχές που παρουσιάζουν δομή όμοια με αυτή των ανοσοσφαιρινών, μια (1) διαμεμβρανική περιοχή η οποία έχει ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα και ένα (1) ενδοκυτταρικό τμήμα το οποίο φέρει ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGF's) οι οποίοι ενεργοποιούν τη συγκεκριμένη ομάδα υποδοχέων, προσδένονται στις εξωκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων που φέρουν δομική ομολογία με τις ανοσοσφαιρίνες τύπου ΙΙ και ΙΙΙ και ενεργοποιούν το μονοπάτι της κυτταρικής σηματοδότησης [102].

Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου έντεκα (11) διαφορετικές μεταλλαγές που αφορούν στο γενετικό τόπο του γονιδίου *FGFR3*, σε τύπους καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, οι οποίες συνήθως συνδέονται με την ανάπτυξη όγκων χαμηλού βαθμού κακοήθειας και σταδιοποίησης [93, 103, 104]. Η ισχυρή σύνδεση των γενετικών αλλαγών του συγκεκριμένου γονιδίου με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων του ουροθηλίου οδήγησε στην μελέτη των θηλωμάτων της ουροδόχου κύστης, τα οποία φέρεται να έχουν άμεση σχέση με την επακόλουθη ανάπτυξη όγκων χαμηλού βαθμού κακοήθειας [104-106]. Επιστημονικές μελέτες συνδέουν την ανάμειξη του γονιδίου *FGFR3* με την ανάπτυξη καρκίνων της ουροδόχου σε ποσοστά που ξεπερνούν το 85% των συνολικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν [107]. Έτσι λοιπόν, φαίνεται να

υπάρχει στενή σύνδεση ανάμεσα στις μεταλλαγές του συγκεκριμένου γενετικού τόπου, την ανάπτυξη θηλωμάτων και την επακόλουθη προαγωγή τους σε μη διεισδυτικά καρκινώματα χαμηλής κακοήθειας της ουροδόχου κύστης.

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FGFR3 παρουσιάζονται αυξημένα σε περιπτώσεις μη διεισδυτικών καρκίνων χαμηλής κακοήθειας, καθώς πειραματικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας, καταδεικνύουν πως το φυσιολογικό ουροθήλιο εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα, σε σχέση με τον εξαλλαγμένο ιστό, σε αρκετά υψηλό ποσοστό των δειγμάτων [108]. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FGFR3 συνδέονται με την ανάπτυξη κακοήθειας στο ουροθήλιο σε ποσοστό που ξεπερνά το 85%, ενώ φαίνεται πως υπάρχει σύνδεση και ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης και τη σταδιοποίηση των όγκων, καθώς η υψηλή πρωτεϊνική έκφραση FGFR3 παρατηρήθηκε ως επί το πλείστον σε μη διεισδυτικούς Ta όγκους, σε σύγκριση με διεισδυτικά καρκινώματα της κύστης (στάδιο T2). Σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι σε μεγάλο ποσοστό (38%) των διεισδυτικών καρκίνων του ουροθηλίου, εμφανίζονται σχετικά αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα FGFR3, χωρίς όμως να ανιχνεύεται μεταλλαγή στον αντίστοιχο γενετικό τόπο [108]. Στους συγκεκριμένους όγκους, η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα FGFR3 πιθανόν να συνεισφέρει στον εξαλλαγμένο φαινότυπο, με διμερισμό των υπερεκφραζόμενων υποδοχέων ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέτη, με αυξημένη έκφραση του μορίου-προσδέτη, ή μέσω εναλλακτικού ματίσματος, το οποίο προκαλεί τη δημιουργία πρωτεϊνικών υποδοχέων με αυξημένη συγγένεια για προσδέτες [108]. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλαγές του γενετικού τόπου που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα FGFR3 εμπλέκονται σε ποσοστό άνω του 80% των όγκων σταδίου Ta, καθώς και σε ποσοστό άνω του 50% των T2 όγκων.

Η ανάπτυξη αντισωμάτων και μικρομοριακών χημικών αναστολέων που προσδένονται ειδικά και αναστέλλουν τη λειτουργία του FGFR3 σε κυτταρικές σειρές οι οποίες υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα [109, 110], καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του μορίου αυτού στις σύγχρονες

θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, καθώς φαίνεται πως τόσο η φυσιολογική πρωτεΐνη και η υπερέκφρασή της, όσο και οι μεταλλαγμένες ισομορφές του FGFR3 μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς κυτταρικούς στόχους [110].

1.2.5.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Ras-MAPK)

Η πλειοψηφία των μη διεισδυτικών καρκίνων της ουροδόχου κύστης παρουσιάζουν συστατική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του πρωτο-ογκογονιδίου Ras και των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Ras-MAPK), μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα FGFR3 [104, 111]. Παρ' όλα αυτά, σε καρκινώματα που εμφανίζουν διήθηση, άλλοι υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης εμφανίζουν αυξημένη, συστατική ενεργοποίηση, όπως η ομάδα των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR και HER2/c-neu), οι οποίοι συνδέονται με κακή πρόγνωση [112, 113].

Η πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) προκαλεί ενεργοποίηση του υπερεκφραζόμενου υποδοχέα EGFR, καθοδηγώντας αρχικά το διμερισμό του και ακολούθως την αυτοφωσφορυλίωση των επιμέρους υπομονάδων του. Οι ενεργοί υποδοχείς προσελκύουν πρωτεϊνικούς παράγοντες που ενεργοποιούν την ογκοπρωτεΐνη Ras (ενεργότητα GTPάσης). Η φωσφορυλιωμένη, ενεργή πρωτεΐνη Ras δύναται να μεταδώσει το μιτογόνο σήμα μέσα από το σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών MAPK. Ο γενετικός τόπος *RASSF1A* κωδικοποιεί για μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία προσδένεται στην ενεργή Ras κινάση και αναστέλλει τη λειτουργία της [114]. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί πειραματικά πως είναι υψηλά μεθυλιωμένο σε κακοήθειες της ουροδόχου κύστης, ενώ η αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γενετικού τόπου συνδέεται γραμμικά με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας του όγκου [115-118]. Κατασταλτική δράση στο σηματοδοτικό μονοπάτι των κινασών MAP επιτελεί και η πρωτεϊνική κινάση που συνδέεται με το θάνατο

(death associated protein kinase, DAPK), η οποία αποτρέπει την μεταφορά των ενεργών MAP κινασών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, προκαλώντας ανάσχεση της μεταγωγής σήματος. Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πληθώρα διαφορετικών επιπέδων μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καρκίνους της ουροδόχου κύστης, καθιστώντας την επιγενετική τροποποίηση του συγκεκριμένου γενετικού τόπου μη αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη [118-120].

Η μεταφορά των κινασών MAP (κυρίως των Erk1/2 και της p38 κινάσης) στον πυρήνα των κυττάρων ενεργοποιεί την επαγόμενη από μιτογόνα και συνθήκες εξωτερικού στρες κινάση MSK1 (mitogen and stress activated protein kinase 1), η οποία ως κινάση της ιστόνης H3 οδηγεί σε χαλάρωση της χρωματίνης, καθιστώντας το γενετικό υλικό (DNA) προσιτό σε μεταγραφικούς παράγοντες [121]. Η αλλαγή των επιπέδων περιέλιξης της χρωματίνης οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου *MYC*, που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη c-Myc ρυθμίζει την έκφραση των κυκλινών (cyclins), οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin dependent kinases, Cdk's) και ελέγχουν θετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) και απελευθερώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1, ο οποίος καθίσταται διαθέσιμος για την μεταγραφή των γονιδίων της φάσης S του κύκλου [122-124]. Παρόλα αυτά, δεν έχουν βρεθεί επιστημονικά δεδομένα που δύναται να συσχετίσουν κατηγορηματικά το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *MYC* με το βαθμό κακοήθειας των όγκων της ουροδόχου κύστης, καθώς οι πειραματικές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [125, 126].

1.2.5.3 Μονοπάτι της πρωτεΐνης p53

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53* και παίζει κεντρικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκονται στην έναρξη και την πρόοδο της ογκογένεσης, καθώς και την ανταπόκριση στη

θεραπεία. Τέτοιες λειτουργίες είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αγγειογένεση, η επαγωγή του αποπτωτικού φαινοτύπου και η επιδιόρθωση του DNA [127]. Η φυσικού τύπου πρωτεΐνη p53 (wild type, wt) προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου μεταξύ της φάσης G1 και της φάσης του διπλασιασμού του γενετικού υλικού S (G1/S checkpoint), και ρυθμίζει τον έλεγχο του κύκλου μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης του γενετικού τόπου *p21*$^{WAF1/CIP1}$ [128]. Μεταλλαγές στο γενετικό τόπο *TP53* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι κακοήθειες της ουροδόχου κύστης [127]. Οι μεταλλαγές του συγκεκριμένου γονιδίου που ανιχνεύονται σε περιπτώσεις κακοήθειας αποτελούν κατά κύριο λόγο σημειακές, παρερμηνεύσιμες (missense) μεταλλαγές, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή p53 πρωτεϊνικών μορίων με διαφοροποιημένη λειτουργικότητα, η οποία παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στον μηχανισμό πρωτεολυτικής αποικοδόμησης μέσω ουβικουϊτίνωσης και ενεργοποίησης του πρωτεασώματος [129]. Φαίνεται πως οι μεταλλαγές προκαλούν τη δημιουργία μιας πιο σταθερής ισομορφής της πρωτεΐνης p53, η οποία συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων. Αν και η αύξηση των πυρηνικών επιπέδων της p53 συνοδεύεται συνήθως από μεταλλαγές στο γονίδιο *TP53*, παρατηρούνται μερικές ασυμφωνίες στο γενικό πρότυπο δράσης. Τόσο η συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 στον πυρήνα, όσο και το εξώνιο στο οποίο ανιχνεύεται η εκάστοτε μεταλλαγή συνεισφέρουν εξίσου στην προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής [97].

Το γονίδιο *p21*$^{WAF1/CIP1}$ κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p21, η οποία αποτελεί αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Η μεταγραφή της p21 ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη p53. Η απώλεια έκφρασης του *p21*$^{WAF1/CIP1}$ θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός μέσω του οποίου οι μεταλλαγές της p53 καθορίζουν την πρόοδο της ογκογένεσης [130]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως η απώλεια έκφρασης του γενετικού τόπου *p21*$^{WAF1/CIP1}$ δύναται να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη της νόσου, ενώ η διατήρηση υψηλών επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί σε καταστολή της επίδρασης της μεταλλαγμένης p53 [130]. Ασθενείς

που εμφανίζουν ολική έλλειψη της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *p21*$^{WAF1/CIP1}$ ταυτόχρονα με μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά επανεμφάνισης της νόσου και κακή πρόγνωση, σε σχέση με όγκους θετικούς για έκφραση *p21*$^{WAF1/CIP1}$ (p21$^{+/+}$), ανεξάρτητα από το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης.

Η πρωτεΐνη Mdm2 (murine double minute 2 protein) εμπλέκεται σε αυτορρυθμιζόμενο βρόγχο ανάδρασης (auto-regulatory feedback loop) με την πρωτεΐνη p53, ρυθμίζοντας την ενεργότητά της [131]. Αυξημένα επίπεδα p53 ενορχηστρώνουν την trans ενεργοποίηση του υποκινητή του γενετικού τόπου *MDM2*, οδηγώντας στην αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας. Η παραγόμενη Mdm2 πρωτεΐνη συνδέεται με την p53 και την οδηγεί στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου *MDM2* αναστέλλεται από την πρωτεΐνη p14, προσφέροντας ακόμα ένα επίπεδο στην πολύπλοκη ρύθμιση της πρωτεΐνης p53 [132]. Το γονίδιο *p14*^{ARF}, σε περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι ανενεργό, είτε λόγω έλλειψης στη χρωμοσωμική περιοχή που φέρει το συγκεκριμένο γενετικό τόπο, είτε λόγω αυξημένης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου. Αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου *p14*^{ARF} συνήθως συνδέονται με κακή πρόγνωση [133].

1.2.5.4 Μονοπάτι της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb)

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με πυρηνικό εντοπισμό, η φωσφορυλίωση της οποίας παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [89]. Η ενεργή, μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Rb δεσμεύει και απενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1 [134]. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος από κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, ο οποίος με τη σειρά του, ενορχηστρώνει την ενεργοποίηση της μεταγραφής γενετικών τόπων που συμμετέχουν στη διαδικασία του διπλασιασμού του γενετικού υλικού [89]. Μεταλλαγές στο γονίδιο *Rb*, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια της ενεργότητας

των πρωτεϊνικών προϊόντων του συγκεκριμένου γενετικού τόπου, έχουν εντοπιστεί σε όλους τους τύπους νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα με το βαθμό κακοήθειας [135]. Η συστατική φωσφορυλίωση-απενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rb, είτε λόγω απώλειας της πρωτεΐνης p16, είτε λόγω συστατικά ενεργοποιημένων συμπλόκων κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, εντοπίζεται συχνά σε όγκους ασθενών που πάσχουν από καρκίνο της ουροδόχου κύστης [136].

1.2.5.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3 κινάσης

Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες έχουν αναδείξει την ανάμειξη του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης PI3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K) με την ανάπτυξη κακοηθειών, μέσω διάφορων μηχανισμών [137, 138]. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν περιγραφεί τέσσερις (4) μηχανισμοί ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού οι οποίοι αναφέρονται παρακάτω [137-139]:

- ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας p110 της PI3-K (*PIK3CA*),
- απενεργοποίηση του γονιδίου *TSC1*,
- μεταλλαγή του γενετικού τόπου *AKT1* και
- απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN*.

Ο συνδυασμός των επιμέρους μεταλλαγών που αναφέρθηκαν πιο πάνω εμφανίζει συνεργιστική δράση, καθώς η ύπαρξη μιας μεταλλαγής δεν αποκλείει την ανάπτυξη άλλης. Με αυτόν τον τρόπο οι μη κανονικές αλληλεπιδράσεις των επιμέρους μεταλλαγμένων γονιδιακών προϊόντων εμπλέκονται στην ανάπτυξη και προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής.

Μεταλλαγές στην καταλυτική υπομονάδα της PI3 κινάσης (γενετικός τόπος *PIK3CA*) έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλές περιπτώσεις νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης, κυρίως σε μη διεισδυτικούς όγκους χαμηλής κακοήθειας (Ta) [137]. Πειραματικές μελέτες έχουν εντοπίσει υψηλή συχνότητα μεταλλαγών που αφορούν σε νουκλεοτιδικά κατάλοιπα (hotspots) των

εξωνίων εννέα (9) και είκοσι (20) του γονιδίου *PIK3CA*, ανεξάρτητα από το στάδιο των όγκων της ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν (65,5% για όγκους σταδίου Ta, 11,5% για T1 και 23% για όγκους >T2). Επίσης, έχει καταδειχθεί ευθεία συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό κακοήθειας του όγκου και την εμφάνιση μεταλλαγών στα συγκεκριμένα εξώνια, με περίπου 25% του συνόλου των όγκων να εμφανίζουν αλλαγές στο γενετικό τόπο του συγκεκριμένου γονιδίου [138].

Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το φάσμα των μεταλλαγών που εμφανίζονται στο γονίδιο *PIK3CA* σε καρκινώματα της ουροδόχου κύστης σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου, καθώς πιο συχνές μεταλλαγές είναι αυτές που εμφανίζονται στα κατάλοιπα γλουταμικού οξέος των θέσεων 542 και 545 (E^{542} και E^{545} αντίστοιχα) και η αντικατάστασή τους από λυσίνη (K^{542} και K^{545} αντίστοιχα), οι οποίες εμφανίζονται σε επιμέρους ποσοστά 24 και 52% αντίστοιχα [138]. Από την άλλη, η πλέον συχνή μεταλλαγή που απαντάται στους υπόλοιπους τύπους καρκίνου (>45%), η αντικατάσταση της ιστιδίνης του αμινοξικού καταλοίπου της θέσης 1047 (H^{1047}) από αργινίνη (R^{1047}) για το γονίδιο *PIK3CA*, εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 15% σε όγκους της ουροδόχου κύστης. Συνολικά, μέχρι σήμερα, έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί εννέα (9) διαφορετικές μεταλλαγές του γονιδίου *PIK3CA* στον ανθρώπινο καρκίνο της ουροδόχου κύστης [138].

Αν και ο υποδοχέας FGFR3 δεν ενεργοποιεί άμεσα το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης PI3 σε κύτταρα του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου, έχει διαπιστωθεί σύνδεση ανάμεσα σε μεταλλαγές του γονιδίου *FGFR3* και του γενετικού τόπου *PIK3CA* [137]. Σημαντικό ποσοστό όγκων της ουροδόχου κύστης που φέρουν μεταλλαγές στο γενετικό τόπο *FGFR3*, παρουσιάζουν μεταλλαγές και στο γονίδιο *PIK3CA* (26%), με το αντίστοιχο ποσοστό να μειώνεται σημαντικά (~7%) για περιπτώσεις όγκων στους οποίους εντοπίζεται *FGFR3* φυσικού τύπου [138]. Η διερεύνηση της λειτουργικής διασύνδεσης μεταξύ των συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών παραμένει πολύ σημαντική, καθώς η διάγνωση ασθενών που φέρουν μεμονωμένες, ή συνδυασμό μεταλλαγών των δύο (2) αυτών γενετικών τόπων, παρουσιάζει εξαιρετικό κλινικό ενδιαφέρον σε ότι αφορά την εφαρμογή

κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου και τη διαφοροποίηση της πρόγνωσης.

Ο γενετικός τόπος *TSC1* (tuberous sclerosis complex 1, TSC1) αποτελεί ένα (1) από τα δύο (2) γονίδια (μαζί με το *TSC2*) που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη του συνδρόμου της οζώδους σκλήρυνσης, μιας πολυσυστηματικής ασθένειας που οδηγεί στην ανάπτυξη χαρακτηριστικών αμαρτωμάτων σε πολλαπλά όργανα του σώματος. Το γονίδιο *TSC1* (εντοπίζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9, 9q34) κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη αμαρτίνη, ενώ το *TSC2* (εντοπίζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 16, 16p13.3) κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη οζωδίνη. Παρά το γεγονός ότι η ανάπτυξη καρκινικής εξαλλαγής σε επιθηλιακά κύτταρα δεν εμφανίζει άμεση διασύνδεση με την οζώδη σκλήρυνση, έχει ταυτοποιηθεί απώλεια της λειτουργικότητας του γονιδίου *TSC1* σε κακοήθειες της ουροδόχου κύστης [138, 140, 141].

Πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό, πως δεν έχει δειχθεί μέχρι σήμερα σύνδεση μεταξύ μεταλλαγών των γονιδίων *TSC* με κανέναν άλλο τύπο καρκίνου, εκτός των κακοηθειών της ουροδόχου κύστης. Πάνω από 50% όλων των τύπων καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα από βαθμό κακοήθειας και στάδιο, δείχνουν απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) για χαρακτηριστικούς δείκτες του χρωμοσώματος 9 και κυρίως για την περιοχή του γενετικού τόπου *TSC1*, η οποία εντοπίζεται στον μεγάλο βραχίονα (9q34), όπου εμφανίζονται συχνά ελλείψεις [141, 142]. Έχει αποδειχθεί ότι μεταλλαγές του γονιδίου *TSC1* ανιχνεύονται σε συχνότητα περίπου 15% των όγκων της ουροδόχου κύστης, με τις αλλαγές να συμπεριλαμβάνουν ανερμηνεύσιμες μεταλλαγές (35%), παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές (26%), μεταλλαγές που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (26%), ελλείψεις (3%) και μεταλλαγές που επηρεάζουν την διαδικασία του ματίσματος (10%) [138, 143]. Οι παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές που ανιχνεύονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης μέσω λανθασμένου ματίσματος του ανώριμου πρωτεϊνικού προϊόντος, δομικής αστάθειας και αλλαγής της υποκυτταρικής τοπολογίας της πρωτεΐνης. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε δείγματα όγκων

ουροδόχου κύστης που αφορούν στην ανίχνευση της πρωτεΐνης αμαρτίνης, αποκάλυψαν ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνικής έκφρασης σε όγκους που δε φέρουν μεταλλαγές στον γενετικό τόπο *TSC1*, φέρνοντας στην επιφάνεια άλλους πιθανούς μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου, οδηγώντας τελικά σε μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης TSC1 [138].

Η πρωτεΐνη Akt1 αποτελεί μέλος μιας οικογένειας κινασών με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης (3 μέλη), η οποία ενεργοποιείται από τα πρωτεϊνικά μόρια PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1) και TORC2 (target of rapamycin complex 2). Δείχθηκε πρόσφατα ότι μεταλλαγές του γενετικού τόπου *AKT1* στην περιοχή που η κινάση φέρει ομολογία με την πλεκστρίνη συνδέονται άμεσα με τον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών [144]. Ένα κατάλοιπο γλουταμικού οξέος στη θέση 17 (E^{17}) του πρωτεϊνικού μορίου, το οποίο περιέχεται στην περιοχή πρόσδεσης της φωσφοϊνοσιτίδης, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt1. Οι μεταλλαγές που αφορούν την αντικατάσταση των καταλοίπων γλουταμικού οξέος στις θέσεις 17 και 49 (E^{17} και E^{49}) με λυσίνη (K^{17} και K^{49}), οδηγούν στην μη φυσιολογική υποκυτταρική μετατόπιση του πρωτεϊνικού μορίου στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που οδηγεί σε συστατική ενεργοποίηση της κατωρροϊκής σηματοδότησης [145]. Οι ίδιες μεταλλαγές έχουν ανιχνευθεί και σε περιστατικά κακοηθειών της ουροδόχου κύστης [145].

Νουκλεοτιδικές ελλείψεις στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 (10q) εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε διεισδυτικούς τύπους καρκίνου της ουροδόχου κύστης (24-58%) συγκριτικά με επιφανειακούς, μη διηθητικούς όγκους του ουροθηλίου [146, 147]. Η χρωμοσωμική περιοχή που εξαλείφεται περιέχει το γενετικό τόπο που εδράζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*, το πρωτεϊνικό παράγωγο του οποίου αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού της κινάσης PI3. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται συχνά μεταλλαγές στο δεύτερο αλληλόμορφο του συγκεκριμένου γενετικού τόπου, το οποίο διατηρείται άθικτο στο γονιδίωμα, ενώ οι επιπτώσεις της έλλειψης του ενός αλληλίου στην κυτταρική φυσιολογία δεν είναι γνωστές. Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η

έλλειψη λειτουργικής πρωτεΐνης PTEN διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των διηθητικών χαρακτηριστικών των εξαλλαγμένων κυττάρων της ουροδόχου κύστης [148].

1.2.5.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι καρκινικής αγγειογένεσης

Η αγγείωση των νεοπλασμάτων είναι πολύ σημαντικό φαινόμενο στην ογκογένεση και την ανάπτυξη της κακοήθειας, καθώς διατηρεί την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του όγκου, ευνοώντας την επιβίωση και την προώθηση της εξαλλαγής. Η νεο-αγγείωση των κακοηθειών προσδιορίζεται πειραματικά με τον υπολογισμό της πυκνότητας των τριχοειδών αγγείων που περιβάλλουν τον όγκο, σε συγκεκριμένο εμβαδόν [149]. Η πυκνότητα των τριχοειδών αποτελεί ξεχωριστό προγνωστικό παράγοντα για διηθητικούς όγκους της ουροδόχου κύστης, ο οποίος συνδέεται με την επιβίωση του ασθενούς [98]. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) αποτελεί μόριο-κλειδί στην νεο-αγγείωση των όγκων. Υψηλά επίπεδα έκφρασης του VEGF σε επιφανειακά νεοπλάσματα του μεταβατικού επιθηλίου συνδέονται με αυξημένη επανεμφάνιση και προώθηση της κακοήθειας σε διηθητικούς τύπους καρκίνου [150]. Υψηλά επίπεδα VEGF στον ορό ασθενών που πάσχουν από καρκίνο συνήθως συνδέονται με την ύπαρξη όγκων υψηλού βαθμού κακοήθειας, τη διήθηση παρακείμενων ιστών και αιμοφόρων αγγείων, την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστατικών εστιών και γενικά με κακή πρόγνωση [89, 151].

Η αγγειογένεση συντίθεται από μια περίπλοκη αλληλουχία γεγονότων που περιλαμβάνουν τον έλεγχο της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων, την μετανάστευση και τη διήθηση. Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του υποδοχέα EGFR οδηγεί στην κατωρροϊκή αύξηση της μεταγραφής του παράγοντα VEGF [89]. Ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας συνεργάζεται με ένα ένζυμο, τη φωσφορυλάση της θυμιδίνης (TP, thymidine phosphorylase) και οδηγεί στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και των μεταλλοπρωτεϊνασών (MMP's)

[152, 153]. Η ιντερλευκίνη-8 ενισχύει τη χημειοτακτική συμπεριφορά, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Φαίνεται επιπλέον πως δρα ενισχυτικά στη διαδικασία της αγγειογένεσης και ευνοεί τη διείσδυση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης σε παρακείμενους ιστούς. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεολυτικών ενζύμων που καθοδηγούν την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας που περιβάλλει τη βασική μεμβράνη, προωθώντας την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-2 και MMP-9 (κολλαγενάσες τύπου IV) έχουν συνδεθεί με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και το υψηλό στάδιο των όγκων της ουροδόχου κύστης. Επιπλέον, χορήγηση αναστολέα της MMP-2 έχει δειχθεί πειραματικά πως δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης και την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής σε διηθητικούς τύπους νεοπλασμάτων [154].

1.2.6 Αντιμετώπιση - Θεραπευτικά Πρωτόκολλα

Η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου βασίζεται στο στάδιο κακοήθειας του όγκου, το μοριακό του προφίλ, καθώς και στη σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων στο άτομο που έχει διαγνωσθεί ότι πάσχει από καρκίνο της ουροδόχου κύστης [36]. Οι όγκοι που κατατάσσονται στα στάδια 0 και I αντιμετωπίζονται κατά κύριο λόγο με απλή διουρηθρική αφαίρεση της κακοήθειας. Παρά το χαμηλό στάδιο των όγκων 0 και I, πραγματοποιούνται συχνά χειρουργικές επεμβάσεις (ανάλογα με το μοριακό προφίλ του όγκου, π.χ. επιθετικά Tis νεοπλάσματα), όπως η μερική κυστεκτομή, διατηρώντας άθικτο το υπόλοιπο τμήμα της ουροδόχου κύστης. Εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση η οποία χρησιμοποιείται για όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας αποτελεί η πραγματοποίηση εγχύσεων συμβατικών ή/και στοχευμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθώς και ανοσοενισχυτικών φαρμάκων απευθείας στην κύστη [35, 36, 155, 156]. Στις περιπτώσεις κακοήθειας των σταδίων II και III, οι συνήθεις κλινικές πρακτικές περιλαμβάνουν: (i) μερική εκτομή της κύστης συνδυασμένη με επακόλουθη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, (ii) χημειοθεραπευτική αγωγή

συνοδευόμενη από διαδοχική χειρουργική επέμβαση (αφαιρώντας το ελάχιστο δυνατό τμήμα της ουροδόχου κύστης), (iii) συνδυασμένη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, πρωτόκολλο το οποίο επιλέγεται σε περιπτώσεις αδυναμίας χειρουργικής αφαίρεσης της ουροδόχου κύστης και (iv) ολική εκτομή της ουροδόχου κύστης [8, 13]. Η πλειονότητα των όγκων σταδίου IV δεν αντιμετωπίζονται με χειρουργική εκτομή, ενώ παρά το γεγονός ότι δεν επιτυγχάνεται πλήρης ίαση, η πλέον ενδεδειγμένη θεραπευτική προσέγγιση είναι η αγωγή με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [32, 36, 155, 156].

Τα κυριότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη, στο πλαίσιο των θεραπευτικών προσεγγίσεων εναντίον του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, παρατίθενται πιο κάτω:

- Μεθοτρεξάτη (Methotrexate)
- Βινμπλαστίνη (Vinblastine)
- Δοξορουβικίνη (Doxorubicin)
- Κυκλοφωσφαμίδη (Cyclophosphamide)
- Πακλιταξέλη (Paclitaxel)
- Ντοσεταξέλη (Docetaxel)
- Καρβοπλατίνη (Carboplatin)
- Σισπλατίνη (Cisplatin)
- Ιφοσφαμίδη (Ifosfamide)
- Τζεμσιταμπίνη (Gemcitabine)

Οι συνήθεις χημειοθεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να χορηγηθούν με τη μορφή «μονοσχημάτων» (ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας) είτε συνδυασμένων θεραπειών (περισσότερα του ενός φάρμακα), οι οποίες στοχεύουν τόσο στην ενίσχυση της ογκοκατασταλτικής ικανότητας του μίγματος με μείωση της παράπλευρης φαρμακολογικής τοξικότητας, όσο και στην κατά το δυνατόν αποφυγή της ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι της χημειοθεραπείας [3]. Ένα από τα παραδοσιακά πρωτόκολλα συνδυασμένης χημειοθεραπείας είναι γνωστό ως MVAC (Methotrexate-Vinblastine-Adriamycin-Cisplatin), ενώ η συνδυασμένη χορήγηση των αντικαρκινικών παραγόντων τζεμσιταμπίνη και σισπλατίνη έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει

θεραπευτική αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με αυτή του MVAC, με χαρακτηριστικά, όμως, μειωμένες παράπλευρες δράσεις και παρενέργειες [8, 81, 85].

1.2.6.1 Εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Εκτός από τη χειρουργική επέμβαση για την απομάκρυνση διηθητικών και μη καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές σε παγκόσμιο επίπεδο, οι οποίες αφορούν στην μετεγχειρητική επικουρική ανοσοενισχυτική (adjuvant) και την προεγχειρητική νεο-επικουρική ανοσοενισχυτική (neo-adjuvant) θεραπεία [157]. Παρά το γεγονός ότι συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται στη σισπλατίνη, όπως το MVAC, χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, η αξιολόγηση φαρμακολογικών παραγόντων που βασίζονται σε άλλες χημικές ενώσεις, όπως οι ταξάνες, οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης, κ.λπ., αλλάζουν τα δεδομένα της σύγχρονης χημειοθεραπείας [158, 159].

Οι περισσότερες από τις κλινικές μελέτες που πραγματοποιούνται σήμερα βασίζονται κατά κύριο λόγο στη σταδιοποίηση των όγκων, ενώ τα μοριακά προφίλ των όγκων δεν έπαιζαν (μέχρι τώρα) σημαντικό ρόλο στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Παρόλα αυτά, η εμβάθυνση στους μοριακούς μηχανισμούς έναρξης και προόδου της καρκινογένεσης οδηγεί στην αναγνώριση μορίων-«κλειδιά» για την ανάπτυξη του εκάστοτε νεοπλάσματος, υποδεικνύοντας εξατομικευμένες θεραπείες με βάση το μοριακό προφίλ του συγκεκριμένου όγκου. Η σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αφορά το σχεδιασμό κλινικών δοκιμών οι οποίες στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια, πρωτεΐνες, υποκυτταρικούς μηχανισμούς ή γενετικές αλλαγές, που παρουσιάζουν τόσο βιολογική, όσο και προγνωστική αξία [85]. Ο απώτερος στόχος της σύγχρονης χημειοθεραπείας είναι η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που εμφανίζονται σε συγκεκριμένους όγκους, έτσι ώστε να καταστεί

δυνατή η παροχή άμεσης θεραπείας σε ασθενείς που κατατάσσονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου (όγκοι με υψηλή πιθανότητα επανεμφάνισης διεισδυτικής νόσου), να γίνει εφικτή η επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης που είναι η πλέον αποτελεσματική σε ατομικό επίπεδο, και να ταυτοποιηθούν και στοχευθούν οι σωστοί μοριακοί μηχανισμοί που έχουν οδηγήσει τα κύτταρα σε καρκινική εξαλλαγή [36, 77]. Με αυτόν τον τρόπο θα καταστεί δυνατή η εξατομικευμένη αντιμετώπιση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, η οποία ευελπιστούμε ότι θα οδηγήσει σε αποτελεσματικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Η χορήγηση συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων βοηθά σημαντικά ανθρώπους που πάσχουν από νεοπλασίες της ουροδόχου κύστης. Παρόλα αυτά, τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που βασίζονται σε συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (π.χ. σισπλατίνη, δοξορουβικίνη, κ.λπ.) παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποδοτικότητα όταν συνδυαστούν με ανοσοενισχυτικούς παράγοντες, στην μάχη κατά των κακοηθειών του ουροθηλίου [160]. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι ασθενείς που εμφανίζουν καρκίνο της ουροδόχου κύστης σε προχωρημένο στάδιο κακοήθειας, με το μοριακό προφίλ των όγκων να καταδεικνύει μεταλλαγές της p53 πρωτεΐνης, ανταποκρίνονται εξαιρετικά σε συνδυασμένη θεραπεία ανοσοενισχυτικών παραγόντων και συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όπως η σισπλατίνη [161].

1.2.6.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν συγκεκριμένες γενετικές μεταβολές

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η στόχευση σημαντικών μορίων της κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, μπορεί να αποτελέσει αποδοτική θεραπεία, ανάλογα με το μοριακό προφίλ του εκάστοτε όγκου [85]. Με τα χρόνια, έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα ετερογενών, ως προς το στόχο, φαρμακευτικών παραγόντων, που περιλαμβάνουν ιϊκούς φορείς φυσικού τύπου, μικρομοριακούς αναστολείς και μονοκλωνικά αντισώματα, ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση μιας όσο

το δυνατόν πιο στοχευμένης επίδρασης στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκινικής εξαλλαγής στην ουροδόχο κύστη. Πολλές από τις ουσίες αυτές έχουν ήδη εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές από τις φαρμακευτικές εταιρίες που τις παρασκευάζουν, ενώ οι σημαντικότερες παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα [36, 85, 162-170]:

Φαρμακευτικός Παράγοντας	**Μοριακός Στόχος**	**Μηχανισμός δράσης**	**Πειραματικά και κλινικά δεδομένα**	**Φάση κλινικών δοκιμών**
Μονοπάτι Ras-MAPK				
Gefitinib	Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης τύπου EGFR	Αναστολή της ενεργότητας κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα	Συνεργιστική δράση με συμβατικά χημειοθεραπευτικά	Φάση II
Erlotinib	Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης τύπου EGFR	Αναστολή της ενεργότητας κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα	Συνεργιστική δράση με συμβατικά χημειοθεραπευτικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου και των νεφρών	Φάση II
Cetuximab	EGFR	Πρόσδεση στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR και αναστολή σηματοδότησης	Συνεργιστική δράση με συμβατικά χημειοθεραπευτικά στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης	-
Trastuzumab	ERBB2	Αναστολή HER-2 θετικών κυττάρων και ενεργοποίηση ανοσολογικής απόκρισης	Συνεργιστική δράση με συμβατικά χημειοθεραπευτικά στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού	Φάση I/II
Sorafenib	Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης	Αναστολή πολλαπλών κινασών	Δραστικό έναντι του καρκίνου των νεφρών, των πνευμόνων, του παχέος εντέρου και των μελανωμάτων	Φάση II
Μονοπάτι p53				
AdCMV-*TP53*+/+	Μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη	Μεταφορά λειτουργικής p53 πρωτεΐνης στα κύτταρα	Συνεργιστική δράση με συμβατικά χημειοθεραπευτικά	Φάση I
rVV-TK-53	Μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη	Μεταφορά λειτουργικής p53 πρωτεΐνης στα κύτταρα	Ογκοκατασταλτική επίδραση σε μοντέλα ποντικών	Φάση I

PRIMA-1	Μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη	Επαναφορά της μεταγραφικής λειτουργικότητας του μεταλλαγμένου p53	Συνεργιστική δράση με σισπλατίνη και επαγωγή απόπτωσης	-
Μονοπάτι Rb				
Ad-Rb94+/+	Καρκινικά κύτταρα που φέρουν ή όχι Rb πρωτεΐνη	Αντικατάσταση της λειτουργικότητας του Rb	Αναστολή αύξησης καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης και επαγωγή απόπτωσης	-
Flavopiridol, UCN-01	Κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες	Αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενων κινασών	Αναστολή αύξησης ανθεκτικών καρκινωμάτων	-
Μονοπάτι αγγειογένεσης				
Endostatin	VEGF	Αναστολή ανάπτυξης και επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων	Αναστολή αύξησης καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης	-
Bevacizumab	VEGF	Δέσμευση στον VEGF και αναστολή της λειτουργίας του	Ελπιδοφόρα αποτελέσματα για καρκίνο του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του μαστού	Φάση II
VEGF Trap	VEGF	Δέσμευση στον VEGF και αναστολή της λειτουργίας του	Αναστολή αγγειογένεσης σε προκλινικά μοντέλα	Φάση II
Ad-bFGF-AS	bFGF	Μεταφορά bFGF γονιδίου (antisense)	Αναστολή αύξησης του όγκου και επαγωγή απόπτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα	-
Μεθυλίωση υποκινητών				
5-Aza-CR	Μεθυλιωμένοι υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων	Ενσωμάτωση διφωσφορικών ριβονουκλεοτιδίων στο DNA	Θετική επίδραση σε μυελο-δυσπλαστικά σύνδρομα	-
Zebularine	Μεθυλιωμένοι υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων	Ενσωμάτωση διφωσφορικών ριβονουκλεοτιδίων στο DNA	Χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα σε *in vivo* μοντέλα	-
5-Aza-CdR	Μεθυλιωμένοι υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων	Φωσφορυλίωση από κινάσες και ενσωμάτωση στο DNA	Ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε ασθενείς με κακοήθειες του αιμοποιητικού συστήματος	-

Πίνακας 1: Σύγχρονοι στοχευμένοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Αναφέρονται το μόριο στόχος, ο μηχανισμός δράσης της ουσίας και η φάση κλινικών δοκιμών που βρίσκεται, καθώς και κάποια ενδεικτικά, αρχικά πειραματικά δεδομένα.

1.2.7 Εθισμός καρκινικών κυττάρων σε ογκογονίδιο (Oncogene addiction)

Η καρκινική εξαλλαγή αναδεικνύεται ως το αποτέλεσμα μιας χρόνιας, εξελικτικής διαδικασίας πολλαπλών βημάτων, κατά την οποία προκύπτει συσσώρευση μεταλλαγών και επιγενετικών τροποποιήσεων στην έκφραση γενετικών τόπων που εμπλέκονται σε πολλαπλές λειτουργίες της κυτταρικής φυσιολογίας [171-175]. Παρά την εκτενή τροποποίηση του γονιδιώματος των εξαλλαγμένων κυττάρων, υπάρχουν πολλά παραδείγματα στα οποία η αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας ή η αποτελεσματική αποσιώπηση ενός και μόνο ογκογονικού γενετικού τόπου μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων και σε μερικές περιπτώσεις, σε καλύτερη πρόγνωση των ασθενών. Η φράση εθισμός σε ογκογονίδιο (oncogene addiction) προτάθηκε από τον Bernard Weinstein για να περιγράψει την παρατήρηση ότι η διατήρηση του νεοπλασματικού φαινοτύπου σε εξαλλαγμένα κύτταρα εξαρτάται από τη συνεχή ενεργότητα συγκεκριμένων ογκογονιδίων ή την απώλεια της λειτουργικότητας κάποιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων [176-178]. Ο εθισμός σε ογκογονίδιο προσφέρει μια λογική στη στοχευμένη μοριακή θεραπεία του καρκίνου [176]. Ολοένα και περισσότεροι ερευνητές προτείνουν πως η αποκρυπτογράφηση του εθισμού των εξαλλαγμένων κυττάρων σε ογκογονίδιο μπορεί να καθοδηγήσει την αποδοτικότερη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Παρά το γεγονός ότι δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο βαρυσήμαντος ρόλος ενός (1) και μόνο γενετικού τόπου στην ανάπτυξη της ογκογένεσης, αποτελεί αξιοθαύμαστο γεγονός ότι σε κάποιες περιπτώσεις κακοήθειας η αποκατάσταση της λειτουργικότητας ενός (1) και μόνο γονιδίου μπορεί να φέρει ισχυρή ανασταλτική επίδραση στις λειτουργικές παραμέτρους της κακοήθειας.

Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία υπερ-εκφράζονται σε κάποιους τύπους κακοήθειας (π.χ. HER2, Bcr-Abl κ.λπ.), αναδεικνύουν την εξάρτηση των νεοπλασματικών κυττάρων από τις γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που ενεργοποιούν τους συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, καθιστώντας τα εξαιρετικούς στόχους της σύγχρονης, στοχευμένης χημειοθεραπείας [179].

Στο πλαίσιο των συγκεκριμένων παρατηρήσεων, διερευνήθηκε η πιθανή υπερ-εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης από μια ομάδα πρωτεϊνικών μορίων που έχουν βρεθεί πως αυξάνουν σημαντικά την έκφρασή τους σε περιπτώσεις εξαλλαγής, τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins, Hsp's) και εν προκειμένω, την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Hsp90). Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε μελέτη της Hsp90 ως πιθανό θεραπευτικό στόχο των νεοπλασιών της ουροδόχου κύστης, με εκμετάλλευση του ενδεχόμενου εθισμού των εξαλλαγμένων κυττάρων στη λειτουργία της μοριακής συνοδού.

1.3 Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Heat shock proteins)

Η απόκριση κυττάρων σε θερμικό σοκ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1962 από την ερευνητική ομάδα του Ritossa [180] και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins, Hsp's) πήραν την ονομασία τους από την αυξημένη σύνθεσή τους κατά την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας σε ζωντανά κύτταρα. Εκτός από τις συνθήκες θερμικού σοκ, τα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών επάγονται κάτω από συνθήκες στέρησης τροφής, οξειδωτικού στρες και καταστάσεων όπου προκαλείται μετουσίωση πρωτεϊνικών μορίων [181-184]. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ διαδραματίζουν σημαντικό κυτταροπροστατευτικό ρόλο, καθώς η κύρια λειτουργία που επιτελούν είναι η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας μιας πλειάδας πρωτεϊνικών μορίων [159, 185, 186]. Μεταξύ των αποτελεσμάτων της δράσης των πρωτεϊνών αυτών βρίσκονται η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και η ουβικουϊτίνωση πρωτεϊνικών μορίων που έχουν υποστεί δομική ή λειτουργική βλάβη, με επακόλουθη αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος, ενώ παράλληλα έχει διαπιστωθεί η έμμεση εμπλοκή τους στην κυτταρική σηματοδότηση, τον κυτταρικό κύκλο και τη ρύθμιση της κυτταρικής φυσιολογίας [185, 187].

Έχουν ταυτοποιηθεί επτά (7) μέλη της συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνικών μορίων, η Hsp10, η Hsp27, η Hsp40, η Hsp60, η Hsp70, η Hsp90 και η Hsp110, τα οποία έχουν λάβει το όνομά τους με βάση το μοριακό τους

βάρος και συνεισφέρουν στην προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης κάτω από συνθήκες στρες [183, 188-190].

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες, καθώς ενορχηστρώνουν τη σωστή τρισδιάστατη αναδίπλωση πρωτεϊνών στο χώρο, αποκαθιστώντας τη δομική και λειτουργική ακεραιότητά τους και απομακρύνοντας από το κυτταρόπλασμα μη λειτουργικές, ανώμαλες ισομορφές. Πολλές από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ εντοπίζονται σε μεγαλομοριακά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, συνδεόμενες με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, γνωστά ως πρωτεΐνες-«πελάτες» [187, 191, 192]. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο χώρο, αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου της κυτταρικής φυσιολογίας, το οποίο περιλαμβάνει μια διαδικασία αυτο-συναρμολόγησης, κατά την οποία η τριτοταγής δομή των πολυπεπτιδίων υπαγορεύεται από την πρωτοταγή αλληλουχία των επιμέρους αμινοξέων. Παρά το γεγονός ότι η πρωτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αποτελεί την ενδογενή δύναμη που υπαγορεύει τη στερεοδιαμόρφωσή της στο χώρο, τα περισσότερα πολυπεπτίδια θα αδυνατούσαν να λάβουν τη λειτουργική, τρισδιάστατη δομή τους μέσα στο συμπυκνωμένο και πολύπλοκο περιβάλλον του κυτταροπλάσματος, χωρίς τη βοήθεια των μοριακών συνοδών. Μια ποικιλία παραγόντων που επάγουν στρες, όπως οι υψηλές θερμοκρασίες, η στέρηση θρεπτικών συστατικών, η έλλειψη οξυγόνου, η συσσώρευση πρωτεϊνικών μορίων και βαρέων μετάλλων, κ.λπ., οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνικών μορίων που δεν αναδιπλώνονται σωστά στις τρεις (3) διαστάσεις, δημιουργώντας ενδοκυτταρικά συσσωματώματα [181-184]. Τα κύτταρα όλων των ιστών, όταν εκτεθούν σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, έχουν αναπτύξει έναν κυτταροπροστατευτικό μηχανισμό, ο οποίος διατηρεί τη σωστή στερεοδιαμόρφωση των επιμέρους μελών του πρωτεώματος, με τη δραματική αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ [184]. Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών-«πελατών» τους με διάφορους τρόπους, όπως είναι η σωστή τρισδιάστατη αναδίπλωσή τους στο κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, η διόρθωση ή αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν μερικώς μετουσιωθεί από διάφορους

παράγοντες περιβαλλοντικού στρες, ο έλεγχος των ρυθμιστικών πρωτεϊνών και η αναδίπλωση πρωτεϊνών που έχουν ελαττωματική διαμόρφωση στο χώρο [183, 184].

Οι Hsp70 και Hsp90 θεωρούνται οι κύριες μοριακές συνοδοί της συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών, οι οποίες είτε αλληλεπιδρούν άμεσα με τις νεοσυντιθέμενες, μη αναδιπλωμένες αλληλουχίες των πρωτεϊνών-«πελατών» τους (Hsp70), είτε διατηρούν την τρισδιάστατη δομή ώριμων πρωτεϊνών που βρίσκονται σε ανενεργή φάση (Hsp90) [185, 186]. Και οι δύο (2) πρωτεΐνες συμμετέχουν σε ένα μεγαλομοριακό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών ή τσαπερόσωμα (chaperosome), το οποίο περιέχει και κάποιες πρόσθετες πρωτεΐνες και συνοδευτικές ή συν-συνοδές (co-chaperones) πρωτεΐνες, που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ειδικότητα της σύνδεσης του συμπλόκου με τα αντίστοιχα υποστρώματα, τις πρωτεΐνες-«πελάτες» [191-193]. Μετά την απελευθέρωση των Hsp70 και Hsp90 από τις πρωτεΐνες-«πελάτες» τους, η διαδικασία της σωστής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στόχων ολοκληρώνεται με τη συμβολή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ Hsp60 και Hsp27, καθώς και μιας πλειάδας συνοδευτικών πρωτεϊνών [183, 190].

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων διαδραματίζεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με κάθε επιμέρους κυτταρικό διαμέρισμα να φέρει ειδικό υποσύνολο πρωτεϊνικών μοριακών συνοδών, ενώ μια ευρεία κλίμακα κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι η κυτταρική σηματοδότηση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και ο μιτωτικός πολλαπλασιασμός ελέγχονται από τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Έτσι, πιθανή απώλεια της ενεργότητας των Hsp μοριακών συνοδών, είτε με χημική είτε με γενετική παρέμβαση, θα είχε πιθανότατα ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση και επακόλουθη αποικοδόμηση μιας πλειάδας πρωτεϊνών-«πελατών» τους, με ταυτόσημη αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες αυτές εμπλέκονται [185, 187].

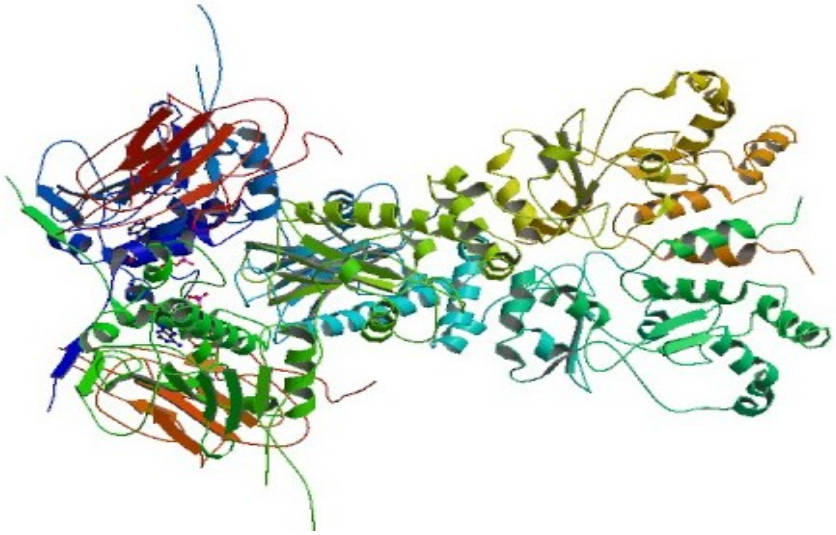
1.3.1 Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90 (Hsp90)

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Heat shock protein 90, Hsp90), εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε όλους τους τύπους κυττάρων, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αποτελώντας περίπου το 1-2% της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών του κυττάρου [186, 192, 194]. Κάτω από συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης, το ποσοστό έκφρασής της αυξάνει στο 4-6% [194, 195]. Η Hsp90 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη με διάφορα είδη πρωτεϊνών, υπό την ίδια πάντα ιδιότητα, αυτή της μοριακής συνοδού. Η Hsp90 λειτουργεί ως μέλος ενός συμπλόκου που μεσολαβεί στην ωρίμανση και τη σταθερότητα μιας ποικιλίας πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η μεταγωγή σήματος, αλλά και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ογκογένεση [183, 184]. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται και ως πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90 είναι υποδοχείς που φέρουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης (π.χ. οικογένεια υποδοχέων HER), πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση (κινάσες Akt, Raf-1 και IKKs), πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (π.χ. κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες Cdk4 και Cdk6), κ.λπ. [186]. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η Hsp90 με τις πρωτεΐνες-«πελάτες» συγκροτούν σύμπλοκα στα οποία συμμετέχουν και διάφορες βοηθητικές πρωτεΐνες, γνωστές ως συν-συνοδοί ή συνοδευτικές (co-chaperones), για να διατηρήσουν τις ενεργές στερεοδιατάξεις αυτών (των «πελατών») ή να προφυλάξουν τη δομική ακεραιότητά τους [196]. Η αναστολή της λειτουργίας της Hsp90 οδηγεί στη διάσπαση του ενεργού συμπλόκου των μοριακών συνοδών, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η σωστή τρισδιάστατη αναδίπλωση των πρωτεϊνών-«πελατών» στο χώρο. Με δεδομένο την υψηλή σημασία που παρουσιάζει η σωστή Hsp90 λειτουργία για το κύτταρο, αναμένεται η πιθανή φαρμακολογική αναστολή της ενδεχομένως να επηρεάσει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των επιμέρους πρωτεϊνών-πελατών»

της μοριακής συνοδού, γεγονός το οποίο έχει επαληθευτεί σε κάποια βιολογικά συστήματα [159].

1.3.1.1 Μοριακή ανατομία της Hsp90

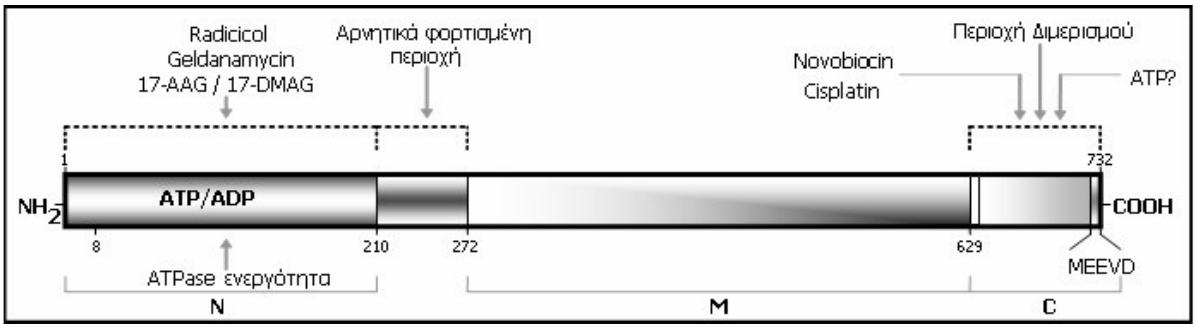
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η Hsp90 αντιπροσωπεύει περίπου το 2% του συνολικού κυτταρικού πρωτεώματος, ενώ κάτω από συνθήκες στρες, το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 4-6%. Το γεγονός αυτό καθιστά την Hsp90 μια από τις πλέον άφθονες πρωτεΐνες στο τυπικό ευκαρυωτικό πρωτέωμα [182, 192]. Η Hsp90 αποτελεί μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει ομολογία κατά 40% ανάμεσα σε ανθρώπους και την *Escherichia coli* (HtpG), και 60% ανάμεσα σε ανθρώπους και μύκητες [181]. Διαφορετικά είδη, όπως οι ζυμομύκητες και τα θηλαστικά, περιέχουν δύο (2) λειτουργικά Hsp90 γονίδια (με εξαίρεση τη *Drosophila*), τα οποία κωδικοποιούν για πανομοιότυπες ισομορφές, με μη διακριτές λειτουργικές διαφορές [159]. Η μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των ισομορφών της Hsp90 αφορά την έκφραση κάτω από συνθήκες στρες, κατά την οποία παρατηρείται ραγδαία αύξηση της κύριας ισομορφής Hsp90α, σε σχέση με την συστατική έκφραση της ελάσσονος ισομορφής Hsp90β [186].



Εικόνα 12: Κρυσταλλογραφική πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Hsp90) με τη συνοδό πρωτεΐνη p23 από την ερευνητική ομάδα των Ali *et al* [197].

Όλα τα μέλη της ομάδας των πρωτεϊνών Hsp90 (HtpG στην *Escherichia coli*, Hsc82 και Hsp82 στους μύκητες, Hsp83 στη *Drosophila*, Hsp84 και Hsp86 στον ποντικό, Hsp90α και Hsp90β στον άνθρωπο, Hsp75/Trap1 στο μιτοχόνδριο και το σύμπλοκο Grp94/Grp96 στο ενδοπλασματικό δίκτυο) έχουν κοινή δομή, η οποία πιθανόν αντανακλά την κοινή λειτουργική δράση της συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών [196, 198].

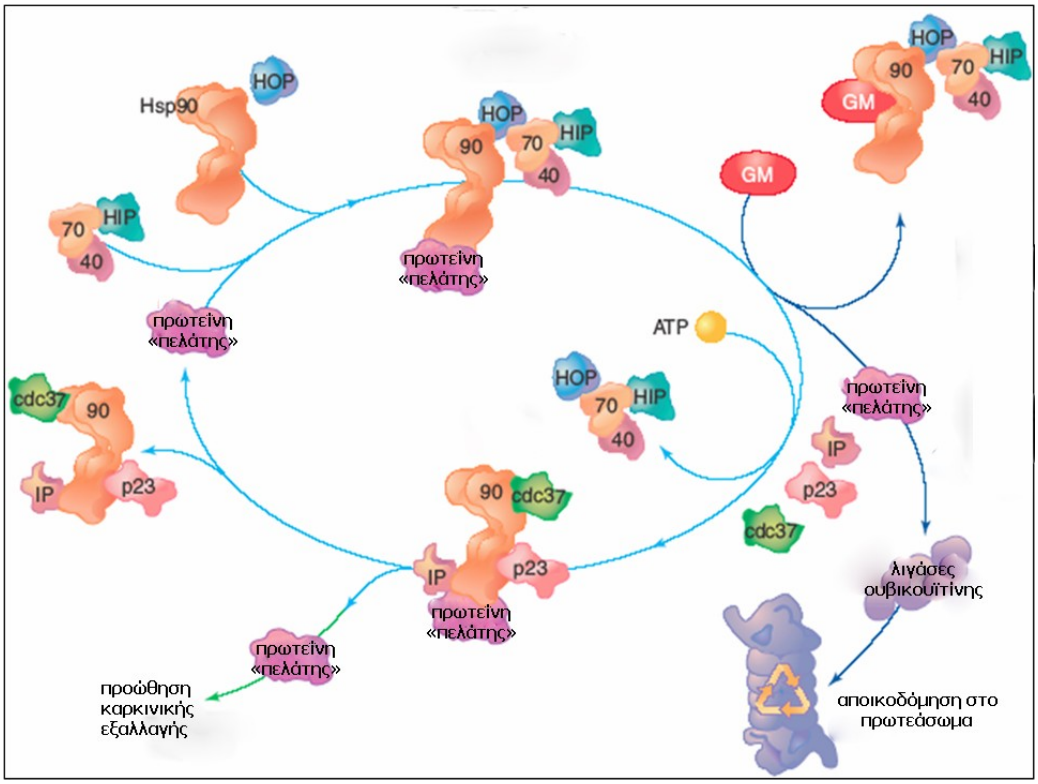
Η Hsp90 χαρακτηρίζεται από μια διακριτή αμινοτελική περιοχή (-NH_2), η οποία έχει μέγεθος ~24 kDa [199, 200]. Η περιοχή αυτή αποτελείται από περίπου διακόσια είκοσι (220) αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εμφανίζουν τόσο υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για το τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο ATP, όσο και ενεργότητα υδρόλυσης του ATP σε ADP (ενδογενή ενεργότητα ATPάσης) [201, 202]. Η ανάλυση της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του αμινοτελικού άκρου της Hsp90 αποκάλυψε την παρουσία οκτώ (8) αντιπαράλληλων βήτα φύλλων (β-sheet) και εννέα (9) άλφα ελίκων (α-helix), οι οποίες δημιουργούν ένα είδος α/β συμπλόκου τύπου «σάντουιτς» (Εικόνες 12 και 13) [199, 200, 203]. Η περιοχή πρόσδεσης του ATP, γνωστή και ως «Bergerat fold» (ένα δομικό μοτίβο το οποίο ανιχνεύεται στην GHKL υπεροικογένεια πρωτεϊνών), εντοπίζεται σε μια μοριακή «θήκη» μήκους 15 Å, όπου οι έλικες και οι θηλιές της πρωτεϊνικής αλυσίδας περιστοιχίζουν το μόριο-«προσδέτη», και το β-φύλλο βρίσκεται στην κάτω επιφάνεια [193, 196].



Εικόνα 13: Δομή του μορίου της Hsp90. Απεικονίζονται η αμινοτελική περιοχή η οποία φέρει ενεργότητα ATPάσης, η κεντρική περιοχή του μορίου, καθώς και η καρβοξυτελική περιοχή, στην οποία πραγματοποιείται ο διμερισμός. Επίσης, αναγράφονται οι περιοχές στις οποίες επιδρούν διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (ανάλογα τζελντανανμυκίνης, σισπλατίνη, κ.λπ.) [159].

Μια δεύτερη περιοχή πρόσδεσης ATP φαίνεται πως εντοπίζεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) της πρωτεΐνης, σε μια λοβοειδή δομή μοριακού βάρους περίπου 12 kDa, η οποία περιέχει και την περιοχή διμερισμού της Hsp90. Στη συγκεκριμένη περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου πραγματοποιείται η πρόσδεση των πρωτεϊνών-«πελατών», στην οποία οφείλονται και οι λειτουργικές ιδιότητες της Hsp90 ως μοριακής συνοδού [204, 205]. Με την εξαίρεση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ HtpG και Hsp75/Trap1, η πλειοψηφία των μελών της υποοικογένειας Hsp90 περιέχουν μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή, η οποία παρουσιάζει διαφοροποιήσεις, τόσο στην αμινοξική της σύσταση, όσο και στο μήκος της, και συνδέει την αμινοτελική περιοχή με την ενδιάμεση περιοχή, με μοριακό βάρος ~35 kDa [185, 190]. Η ενδιάμεση περιοχή παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της υδρόλυσης του τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου ATP, μέσω αλληλεπίδρασης με τις γ-φωσφορικές ομάδες των μορίων ATP που δεσμεύονται στην αμινοτελική «θήκη» της Hsp90 [191, 196]. Η απομονωμένη αμινοτελική περιοχή της Hsp90 παρουσιάζει χαμηλή ενδογενή ενεργότητα ATPάσης, η οποία ενισχύεται σημαντικά με τη συνεργιστική δράση των καρβοξυτελικών περιοχών του μορίου, γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες ελέγχουν τη χρήση των μορίων ATP από την Hsp90. Επιπλέον, έχει δειχθεί σε *in vitro* πειραματικές διαδικασίες ότι η υδρόλυση των μορίων ATP αυξάνεται κατακόρυφα με την πρόσδεση της συν-συνοδού πρωτεΐνης Aha1 (activator of Hsp90 ATPase homologue 1) στην Hsp90, ένα σύμπλοκο το οποίο πιθανόν προωθεί τη σταθεροποίηση των δύο (2) αμινοτελικών (-NH_2) περιοχών της διμερισμένης Hsp90 ή της αμινοτελικής περιοχής (-NH_2) με την ενδιάμεση περιοχή του μορίου. Η πρόσδεση μορίων ATP και η υδρόλυσή τους προωθούν το μοριακό κλείσιμο του διμερούς συμπλόκου της Hsp90, οδηγώντας το από την ανενεργή «ανοιχτή», στην «κλειστή» μορφή. Οι αμινοτελικές περιοχές παρουσιάζονται ως τα δύο (2) άκρα μιας «μέγκενης», τα οποία καθοδηγούν το άνοιγμα και το κλείσιμο του διμερούς με τρόπο εξαρτώμενο από το ATP. Η σταθερή περιοχή της μοριακής «μέγκενης» αποτελείται από τις περιοχές διμερισμού που εμπεριέχονται στα καρβοξυτελικά άκρα των πρωτεϊνικών μορίων της Hsp90. Οι εκτενείς

διαφοροποιήσεις της διαμόρφωσης της Hsp90 κατά τη διάρκεια του κύκλου της υδρόλυσης των μορίων ATP έχει θεωρηθεί πως συνδέονται με τις λειτουργικές ιδιότητες της Hsp90 [182, 192, 206-209].



Εικόνα 14: Κύκλος ενεργοποίησης της Hsp90. Η αναστολή της Hsp90 οδηγεί στην επίδραση λιγασών ουβικουϊτίνης και την επακόλουθη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης-«πελάτη» από το πρωτεάσωμα. Από την άλλη, ένα ενεργό σύμπλοκο συνοδού πρωτεΐνης Hsp90, οδηγεί στη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των πρωτεϊνών-«πελατών» του, γεγονός το οποίο, σε περιπτώσεις προϊόντων ογκογονιδίων, προωθεί την καρκινική εξαλλαγή. GM: τζελνταναμυκίνη, 40: Hsp40, IP: ανοσοφιλίνες, 90: Hsp90, 70: Hsp70, Hop: πρωτεΐνη οργάνωσης συμπλόκου Hsp70/Hsp90 (Hsp70/Hsp90 organizing protein), Hip: πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Hsp70 (Hsp70 interacting protein) [210].

Το σύμπλοκο της Hsp90 συναντάται με δύο (2) διαφορετικές στερεοδιατάξεις, την «ανοιχτή» (ανενεργή) και την «κλειστή» (ενεργή), μεταβαίνοντας από την μία στην άλλη με τον τρόπο που παρουσιάστηκε πιο πάνω. Στην «ανοιχτή» στερεοδιάταξη η πρωτεΐνη-«πελάτης» μεταφέρεται στην Hsp90 με τη βοήθεια των συν-συνοδών πρωτεϊνών, όπως είναι η Hsp70, Hsp40, Hop και Hip. Το σύμπλοκο αυτό, μέσω δέσμευσης και υδρόλυσης του ATP, μεταβαίνει στην «κλειστή» στερεοδομή, γνωστή και ως «ώριμη», στην

οποία η Cdc37 (εξειδικευμένη στη στρατολόγηση πρωτεϊνών με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης), η πρωτεΐνη p23 και οι ανοσοφιλίνες (immunophilins) αντικαθιστούν τις αρχικές συν-συνοδούς πρωτεΐνες και προκαλούν τη στερεοδιαταξική ωρίμανση της πρωτεΐνης-«πελάτη» και τη διατήρησή της στην ενεργή της μορφή ώστε να εκτελεί τη λειτουργία της [159, 210-212].

1.3.1.2 Σύμπλοκο Hsp90 - Συνοδευτικές πρωτεΐνες

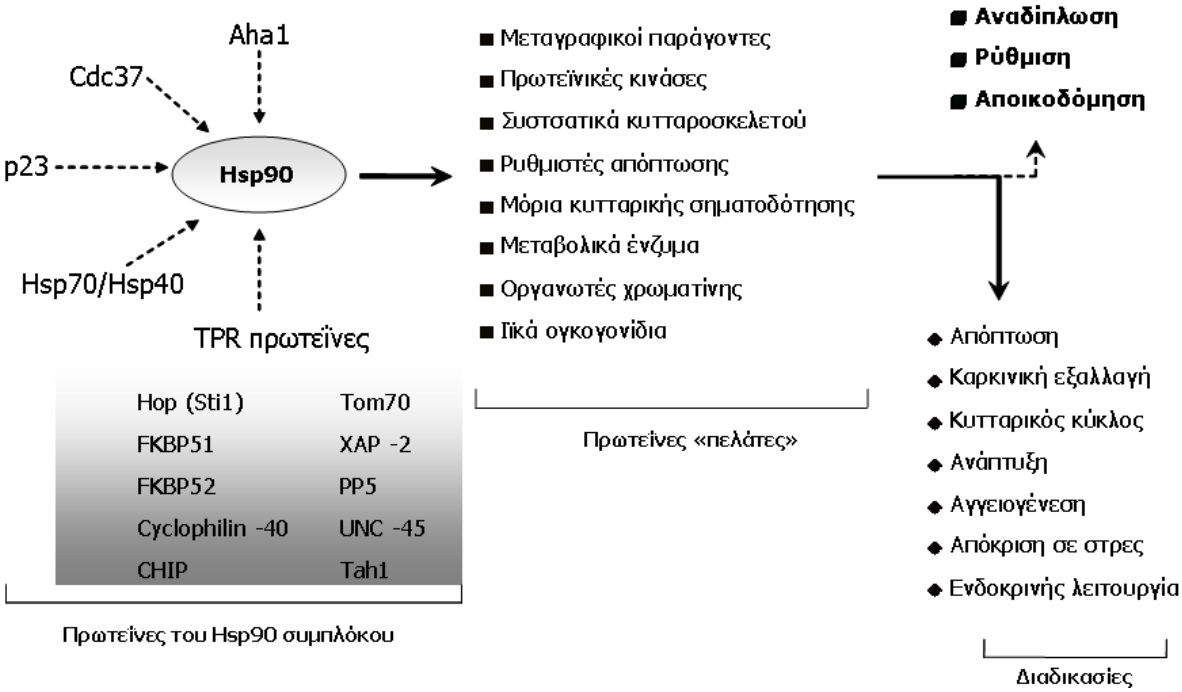
Τα μέλη του ευκαρυωτικού πρωτεώματος που αλληλεπιδρούν άμεσα με την Hsp90, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μορίων που απαριθμεί περισσότερες από εκατόν πενήντα (150) πρωτεΐνες, οι οποίες χωρίζονται σε δύο (2) διακριτές κατηγορίες: τις συνοδευτικές πρωτεΐνες (co-chaperones) και τις πρωτεΐνες-«πελάτες» [186]. Οι πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90 στηρίζονται στη λειτουργικότητα του συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών για να επιτευχθεί η σωστή αναδίπλωσή τους στο χώρο, η σταθερότητα και η πλήρης λειτουργικότητά τους, ενώ από την άλλη, οι συνοδευτικές πρωτεΐνες στηρίζουν την Hsp90 στη στόχευση και πρόσδεση των υποστρωμάτων της. Μια υποομάδα συνοδευτικών πρωτεϊνών χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων TPR περιοχών (tetratricopeptide repeats), οι οποίες αποτελούνται από τριάντα τέσσερα (34) αμινοξικά κατάλοιπα που επαναλαμβάνονται σε μια πεπτιδική αλυσίδα, και έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε μια ειδική αλληλουχία που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της Hsp90, το πενταπεπτίδιο MEEVD [213-215]. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης Hop (Sti1 στους μύκητες), των ανοσοφιλινών FKBP51 και FKBP52, της κυκλοφιλίνης-40, της E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης, της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 5 (PP5) και της πρωτεΐνης πρόσδεσης στην μυοσίνη (UNC-45), η αλληλουχία MEEVD είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στην Hsp90, αν και δευτερογενείς αλληλουχίες διαδραματίζουν επίσης ρόλο στη συγγένεια σύνδεσης της εκάστοτε συνοδευτικής πρωτεΐνης [191, 196]. Η παρουσία δύο (2) TPR περιοχών αμφίπλευρα, εντός του διμερούς της Hsp90, επιτρέπει τη δημιουργία μιας ευρέως διαφοροποιημένης σειράς συμπλόκων με διακριτές λειτουργικές ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό, κάθε σύμπλοκο συνοδών

πρωτεϊνών Hsp90 συμπεριλαμβάνει συνδυασμούς συνοδευτικών πρωτεϊνών, ανάλογα με το εκάστοτε υπόστρωμα, οι οποίες ρυθμίζουν τη δομική ακεραιότητα, την ωρίμανση και την ενεργότητα των υποστρωμάτων τους [159].

Η πρωτεΐνη Cdc37 (cell division cycle 37 homologue, γνωστή και ως p50, pp50 ή $p50^{cdc37}$) είναι ένα μόριο που προσδένεται στο ικρίωμα του συμπλόκου της Hsp90. Έχει μοριακό βάρος ~50 kDa και είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση και πρόσδεση διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών στο σύμπλοκο των συνοδών πρωτεϊνών. Αν και ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μέλος-«κλειδί» του συμπλόκου της Hsp90, μαζί με την πρωτεΐνη $pp60^{v\text{-}src}$ (Rous sarcoma virus-encoded oncogene), η Cdc37 έχει εντοπιστεί σε μια πληθώρα συμπλόκων με πρωτεϊνικά προϊόντα ογκογονιδίων που εμφανίζουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όπως η Raf-1 και η Cdk4 [216-218]. Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Hsp90-Cdc37 ανέδειξε την πρόσδεση συγκεκριμένης περιοχής (αμινοξικά κατάλοιπα 138-378) του καρβοξυτελικού τμήματος της Cdc37 με την αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης ATP της Hsp90. Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται με τη διείσδυση της πλευρικής αλυσίδας ενός καταλοίπου αργινίνης της θέσης 167 (R^{167}) στη θήκη πρόσδεσης του ATP στο μόριο της Hsp90, αναστέλλοντας τις αλλαγές στερεοδιαμόρφωσης της μοριακής συνοδού λόγω πρόσδεσης ATP, και εν κατακλείδι, αναστέλλοντας την ενεργότητα ATPάσης του μορίου [217, 219].

Η Cdc37 φαίνεται πως δρα συνεργιστικά με μια επιπλέον συνοδευτική πρωτεΐνη, την Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein, πρωτεΐνη οργάνωσης του συμπλόκου Hsp70/Hsp90), ώστε να ρυθμίζεται καλύτερα η ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνικών κινασών-«πελατών» της Hsp90 [220, 221]. Η πολυπλοκότητα και ο συνδυαστικός χαρακτήρας του συμπλόκου της Hsp90 φαίνεται από την εκλεκτική ικανότητα πρόσδεσης της Cdc37 στην μοριακή συνοδό με την παρουσία επιπλέον συνοδευτικών πρωτεϊνών όπως η Aha1, ενώ αυτή καθίσταται αδύνατη όταν συνδεδεμένη με το σύμπλοκο βρεθεί να είναι η πρωτεΐνη p23 [222, 223]. Η διαδικασία αποκλεισμού της Cdc37 από πρόσδεση στο σύμπλοκο συνδέεται με την ικανότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης να αναστέλλει τον επαγόμενο από ATP μηχανισμό «κλεισίματος»

του διμερούς της Hsp90, ενώ η p23 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο, μόνο όταν το διμερές βρίσκεται σε «κλειστή» κατάσταση. Η p23 είναι μια πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που φέρει ενδογενή ενεργότητα συνοδού πρωτεΐνης, η οποία αλληλεπιδρά ειδικά με την αμινοτελική περιοχή της Hsp90, με τρόπο εξαρτώμενο από ATP, και ανάλογα με το στάδιο του διμερισμού [197, 224]. Αν και ο ακριβής ρόλος της p23 δεν έχει ταυτοποιηθεί, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί σημαντικό κομμάτι των ώριμων συμπλόκων της Hsp90. Στον αντίποδα, η πρωτεΐνη Hop και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (Hsp70), εντοπίζονται κυρίως σε μη ώριμα σύμπλοκα της Hsp90 [225, 226].



Εικόνα 15: Συγκεντρωτικός πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που συναρμολογούν το ενεργό σύμπλοκο της Hsp90, οι διάφορες κατηγορίες πρωτεϊνών-«πελατών», καθώς και οι κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες αυτές εμπλέκονται [159].

1.3.2 Οι πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90

Η Hsp90, όπως αναφέρθηκε ήδη, είναι σημαντική πρωτεΐνη-συνοδός η οποία διατηρεί τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα μιας ποικιλίας πρωτεϊνικών μορίων, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως πρωτεΐνες–«πελάτες». Η ετερογενής λίστα των μορίων που υπόκεινται σε

δομική αναδίπλωση και λειτουργική ρύθμιση από την Hsp90 συνεχώς αυξάνει και ανανεώνεται, καθώς ολοένα και περισσότερες πρωτεΐνες-«πελάτες» ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται καθημερινά. Πλέον, ο αριθμός των πρωτεϊνών αυτών ξεπερνά τις διακόσιες (200), ενώ υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις για πάνω από τετρακόσια (400) πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν με τη συγκεκριμένη μοριακή συνοδό [159]. Η ποικιλία των πρωτεϊνικών μορίων που υφίστανται ρύθμιση από το σύμπλοκο συνοδών πρωτεϊνών της Hsp90 οδηγεί στην κατηγοριοποίησή τους με βάση το ρόλο τους στην κυτταρική φυσιολογία.

Με βάση τη λίστα που έχει καταρτίσει η ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Didier Picard (http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf), τα πρωτεϊνικά μόρια–«πελάτες» της Hsp90 είναι δυνατόν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες [182, 184-187, 192, 209, 226-228]:

- Πρωτεϊνικές κινάσες. Γνωστές πρωτεϊνικές κινάσες που συμμετέχουν στο πολύπλοκο δίκτυο της κυτταρικής σηματοδότησης αποτελούν «πελάτες» της Hsp90. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι, μεταξύ άλλων, η Akt, η Bcr-Abl, η ErbB2, η Raf-1, η Wee1, η JAK1, η MEK, οι κινάσες ΙκΒ, κ.λπ.
- Μεταγραφικοί παράγοντες. Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού πολλαπλών γονιδίων, τα οποία συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, βρίσκονται κάτω από τη λειτουργική ρύθμιση του συμπλόκου της Hsp90. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η μεταλλαγμένη p53, η Stat3 και ο HIF-1α.
- Υποδοχείς στεροειδών ορμονών, όπως είναι οι υποδοχείς των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, των ανδρογόνων, κ.λπ.
- Μέλη του κυτταροσκελετού, όπως είναι, μεταξύ άλλων, η τουμπουλίνη, η ακτίνη, η βιμεντίνη και η μυοσίνη, διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα με τη βοήθεια του συμπλόκου της Hsp90.
- Ρυθμιστές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η Survivin, το Bid και η πρωτεΐνη Apaf-1, οι οποίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου στα κύτταρα.

- Μόρια κυτταρικής σηματοδότησης, όπως είναι η καλμοντουλίνη, οι υπομονάδες των G-πρωτεϊνών Ga_0/Ga_{12}, ο υποδοχέας της προλακτίνης και η πρωτεΐνη Mdm2.
- Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της χρωματίνης, όπως κάποια μέλη των ιστονών, καθώς και η αποακετυλάση των ιστονών 6 (HDAC6).
- Πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του DNA όπως είναι οι τελομεράσες και η DNA πολυμεράση α.
- Ρυθμιστές του βασικού κυτταρικού μεταβολισμού, όπως είναι οι φωσφοϋδρολάσες.
- Μόρια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cdk's), η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb, κ.λπ.

Με βάση τα παραπάνω, καθίσταται προφανές ότι η λίστα των πρωτεϊνών των οποίων η δομική και λειτουργική ακεραιότητα εξαρτάται άμεσα από το σύμπλοκο της μοριακής συνοδού Hsp90 καλύπτει μια ετερογενή ποικιλία μορίων, που συμμετέχουν σε όλο το φάσμα των σηματοδοτικών κυτταρικών μηχανισμών, αναδεικνύοντας τον πολυανυσματικό ρόλο της Hsp90 στη διατήρηση της κυτταρικής φυσιολογίας. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες της κυτταρικής φυσιολογίας, οι οποίες αποτελούν γνωστούς «πελάτες» της Hsp90.

1.3.2.1 Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης

Υποδοχέας HER2 ($p185^{erbB2}$)

Πρόκειται για έναν υποδοχέα που φέρει ενδογενή ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος κάτω απο φυσιολογικές συνθήκες εμπλέκεται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Ο γενετικός τόπος *HER2/neu* (*ErbB2*) που κωδικοποιεί για τον μεμβρανικό υποδοχέα αποτελεί γνωστό πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο εδράζεται

στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17q21-q22) [229]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως ο υποδοχέας HER2 υπερεκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό κακοηθειών, όπως σ' εκείνον του μαστού (πάνω από 30% των όγκων), της ωοθήκης και του προστάτη, συνήθως συνδέεται με επανεμφάνιση της νόσου μετά από θεραπευτική αγωγή και κακή πρόγνωση για τον ασθενή [230]. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου *HER2* δεσμεύεται στην μοριακή συνοδό Hsp90 και στην αντίστοιχη ομόλογό της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την πρωτεΐνη Grp94, διατηρώντας τη δομική και λειτουργική ακεραιότητά του, καθώς μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη [230-232].

Υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών αποτελούν τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν σε μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης τα οποία εξαρτώνται από το σύμπλοκο συνοδών πρωτεϊνών της Hsp90 [233]. Παρά το γεγονός ότι η μοριακή συνοδός Hsp90 δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, η παρουσία της απαιτείται για την αναδίπλωση και τη διατήρηση του υποδοχέα στην ενεργή στερεοδιαμόρφωσή του, ώστε να διασφαλιστεί η πρόσδεση της εκάστοτε ορμόνης, η οποία ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι πιο σημαντικές υποκατηγορίες υποδοχέων στεροειδών ορμονών αποτελούν οι υποδοχείς των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, των ανδρογόνων και των γλυκοκορτικοειδών [233]. Ανάλογα με την υποκυτταρική κατανομή και τον μηχανισμό δράσης τους, οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών χωρίζονται σε δύο (2) τύπους, I και II. Μόνο οι υποδοχείς τύπου I συνδέονται με την Hsp90, η οποία διατηρεί τη δομική ακεραιότητά τους, ρυθμίζοντας τόσο την ικανότητα σύνδεσης των ορμονών-προσδετών με τους εν λόγω υποδοχείς, όσο και τη γονιδιακή ενεργοποίηση που φυσιολογικά προκαλεί η λειτουργική σύνδεση των ορμονών αυτών [233]. Πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν την υπερέκφραση στεροειδών ορμονών

σε κακοήθειες του μαστού [234], του προστάτη [235], του ενδομητρίου [236] κ.λπ.

1.3.2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες

Κινάση Akt

Η κινάση Akt διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις (3) γενετικοί τόποι της οικογένειας Akt που κωδικοποιούν για τις ισομορφές της πρωτεΐνης, *Akt1*, *Akt2* και *Akt3*. Η Akt1 κινάση εμπλέκεται σε διάφορα κυτταροπλασματικά μονοπάτια σηματοδότησης που αφορούν κυρίως την αποφυγή της ανάπτυξης αποπτωτικού φαινοτύπου, καθώς και την προώθηση της ανάπτυξης και την επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης [237]. Η ισομορφή Akt2 παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος του μονοπατιού της ινσουλίνης [238], ενώ ο ρόλος της Akt3 κινάσης δεν είναι ξεκάθαρος, αν και φαίνεται να παρουσιάζει υψηλά επίπεδα συστατικής έκφρασης στον εγκέφαλο [239]. Η Akt κινάση ρυθμίζει την επιβίωση και τον μεταβολισμό των κυττάρων, καθώς προσδένεται και ενεργοποιεί κατωρροϊκά πρωτεϊνικά μόρια, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 κ.λπ. [239]. Ερευνητικά δεδομένα εμπλέκουν την κινάση Akt με την καρκινική εξαλλαγή και την προώθηση της κακοήθειας, καθώς φέρεται να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να προωθεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, να προάγει τη διήθηση και την μετάσταση, και γενικά, να έχει ενεργή συμμετοχή στην επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογένεση [240]. Η συστατική ενεργοποίηση της Akt κινάσης αποτελεί μια από τις πιο συχνές τροποποιήσεις που παρατηρούνται σε ανθρώπινες κακοήθειες, καθώς απαντάται συχνά σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, του πολλαπλού μυελώματος κ.λπ. [240, 241].

Πρωτεϊνική κινάση Raf-1

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει ενεργά στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, μεταφέροντας το σήμα τόσο από διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όσο και από κυτταροπλασματικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες, σε μια ομάδα πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες ονομάζονται κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα ή MAP κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK) [242]. Η Raf-1 κινάση αποτελεί προϊόν του ογκογονιδίου *RAF1*, η οποία δεσμεύεται τόσο στο ώριμο σύμπλοκο της Hsp90, το οποίο περιλαμβάνει την πρωτεΐνη Cdc37, όσο και σε σύμπλοκα της μοριακής συνοδού όπου η Cdc37 απουσιάζει. Η σύνδεση αυτή σταθεροποιεί τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης Raf-1 και αναστέλλει την ουβικουϊτίνωσή της και την επακόλουθη αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα. Μεταλλαγές του γενετικού τόπου που κωδικοποιεί για τη Raf-1 κινάση και οδηγούν σε συστατική ενεργοποίηση του μορίου, ενορχηστρώνουν την μεταγραφική ενεργότητα μιας πλειάδας γενετικών τόπων μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των MAPK/Erk, οι οποίοι κωδικοποιούν για μόρια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την καρκινική εξαλλαγή και την κυτταρική κινητικότητα [242]. Μεταλλαγές που ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAPK παρατηρούνται σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων, όπως τον καρκίνο του δέρματος (27-70%), των ωοθηκών (~30%), του θυρεοειδή (36-53%), του παχέος εντέρου (5-22%) και του παγκρέατος (~33%) [243]. Οι μεταλλαγές του *Raf-1* αποτελούν την πλέον συχνή αλλαγή γενετικού τόπου στο μελάνωμα, με πάνω από 60% των όγκων υψηλού σταδίου να περιέχουν συστατικά ενεργή, μεταλλαγμένη πρωτεΐνη [244].

Σύμπλοκο κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4/κυκλίνης D

Το σύμπλοκο κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4/κυκλίνης D (Cyclin dependent kinase 4, Cdk4/Cyclin D) εμπλέκεται στην μετάβαση των κυττάρων από τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S, μέσω της

φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος pRb [217, 245-249]. Η πρωτεΐνη Cdc37 συγκροτεί μαζί με την κινάση Cdk4 πρωτεϊνικά σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους, στα οποία συμμετέχει και η μοριακή συνοδός Hsp90. Μεταλλαγές στους γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν για την Cdk4 και την κυκλίνη D1 οδηγούν σε απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, συνεισφέροντας στον άκρατο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνου [250-253].

Κινάσες του ΙκΒ

Οι κινάσες της πρωτεΐνης ΙκΒ (ΙκΒ kinases, ΙΚΚ) αποτελούν μια ομάδα μορίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ [254]. Είναι γνωστές πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90, η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των οποίων εξαρτάται άμεσα από την αρτιότητα της εν λόγω μοριακής συνοδού. Οι κινάσες της ΙκΒ συνθέτουν ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο 700-900 kDa, το οποίο αποτελείται κατά κύριο λόγο από τις ΙΚΚα (ή ΙΚΚ1), ΙΚΚβ (ή ΙΚΚ2) και τη ρυθμιστική υπομονάδα ΙΚΚγ (γνωστή και ως NEMO, NF-κB essential modulator) [254, 255]. Οι κινάσες ΙΚΚα και ΙΚΚβ αποτελούν τις καταλυτικές υπομονάδες του συμπλόκου και φέρουν ειδικά αμινοξικά μοτίβα απαραίτητα για τον ετεροδιμερισμό τους, τα οποία, συν τοις άλλοις, περιέχουν κατάλοιπα σερίνης, όπου πραγματοποιείται η ενεργοποίηση-φωσφορυλίωσή τους. Φωσφορυλίωση των κινασών της ΙκΒ οδηγεί στην κατωρροϊκή φωσφορυλίωση του μοριακού τους στόχου, της πρωτεΐνης ΙκΒ, και ενεργοποιεί την επακόλουθη απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον πυρήνα των κυττάρων [256]. Πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν τη συστατική ενεργοποίηση του μονοπατιού των ΙΚΚ κινασών σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων [257], καθώς ο NF-κΒ επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών γονιδίων τα οποία προωθούν την επιβίωση και την ανάπτυξη της κακοήθειας [256].

Πρωτεΐνη p210$^{bcr-abl}$

Η χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl είναι το αποτέλεσμα της αμοιβαίας ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ των μεγάλων βραχιόνων των χρωμοσωμάτων 9 και 22 [χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας, t (9;22) (q34;q11)] [187, 198, 258]. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μια κινάση με συστατικά απορρυθμισμένη ενεργότητα, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Chronic Myelogenous Leukemia, CML) [258]. Η ανίχνευση της συγκεκριμένης μεταλλαγής εντοπίζεται σε πάνω από 95% των περιπτώσεων της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, ενώ παρατηρείται και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες, όπως η οξεία λεμφοβλαστική και η οξεία μυελογενής λευχαιμία [258]. Η δομική και λειτουργική ακεραιότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συμπλόκου της Hsp90 μοριακής συνοδού. Πρέπει να σημειωθεί πως η χιμαιρική p210 είναι συστατικά ενεργοποιημένη και δεν απαιτεί επαγωγή από ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η p210 καθοδηγεί την ενεργοποίηση ενζυμικών μορίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, αυξάνοντας το μιτωτικό δυναμικό των εξαλλαγμένων κυττάρων. Επιπλέον, αναστέλλει την επιδιόρθωση του DNA, προκαλώντας γενετική αστάθεια, η οποία προάγει την καρκινική εξαλλαγή. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως καρκινικά κύτταρα που φέρουν τη συγκεκριμένη μεταλλαγή καθίστανται πιο ευαίσθητα σε συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, μετά την ευαισθητοποίηση με ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης [259].

1.3.2.3 Μεταγραφικοί παράγοντες

Μεταλλαγμένη p53

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εκτελεί την κύρια λειτουργία της στον πυρήνα των κυττάρων, λαμβάνοντας μηνύματα από την ανίχνευση γενετικών τροποποιήσεων στο DNA και επάγοντας την προσωρινή αναστολή του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα να προωθηθεί η επιδιόρθωση των

σχετικών βλαβών. Σε περίπτωση που η επιδιόρθωση των γενετικών αλλαγών που ανιχνεύτηκαν δεν είναι δυνατή, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), οδηγώντας στην απομάκρυνση των ελαττωματικών κυττάρων [260]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη p53 παρουσιάζεται μεταλλαγμένη, είτε απουσιάζει ολοσχερώς, σε ποσοστό που ξεπερνά το 50% των κακοηθειών του ανθρώπου [259, 261, 262]. Έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότερες μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης p53 απαιτούν την, έστω και παροδική, επαφή με το σύμπλοκο συνοδών πρωτεϊνών της Hsp90, ώστε να επιτευχθεί η τρισδιάστατη αναδίπλωσή τους στο χώρο [263, 264].

Παράγοντας επαγόμενος από υποξία 1α (Hypoxia-Inducible Factor 1α, HIF-1α)

Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος, όπως αποκαλύπτει το όνομά του, εμφανίζεται σε αυξημένα επίπεδα κάτω από συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, που παρουσιάζονται συχνά στο εσωτερικό περιβάλλον των όγκων [265, 266]. Έτσι λοιπόν, κάτω από συνθήκες υποξίας, επάγεται η πρωτεϊνική σύνθεση του συγκεκριμένου παράγοντα, ο οποίος με τη σειρά του ελέγχει την έκφραση πολλών γενετικών τόπων, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στην αυξημένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και γενικότερα στην πρόοδο της καρκινογένεσης, καθώς διαδραματίζουν κεντρικούς ρόλους σε μια σειρά κυτταρικών διαδικασιών, όπως είναι η αγγειογένεση, η μεταφορά γλυκόζης και η γλυκόλυση [266, 267]. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α εκφράζεται στην πλειοψηφία των μεταστάσεων και των όγκων προχωρημένου σταδίου και βρίσκεται σε στενή αλληλεπίδραση με την μοριακή συνοδό Hsp90 [265, 266].

Οικογένεια	Πρωτεΐνη	Οικογένεια	Πρωτεΐνη
Υποδοχείς στεροειδών ορμονών		Συστατικά κυτταροσκελετού	
	Υποδοχέας οιστρογόνων		Ακτίνη
	Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών		Τουμπουλίνη
	Υποδοχέας ανδρογόνων		Μυοσίνη
	Υποδοχέας προγεστερόνης		Βιμεντίνη
Μεταγραφικοί παράγοντες		Ρυθμιστές Απόπτωσης	
	Μεταλλαγμένη p53		Apaf-1
	Stat3		Bid
	HSF1		Survivin
	HIF1α	Μόρια σηματοδότησης	
Κινάσες			Καλμοντουλίνη
	Akt		Mdm2
	Bcr-Abl		Υποδοχέας προλακτίνης
	ErbB2		$Gα_0/Gα_{12}$
	ΙκΒα, β, γ και ε	Ρύθμιση χρωματίνης	
	JAK1		Ιστόνες H1, H2A, H2B, H3, H4
	MEKK1/MEKK5		HDAC6
	MEK	Μεταβολισμός DNA	DNA πολυμεράση α
	PDK-1		DNA ελικάσες
	Raf-1		Τελομεράση
	Wee1	Βασικός μεταβολισμός	
Έλεγχος μεταγραφής			Φωσφοϋδρολάση
	Σύμπλοκο amino-acyl-tRNA συνθετάσης		GST υπομονάδα 3

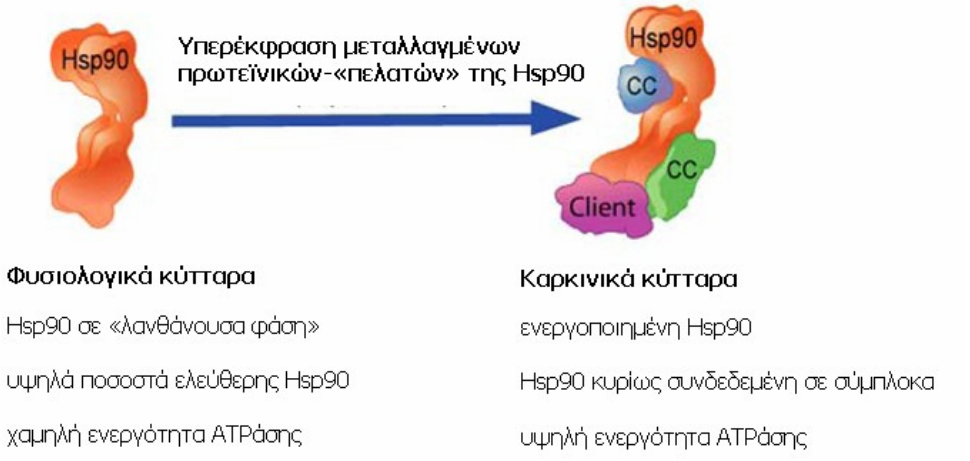
Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών-«πελατών» της Hsp90. Αναφέρονται κάποιες από τις κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται τα εκάστοτε πρωτεϊνικά μόρια [159].

1.3.3 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και καρκινογένεση

Οι κύριες λειτουργίες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι η σωστή στερεοδιαταξική αναδίπλωση των πρωτεϊνών-«πελατών» τους, για την προφύλαξη του πρωτεώματος από τη συσσώρευση πολυπεπτιδικών μορίων με ανώμαλη τρισδιάστατη δομή, καθώς και η σταθεροποίηση των πρωτεϊνών αυτών σε ιστούς που υπόκεινται στη δράση πρωτεωτοξικών παραγόντων (μετουσίωση μελών του πρωτεώματος), όπως είναι η αυξημένη θερμοκρασία, η παρουσία βαρέων μετάλλων, η έλλειψη οξυγόνου και η οξέωση, γεγονότα τα οποία αποτελούν προσαρμοστικές αποκρίσεις που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση [182, 196, 268]. Οι δύο (2) παραπάνω δράσεις των πρωτεϊνών θερμικού σοκ αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για τη βιωσιμότητα και τη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων [182, 183, 269]. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει την αυξημένη μεταγραφική έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σε διαφόρους τύπους κακοηθειών, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης κ.λπ. [269, 270]. Η αυξημένη έκφραση των μοριακών συνοδών που παρατηρείται κατά κανόνα σε κακοήθειες, αντανακλά τις προσπάθειες που καταβάλλουν τα εξαλλαγμένα κύτταρα ώστε να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους κάτω από πολύ δυσμενείς συνθήκες. Επιπλέον, φαίνεται πως εκτός από την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στο αντίξοο μικροπεριβάλλον τους, υπάρχουν ενδείξεις που συνηγορούν στο ρυθμιστικό ρόλο που φέρουν τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στις μεταβολές που προκύπτουν λόγω γενετικής αστάθειας.

Μεταλλαγές σε σημαντικά μόρια κυτταρικής σηματοδότησης, οι οποίες υπό άλλες συνθήκες θα αποδεικνύονταν μοιραίες για την κυτταρική επιβίωση, κάτω από τη δράση της μοριακής συνοδού Hsp90 σε εξαλλαγμένα κύτταρα, όχι μόνο δεν καθίστανται βλαβερές για την κυτταρική φυσιολογία, αλλά φαίνεται πως καθοδηγούν την καρκινική εξαλλαγή και την ογκογένεση [271]. Τέτοιες μεταβολές αφορούν γενετικούς τόπους που συνδέονται ισχυρά με την ανάπτυξη του καρκινικού φαινοτύπου, όπως είναι τα ογκογονίδια *v-Src*, *ErbB-2*, *Bcr-Abl*, *TP53*, κ.λπ. Η Hsp90 καθοδηγεί την εξέλιξη καρκινικών κλώνων

που φέρουν τέτοιες γενετικές μεταλλαγές, καθώς παρουσιάζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τα πρωτεϊνικά προϊόντα των ογκογονιδίων (κινάση v-Src, υποδοχέας ErbB-2, υβριδική κινάση Bcr-Abl, ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, κινάση Raf-1, κ.λπ.) [208, 228, 269, 271]. Ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν πως η Hsp90 αποτελεί πολύ σημαντικό μόριο στην ανάπτυξη όγκων, η εξαλλαγή των οποίων προέρχεται από την αναστολή των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, στο οποίο εντοπίζονται εκτεταμένες γενετικές τροποποιήσεις, που οδηγούν στην έκφραση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 17: Διαφοροποίηση της λειτουργικότητας του πρωτεϊνικού συμπλόκου της Hsp90 μοριακής συνοδού σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, όπως παρουσιάζεται από την ερευνητική ομάδα του Francis Burrows (Conforma Therapeutics Corporation, Η.Π.Α). Υποστηρίζεται η ενεργοποίηση του συμπλόκου Hsp90 σε καρκινικά κύτταρα, σε απόκριση της αυξημένης μεταγραφικής έκφρασης ογκογονιδίων ή μεταλλαγμένων γενετικών τόπων, αναδεικνύοντας τη λειτουργική κατάσταση της πρωτεΐνης ως το σημείο κλειδί της στοχευμένης χημειοθεραπείας (CC, co-chaperone: συνοδευτική πρωτεΐνη, Client: πρωτεΐνη-«πελάτης», πηγή: http://www.discoverymedicine.com/).

Με την ιδιότητα της μοριακής συνοδού, η Hsp90 μεσολαβεί στη συσσώρευση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας τη σωστή αναδίπλωση των «πελατών» της. Είναι λοιπόν προφανές πως οι μοριακές συνοδοί λειτουργούν ως ρυθμιστές της τελικής φαινοτυπικής έκφρασης μιας σειράς γενετικών βλαβών που απαντώνται σε διαφόρους τύπους καρκίνου [228]. Η εμπλοκή των πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90 σε

όλες τις φαινοτυπικές εκφράσεις-«ορόσημα» του καρκίνου [228, 272], αναδεικνύει τον κεντρικό ρόλο της μοριακής συνοδού στην ανάπτυξη της πολυσταδιακής και πολύπλοκης αυτής νόσου. Ο πολυανυσματικός λειτουργικός ρόλος της Hsp90 στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ογκογένεσης αποκαλύπτει την πιθανή εξάρτηση της φυσιολογίας των εξαλλαγμένων κυττάρων από την μοριακή συνοδό, καταδεικνύοντας τον άμεσο και έμμεσο (μέσω της λειτουργικής ακεραιότητας των ογκογονικών «πελατών» της) έλεγχο του νεοπλασματικού φαινοτύπου.

Με βάση την πλειάδα των πρωτεϊνικών πελατών της Hsp90, η αναστολή της μοριακής συνοδού ενδεχομένως να οδηγούσε σε αποτελεσματική κατάρρευση του πλέγματος κυτταρικής σηματοδότησης, που προάγει την καρκινική επιβίωση. Με βάση την ερευνητική μελέτη των Hanahan και Weinberg [273, 274], η γενετική αστάθεια των εξαλλαγμένων κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη έξι (6) χαρακτηριστικών, που αποτελούν ορόσημα της καρκινογένεσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

- η ενδογενής επάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες,
- η έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη,
- η αποφυγή της απόπτωσης,
- η αγγειογένεση,
- η διήθηση παρακείμενων ιστών και η μετάσταση, και
- το απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Η Hsp90 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση των συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του καρκινικού φαινοτύπου. Τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν κάτω από πολύ ισχυρές συνθήκες περιβαλλοντικού στρες, όπως η υποξία, η οξέωση κ.λπ. Το εξωγενές στρες οδηγεί στην ανάπτυξη ελεύθερων ριζών, οι οποίες δύναται να προκαλέσουν δυσάρεστες επιπτώσεις στο κυτταρικό πρωτέωμα. Δεδομένου του προστατευτικού ρόλου των μοριακών συνοδών σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες και την εξάρτηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών από το σύμπλοκο της Hsp90, είναι γεγονός ότι μόρια της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ εμφανίζουν αυξημένη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα [269, 275].

Η ανάδειξη της Hsp90 ως πρωτεϊνικού μορίου-«κλειδί» στη διατήρηση και την προώθηση του καρκίνου οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης χημικών ουσιών που αναστέλλουν τις ογκογονικές ιδιότητες της μοριακής συνοδού. Μέσα από πειραματικές δοκιμασίες ελέγχου υψηλής απόδοσης (high throughput screening) εντοπίστηκαν χημικές ενώσεις οι οποίες εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την Hsp90 και αναστέλλουν τη λειτουργικότητά της. Οι ουσίες αυτές αποτελούν είτε φυσικούς παράγοντες (π.χ. τζελνταναμυκίνη και ραντισικόλη), είτε κατηγορίες ημισυνθετικών (παράγωγα τζελνταναμυκίνης) και συνθετικών ενώσεων (purine scaffolds, ικριώματα πουρίνης κ.λπ.), οι οποίες προσδένονται στην Hsp90 και καταστέλλουν τις ιδιότητες της μοριακής συνοδού. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε μια συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών, οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αναστολής της Hsp90 σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινης ουροδόχου κύστης, διαφορετικού βαθμού κακοήθειας.

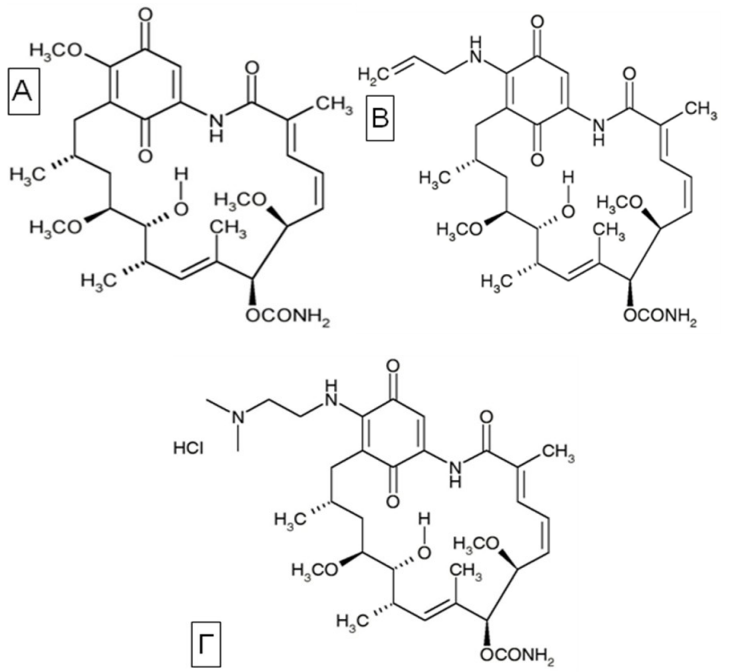
1.4 Αντιβιοτικά Ανσαμυκίνης τύπου Βενζοκινόνης (Benzoquinone Ansamycins BA)

Ο κεντρικός ρόλος της Hsp90 στην έναρξη και την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής και ο εθισμός των νεοπλασματικών κυττάρων σε πρωτεΐνες-«πελάτες» της μοριακής συνοδού και των ογκογονικών σηματοδοτικών μονοπατιών που αυτές συμμετέχουν, καθιστά τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη σημαντικό μόριο-«στόχο» της σύγχρονης χημειοθεραπείας [276]. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης Hsp90 αναστολής στην κυτταρική σηματοδότηση και τα αποτελέσματα αυτής στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, διαφορετικού βαθμού κακοήθειας.

Η λίστα των χημικών μορίων που αποτελούν *bona-fide* αναστολείς της μοριακής συνοδού Hsp90 είναι μεγάλη και μια συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών, οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης, στοχεύουν ειδικά το μόριο

της Hsp90 πρωτεΐνης [277, 278]. Οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης είναι αντιβιοτικά που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας αλειφατικής γέφυρας τύπου ansa, η οποία συνδέεται σε δύο (2) μη γειτονικές θέσεις ενός αρωματικού δακτυλίου βενζοκινόνης. Βασικός εκπρόσωπος της οικογένειας είναι η τζελνταναμυκίνη (Geldanamycin, GA), η οποία έχει βρεθεί πως προκαλεί ανάσχεση της σηματοδότησης κινασών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και έχει παρουσιάσει σημαντική αποτελεσματικότητα στην αναστροφή του καρκινικού φαινοτύπου κυτταρικών σειρών που είχαν υποστεί διαμόλυνση με το ογκογονίδιο $pp60^{v\text{-}src}$ [277, 279, 280].

Η τζελνταναμυκίνη απομονώθηκε από στελέχη του ακτινομύκητα *Streptomyces hygroscopicus* της ποικιλίας *geldanus* από την ερευνητική ομάδα του DeBoer, το 1976. Η παρουσία της συγκεκριμένης χημικής ένωσης είχε ανιχνευθεί λίγα χρόνια νωρίτερα (1970) από την ίδια ερευνητική ομάδα, στα μυκήλια και το θρεπτικό υλικό κάποιων στελεχών του μύκητα *Streptomyces* [281]. Περαιτέρω πειραματικές μελέτες έδειξαν πως η τζελνταναμυκίνη και οι υπόλοιπες μικρομοριακές ενώσεις της οικογένειας των ανσαμυκινών έχουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την πρωτεΐνη Hsp90. Με τη βοήθεια βιοχημικών (απομόνωση συγγένειας και καθαρισμός) και βιοφυσικών (συν-κρυστάλλωση και πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής) μεθόδων, αποκαλύφθηκε η ειδική πρόσδεση της τζελνταναμυκίνης στη θήκη πρόσδεσης μορίων ATP του αμινοτελικού άκρου ($-NH_2$) της πρωτεΐνης Hsp90 [282, 283]. Επακόλουθες μελέτες επιβεβαίωσαν την ειδική στόχευση της μοριακής συνοδού Hsp90 από άλλα μέλη της οικογένειας των ανσαμυκινών βενζοκινόνης. Η πρόσδεση των αντιβιοτικών αυτών στην Hsp90 οδηγεί σε αναστολή της δυνατότητας πρόσδεσης μορίων ATP, καθώς και της εξαρτώμενης από ATP ενεργοποίησης του συμπλόκου των συνοδών πρωτεϊνών [276].

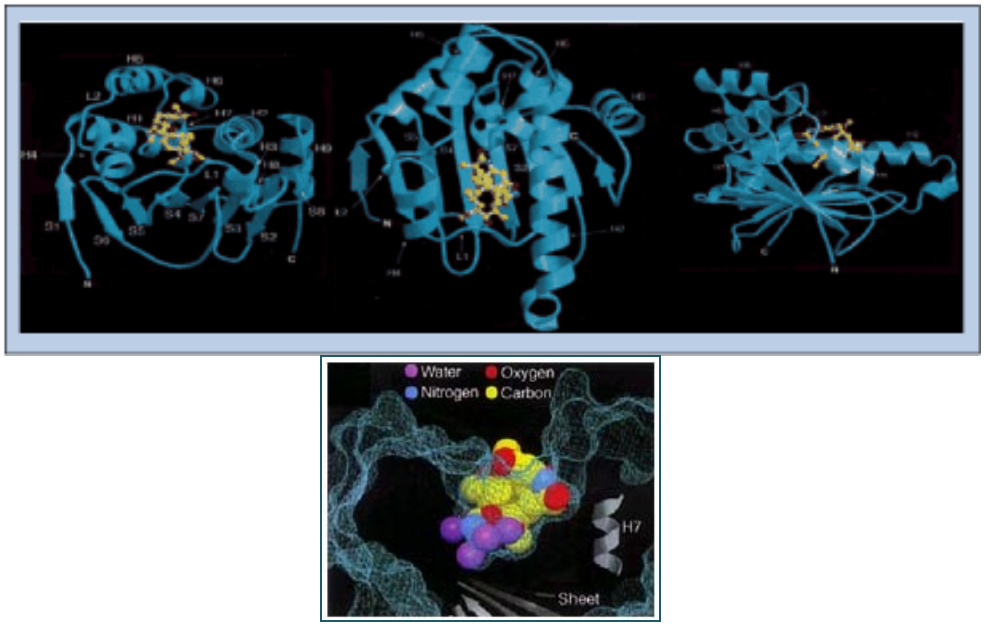


Εικόνα 16: Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι της ομάδας των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης: Α) Τζελνταναμυκίνη, Β) 17-AAG και Γ) 17-DMAG.

Το σύμπλοκο Hsp90-ανσαμυκίνης βενζοκινόνης παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα από το αντίστοιχο σύμπλοκο Hsp90-ATP, καθώς τα αντιβιοτικά ανσαμυκίνης μιμούνται εξαιρετικά τη στερεοδιαμόρφωση του τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου της αδενοσίνης (ATP) και παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης με την μοριακή συνοδό. Η συμπυκνωμένη, τύπου-C στερεοδιαμόρφωση που λαμβάνει η τζελνταναμυκίνη όταν προσδένεται στην Hsp90, σε αντίθεση με την εκτεταμένη, επίπεδη τρισδιάστατη δομή της ελεύθερης μορφής, πιθανόν να βρίσκεται σε συνάφεια με την εξαιρετική συγγένεια σύνδεσης των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης με την μοριακή συνοδό, όταν αυτή εντοπίζεται στο σύμπλοκο συνοδών πρωτεϊνών, παρά με την ελεύθερη μορφή της [208, 276]. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp82, η οποία εντοπίζεται σε μύκητες, και φέρει υψηλότερη ενεργότητα υδρόλυσης ATP συγκριτικά με τις Hsp's των ανώτερων οργανισμών, χρησιμοποιείται σε δοκιμασίες ελέγχου υψηλής απόδοσης (high throughput screening) για την ανακάλυψη και ταυτοποίηση νέων φαρμακευτικών παραγόντων που αναστέλλουν την ενδογενή ενεργότητα ATPάσης του μορίου της Hsp90.

Η κρυσταλλική δομή του ετεροσυμπλόκου της Hsp82 με τη τζελνταναμυκίνη αποκάλυψε ότι ο δακτύλιος κινόνης της ανσαμυκίνης δεσμεύεται σε μια περιοχή της Hsp90 πλούσια σε φωσφορικές ομάδες, όπου βρίσκεται η θήκη πρόσδεσης ATP, σχηματίζοντας πέντε (5) δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεϊνική αλυσίδα της μοριακής συνοδού. Η σταθερά διάστασης (K_d) της τζελνταναμυκίνης καθορίστηκε από τον Pearl και την ερευνητική του ομάδα στα 1,2 μM, ενώ έχει αναφερθεί πως τόσο το μόριο αυτό, όσο και τα συνθετικά του παράγωγα (17-AAG, 17-DMAG) παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα σε καρκινικά κύτταρα, της τάξης των nM [159, 283]. Το γεγονός αυτό πιθανόν αντανακλά τη διαφοροποιημένη ενεργότητα των συμπλόκων Hsp90 σε εξαλλαγμένα κύτταρα, σε σχέση με τα φυσιολογικά, καθώς και την εκλεκτική συσσώρευση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα και των μεταβολιτών του σε καρκινικά κύτταρα *in vivo* [284].

Παρά την ικανότητα της τζελνταναμυκίνης να αναστέλλει την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου, μελέτες τοξικότητας σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι η τζελνταναμυκίνη επιδεικνύει υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας, ενώ παράλληλα προκαλεί σημαντικές δυσλειτουργίες στο ήπαρ (αυξημένες συγκεντρώσεις τρανσαμινασών), αύξηση του ενζύμου της κρεατινικής φωσφοκινάσης, της γαλακτικής αφυδρογονάσης και του αζώτου της κυκλοφορίας, αποκλείοντας πιθανή χρήση του φαρμακευτικού παράγοντα στον άνθρωπο [285]. Η ηπατοτοξικότητα των συγκεκριμένων αντιβιοτικών έγκειται στην μεταβολική τροποποίηση των δακτυλίων βενζοκινόνης, καθώς ένα μόριο που έχει παρόμοιο πρότυπο δράσης, αλλά διαφορετική δομική στερεοδιαμόρφωση, η ραντισικόλη (radicicol), δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι του ήπατος [277, 285]. Έχει παρατηρηθεί πως η τζελνταναμυκίνη είναι δυνατόν να τύχει επεξεργασίας με τη χρήση αναγωγασών που εξαρτώνται από φλαβίνη, οι οποίες μετατρέπουν την κινόνη του μορίου σε ημι-κινόνη. Οι ημι-κινόνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας ελεύθερες ενώσεις υπεροξειδίου, οι οποίες επάγουν ισχυρή κυτταροτοξικότητα και οδηγούν στην ενεργοποίηση μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (όπως η απόπτωση και η αυτοφαγία), με τρόπους ανεξάρτητους από την αναστολή της Hsp90 [286, 287].



Εικόνα 17: Κρυσταλλογραφική τρισδιάστατη αναπαράσταση της πρόσδεσης ενός μορίου τζελνταναμυκίνης στην μοριακή συνοδό Hsp90. Επάνω, απεικονίζεται η θέση πρόσδεσης της τζελνταναμυκίνης (κίτρινο μόριο) στο μόριο της Hsp90 (μπλε δομή), ενώ κάτω φαίνεται η στενή συγγένεια σύνδεσης της τζελνταναμυκίνης [κεντρική δομή, με τα χρώματα να αντιστοιχούν στα επιμέρους μόρια που συγκροτούν τη χημική ένωση (κόκκινο-οξυγόνο, μπλε-άζωτο, μωβ-νερό και κίτρινο-άνθρακας)] με την ειδική θήκη πρόσδεσης του ATP, που εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή της μοριακής συνοδού [203].

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η σταθεροποίηση των δομών κινόνης και να ελεγχθούν οι τοξικές παρενέργειες, επιστημονικές ομάδες σε όλο τον κόσμο επιδόθηκαν στη χημική επεξεργασία του μορίου της τζελνταναμυκίνης, με την ενσωμάτωση χημικών ομάδων που αποδίδουν ηλεκτρόνια, στη θέση δεκαεπτά (17) του μορίου [272, 277, 279, 288]. Η πρώτη ημισυνθετική ένωση που παρασκευάστηκε είναι η 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) ή 17-αλλυλάμινο-17-διμεθόξυ-τζελνταναμυκίνη, η οποία αντί για μεθόξυ-ομάδα στη θέση δεκαεπτά (17), φέρει μια αλλυλάμινο-ομάδα. Η 17-AAG εμφανίζει υψηλή βιολογική ενεργότητα και δομική σταθερότητα, καθώς εμφανίζει ενισχυμένες όλες τις ανασταλτικές ιδιότητες του αρχικού αναστολέα (τζελνταναμυκίνη) [289]. Η αντικαρκινική δράση της 17-AAG έχει δειχθεί και σε ζωικά πειραματικά μοντέλα με τη χρήση αλλομοσχευμάτων (xenografts) [290]. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο ημισυνθετικό ανάλογο της τζελνταναμυκίνης συνεχίζει να παρουσιάζει

ορισμένα από τα μειονεκτήματα της μητρικής ένωσης, που αφορούν στη διαλυτότητά του μορίου στο νερό, την εξάρτηση της βιοδιαθεσιμότητας και ενεργότητας της ένωσης από οργανικούς διαλύτες (όπως είναι το DMSO), και την ανάπτυξη ηπατοτοξικότητας (αν και μειωμένη αισθητά σε σχέση με αυτή της τζελνταναμυκίνης) [277, 291].

Σε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των αναλόγων τζελνταναμυκίνης, επιστήμονες ανέπτυξαν ημισυνθετικές ενώσεις δεύτερης γενιάς, με την ενσωμάτωση μιας τριτογενούς αμινο-ομάδας στη θέση δεκαεπτά (17) του ικριώματος της ανσαμυκίνης. Ένα από τα σύγχρονα ημισυνθετικά ανάλογα που παρασκευάστηκαν είναι η 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin) ή 17-διμεθυλαμινο-αιθυλαμινο-17-διμεθοξυτζελνταναμυκίνη. Η ένωση 17-DMAG παρουσιάζει ενισχυμένη βιολογική ενεργότητα *in vitro* και *in vivo* σε βιολογικά συστήματα, σε σχέση με τη 17-AAG, καθώς εμφανίζει αυξημένη υδατοδιαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα [279, 280]. Τόσο η 17-AAG όσο και η 17-DMAG παρουσιάζουν ευρεία κατανομή σε ιστούς και όργανα, όμως μόνο η 17-DMAG δεν υφίσταται μεταβολική επεξεργασία που να την καθιστά ηπατοτοξική, όπως παρουσιάζουν προ-κλινικές δοκιμές σε ζωικά μοντέλα [292].

Το ένζυμο με την μεγαλύτερη επίδραση στον μεταβολισμό των ημισυνθετικών παραγώγων της τζελνταναμυκίνης είναι η οξειδοαναγωγάση 1 της NAD(P) κινόνης [NAD(P) quinone oxidoreductase 1, NQO1], που μεταβολίζει τη 17-AAG και τη 17-DMAG σε παράγωγα υδροκινόνης (17-AAGH_2 και 17-DMAGH_2 αντίστοιχα), και τα οποία εμφανίζουν αυξημένη δυνατότητα αναστολής της Hsp90, σε σχέση με το αρχικό μόριο [293]. Πέρα από τα ημισυνθετικά παράγωγα 17-AAG και 17-DMAG, έχουν παραχθεί περισσότερα από τριάντα τέσσερα (34) διαφορετικά ημισυνθετικά ανάλογα της τζελνταναμυκίνης, που αφορούν αλλαγές μόνο στη θέση δεκαεπτά (17). Μεταξύ αυτών, κάποια ημισυνθετικά παράγωγα της τζελνταναμυκίνης, όπως το IPI-504 (Infinity Pharmaceuticals, Η.Π.Α.) ή το CNF1010 (Conforma Therapeutics Corp., Η.Π.Α.), έχουν αναφερθεί πως παρουσιάζουν αυξημένη

αποτελεσματικότητα αναστολής της Hsp90, τουλάχιστον σε ορισμένα συστήματα [277, 294].

1.4.1 Ειδικότητα στόχευσης καρκινικών κυττάρων από τα ημισυνθετικά ανάλογα της τζελνταναμυκίνης

Η Hsp90 είναι μια μοριακή συνοδός, η οποία καταλαμβάνει σημαντικό ποσοστό του κυτταρικού πρωτεώματος. Παρά την υψηλή κυτταροπλασματική συγκέντρωση της Hsp90 ακόμα και σε φυσιολογικούς ιστούς, τα αντιβιοτικά ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης έχει παρατηρηθεί πως στοχεύουν εξαλλαγμένα κύτταρα με εξαιρετική ειδικότητα [208, 291]. Αναστολείς της μοριακής συνοδού έχει δειχθεί πως εμφανίζουν αυξημένη συγγένεια για την Hsp90 των καρκινικών κυττάρων, συγκριτικά με αυτή που απομονώνεται από φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Μια πρόσφατη υπόθεση εργασίας συνδέει τη θεραπευτική εξειδίκευση των αναστολέων της Hsp90 με την ύπαρξη συστατικά ενεργοποιημένης ισομορφής της μοριακής συνοδού σε καρκινικά κύτταρα, η οποία εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τα αντιβιοτικά ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, σε αντίθεση με την ανενεργή, χαμηλής συγγένειας για ανσαμυκίνες, Hsp90 των φυσιολογικών κυττάρων [228, 288]. Η υψηλή ενεργότητα της Hsp90 των καρκινικών κυττάρων πιθανολογείται πως οφείλεται στην αυξημένη παρουσία μεταλλαγμένων, ασταθών πρωτεϊνικών-«πελατών» της (βλέπε κεφάλαιο 1.3.3, Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και καρκινογένεση). Όπως έχουν καταδείξει πειραματικές μελέτες, πρωτεΐνη Hsp90 η οποία έχει απομονωθεί από πρωτεϊνικά σύμπλοκα εξαλλαγμένων κυττάρων παρουσιάζει περισσότερο από εκατό (>100) φορές μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης με το ημισυνθετικό ανάλογο 17-AAG, συγκριτικά με τις ισομορφές της Hsp90 που προέρχονται από φυσιολογικό ιστό σε *in vitro* πειραματικές διατάξεις [208, 284]. Αυτή η διαφορική σχέση ίσως εξηγείται από τις μεταβολές που διαμορφώνονται στη στερεοδομή της θήκης πρόσδεσης ATP των συμπλόκων της Hsp90 από τις συνοδευτικές πρωτεΐνες σε καρκινικά κύτταρα, καθώς λόγω της ολοκληρωτικής συμμετοχής της Hsp90 σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, αυτά ενδέχεται να παρουσιάζουν αυξημένη

ενεργότητα ATPάσης. Αντίθετα, μόρια Hsp90 που προέρχονται από φυσιολογικά κύτταρα, είναι δυνατό να παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση, εκτός πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων και επομένως να εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια σύνδεσης προς τα παράγωγα της τζελνταναμυκίνης [159, 208, 284].

Η ιδιότητα της Hsp90 να διατηρεί τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα πλειάδας πρωτεϊνικών κινασών και μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και η άμεση εξάρτηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων από τη συγκεκριμένη μοριακή συνοδό, αποτελεί το χαρακτηριστικό που προσπαθούν να εκμεταλλευθούν θεραπευτικές προσεγγίσεις με αντιβιοτικά ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, καθώς αναστολή της μοριακής συνοδού ενδέχεται να οδηγεί σε πολλαπλή ανάσχεση σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν την καρκινική εξαλλαγή [269, 295]. Η εξάρτηση των εξαλλαγμένων κυττάρων από την μοριακή συνοδό, η οποία οφείλεται τόσο στην ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον εντοπισμό της Hsp90 στη στερεοδιαταξική διαμόρφωση του συμπλόκου των συνοδών πρωτεϊνών, οδηγεί στην επιλεκτική συσσώρευση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στα εξαλλαγμένα κύτταρα του όγκου και την επακόλουθη αντιμετώπισή του.

Τα παραπάνω δεδομένα αναδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο που κατέχει η Hsp90 στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ογκογένεσης, καθιστώντας την φαρμακευτική αναστολή της συγκεκριμένης μοριακής συνοδού σημαντικό στοιχείο της σύγχρονης, στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης κατά του καρκίνου. Τόσο η τζελνταναμυκίνη, όσο και τα ημισυνθετικά ανάλογά της, αντιπροσωπευτικότερα παραδείγματα των οποίων αποτελούν τα 17-AAG και 17-DMAG, που χαρακτηρίζονται από βελτιωμένες φαρμακο-κινητικές ιδιότητες, φαρμακο-δυναμική συμπεριφορά και βιοδραστικότητα, συνθέτουν μια νέα πλατφόρμα πιθανής στοχευμένης χημειοθεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, η οποία μελετήθηκε εκτενώς στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής [296].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

2. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Αντικείμενο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της αναστολής της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Hsp90) από μέλη της οικογένειας αντιβιοτικών ανσαμυκίνης, τύπου βενζοκινόνης, χρησιμοποιώντας ως βιολογικό σύστημα καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας. Πιο συγκεκριμένα, ερευνητικοί στόχοι της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν:

- η κατανόηση των μηχανισμών ανταπόκρισης των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στην επίδραση του εκάστοτε υπό μελέτη χημειοθεραπευτικού παράγοντα, εν προκειμένω της τζελνταναμυκίνης (geldanamycin) και των ημισυνθετικών αναλόγων της, 17-AAG και 17-DMAG, καθώς και η διερεύνηση της στοχευμένης δράσης των συγκεκριμένων αναστολέων σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας και γενετικού υποβάθρου (π.χ. γενετικού τόπου *p53*). Επίσης, επιχειρήθηκε η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση της επίδρασης των τριών (3) συγκεκριμένων αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινης ουροδόχου κύστης (διαφορετικού βαθμού κακοήθειας).
- Η αξιολόγηση της δράσης των εν λόγω παραγόντων έναντι των ογκογονικών μονοπατιών σηματοδότησης που προωθούν παραμέτρους-ορόσημα του καρκινικού φαινοτύπου (hallmark traits of cancer), όπως την ενδογενή επάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες, την έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα που αναστέλλουν την ανάπτυξη, την αποφυγή των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου (π.χ. απόπτωση), την ανάπτυξη μηχανισμών διήθησης και μετάστασης κ.λπ.
- Η ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων καρκινικών δεικτών ενδεχομένως χρήσιμων για την πρόγνωση της νόσου και την επιλογή καταλληλότερης θεραπείας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. Υλικά και μέθοδοι

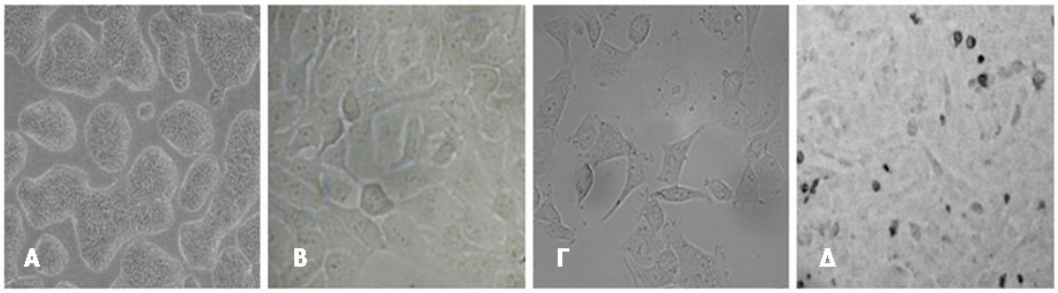
3.1 Βιολογικό Σύστημα

3.1.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης

Τα καρκινικά κύτταρα των θηλαστικών είναι δυνατό να καλλιεργηθούν μέσα σε τεχνητό θρεπτικό υλικό, με την προϋπόθεση ότι θα προσδεθούν σε στερεό υπόστρωμα (προσκόλληση στον πυθμένα φλασκών και τρυβλίων) και θα τους παρασχεθούν, στις κατάλληλες αναλογίες, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (πηγές άνθρακα, αζώτου, ιχνοστοιχεία κ.λπ.). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής είναι οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης RT4, RT112, T24 και TCCSUP. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από ανθρώπινο, διαφοροποιημένο μεταβατικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστης. Παρά το κοινό ιστολογικό υπόβαθρο, πρόκειται για καρκινικές κυτταρικές σειρές διαφορετικού βαθμού διαφοροποίησης και κακοήθειας, καθώς τα κύτταρα RT4 είναι βαθμού 1 (grade I), τα RT112 βαθμού 1→2 (grade I→II), τα T24 βαθμού 3 (grade III), ενώ τα TCCSUP είναι καρκινικά κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης, βαθμού κακοήθειας 4 (grade IV).

Τα κύτταρα RT4 είναι υψηλής διαφοροποίησης, καθώς διατηρούν πολλά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Πρόκειται στην ουσία για καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας και κατηγοριοποιούνται στη διαβάθμιση 1. Τα κύτταρα αυτά έχουν ρομβοειδές, πεπλατυσμένο σχήμα, ενώ τείνουν να σχηματίζουν δισδιάστατες δομές σε *in vitro* καλλιέργειες (Εικόνα 18). Τα RT4 κύτταρα φαίνεται πως διατάσσονται σε υποτυπώδεις νησίδες, οι οποίες εμφανίζουν μορφολογικές ομοιότητες με φυσιολογικούς ιστούς. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών σε καλλιέργεια είναι αρκετά χαμηλός, παρόμοιος με αυτόν των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων.

Τα RT112 είναι κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας (διαβάθμισης I→II), σχετικά υψηλής διαφοροποίησης και έχουν εξωτερική μορφολογία όμοια με αυτή των κυττάρων T24 (βλ. παρακάτω), αν και φαίνεται πως έχουν κοινά στοιχεία με τα κύτταρα RT4, καθώς σχηματίζουν και αυτά περίπλοκες δομές (νησίδες) σε *in vitro* καλλιέργειες (Εικόνα 18). Εμφανίζουν χαμηλό μιτωτικό δυναμικό καθώς, ενώ παρουσιάζουν ταχύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού από τα κύτταρα RT4, διαιρούνται πιο αργά σε σχέση με τα χαμηλής διαφοροποίησης εξαλλαγμένα T24 κύτταρα της ουροδόχου κύστης.



Εικόνα 18: Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης σε καλλιέργεια *in vitro* (μεγέθυνση x40, μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων). Α) Η κυτταρική σειρά υψηλής διαφοροποίησης RT4 (φυσικού τύπου p53), Β) η καρκινική κυτταρική σειρά ενδιάμεσης διαφοροποίησης RT112 (φυσικού τύπου p53), Γ) η καρκινική κυτταρική σειρά χαμηλής διαφοροποίησης T24 (μεταλλαγμένη p53) και Δ) η καρκινική κυτταρική σειρά χαμηλής διαφοροποίησης TCCSUP (μεταλλαγμένη p53).

Από την άλλη, τα κύτταρα T24 αποτελούν σειρά χαμηλής διαφοροποίησης, η μορφολογία των οποίων αποκλίνει πλήρως από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης. Μορφολογικά μοιάζουν με ινοβλάστες και παρουσιάζουν επίμηκες, ατρακτοειδές σχήμα. Σε *in vitro* καλλιέργειες, τα καρκινικά κύτταρα T24 δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους με σκοπό τη δημιουργία δισδιάστατων συσσωματωμάτων και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, με σχεδόν διπλάσιο ρυθμό από αυτό των κυττάρων RT4. Πρόκειται για καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας, πολύ επιθετικά και φέρουν υψηλό ενδογενές μεταστατικό δυναμικό.

Τα κύτταρα TCCSUP προέρχονται από καρκίνο του μεταβατικού ουροθηλίου και πρόκειται για κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας, καθώς

κατηγοριοποιούνται στον βαθμό IV. Πρόκειται για κύτταρα που μορφολογικά εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τα κύτταρα T24 (Εικόνα 18), έχουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και αποτελούν τους πλέον χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, με πολύ χαμηλή διαφοροποίηση, υψηλό διηθητικό δυναμικό και μεταστατικότητα.

3.1.2 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται και αναπτύσσονται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (NAPCO), στον οποίο διατηρείται σταθερή θερμοκρασία 37^{o}C, η ατμόσφαιρα περιέχει 5% CO_2 και η σχετική υγρασία προσμετράται στο 95%. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης της συγκεκριμένης διατριβής είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom AG, Γερμανία). Η σύσταση του πλήρους θρεπτικού υλικού τύπου DMEM 1X (τελικός όγκος 500 ml) είναι η εξής:

- Διάλυμα DMEM 10X 50 ml
- Διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS) 50 ml
- Διάλυμα L-Γλουταμίνης 10 ml
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 5 ml
- Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων 5 ml
- Διάλυμα άλατος όξινου διττανθρακικού νατρίου 28,5 ml
- Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου 5 ml
- Αποστειρωμένο H_2O ~350 ml

Το νερό που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του υλικού καλλιέργειας είναι συγκεκριμένης ωσμομοριακότητας (18,2 MΩ·cm) και πραγματοποιείται αποστείρωσή του σε θερμοκρασία 121^{o}C για τριάντα (30) λεπτά. Το διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS) απενεργοποιείται με την επώασή του σε θερμοκρασία 65^{o}C, για μισή ώρα (30 min). Η παρασκευή του υλικού

καλλιέργειας, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε συνθήκες πλήρους αποστείρωσης, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όπως περιγράφεται από τους Hayflick και Moorhead (1961) [297].



Εικόνα 19: Αριστερά, επωαστικός κλίβανος CO_2 διατήρησης κυττάρων. Στο μέσο, χαρακτηριστικός θάλαμος νηματικής ροής, και δεξιά, ανάστροφο μικροσκόπιο στο οποίο γίνεται παρατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργειες *in vitro*.

Τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης καλλιεργούνται κάτω από στείρες συνθήκες, σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας (Cellstar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.), μέσα σε θαλάμους επώασης. Όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας καλύπτουν περίπου το 80% του εμβαδού της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιείται ανακαλλιέργειά τους. Τα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης ανακαλλιεργούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα (ανάλογα με τον τύπο κυττάρου και το επιμέρους μιτωτικό δυναμικό) με τη βοήθεια διαλύματος θρυψίνης (L-2143, Trypsin/EDTA, Biochrom AG, Γερμανία), το οποίο καταστρέφει παροδικά τα μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των κυττάρων με το στέρεο υπόστρωμα της φλάσκας, επιτρέποντας να αιωρηθούν στο διάλυμα και να μοιραστούν σε περισσότερες της μιας θυγατρικές φλάσκες. Τα κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρώνται με ειδικό αιμοκυτταρόμετρο έτσι ώστε να μεταφέρεται στις θυγατρικές φλάσκες καλλιέργειας συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων, στη συγκέντρωση που απαιτείται κάθε φορά.

3.1.3 Φύλαξη καρκινικών κυττάρων – Κατάψυξη και απόψυξη

Η αποθήκευση των καρκινικών σειρών πραγματοποιείται με κατάψυξη των κυττάρων σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Δανία) και ακόλουθη μεταφορά τους σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, η οποία έχει φτάσει την απαιτούμενη πυκνότητα κυττάρων (~80%).
- Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη ποσότητας διαλύματος θρυψίνης (L-2143, Trypsin/EDTA, Biochrom AG, Γερμανία) και ακολουθεί επώαση για λίγα λεπτά στον κλίβανο των 37^{o}C.
- Πραγματοποιείται απενεργοποίηση της θρυψίνης με την προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 1X και ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 ml).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 rpm (στροφές/λεπτό), σε θερμοκρασία 4^{o}C για πέντε (5) λεπτά (ψυχόμενη φυγόκεντρος, Z323K, Hermle Labortechnik, Γερμανία).
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αφαίρεση του υπερκείμενου υλικού και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο (1 ml) θρεπτικού μέσου κατάψυξης.

Η χημική σύσταση του θρεπτικού υλικού κατάψυξης (τελικός όγκος 5 ml) είναι η παρακάτω:

- ✓ Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM 1X 3,5 ml
- ✓ Διάλυμα DMSO 0,5 ml
- ✓ Διάλυμα ορού εμβρύου βοός 1 ml

Αφού επαναιωρηθούν τα κύτταρα σε θρεπτικό μέσο κατάψυξης, μεταφέρονται σε ειδικό πλαστικό φιαλίδιο και από εκεί ακολουθεί η διαδικασία ψύξης τους, με ρυθμό ελάττωσης της θερμοκρασίας -1^{o}C ανά λεπτό, ως τη θερμοκρασία των -80^{o}C. Ο συγκεκριμένος ρυθμός ψύξης επιτυγχάνεται με τη

βοήθεια ειδικού δοχείου πολυ-αιθυλενίου, το οποίο περιέχει διάλυμα ισοπροπανόλης (100%, #33539, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Τα κύτταρα παραμένουν μέσα στο συγκεκριμένο δοχείο για τουλάχιστον 24 ώρες, εντός κατάψυξης -80^{o}C. Κατόπιν ακολουθεί μεταφορά τους σε φιάλες υγρού αζώτου για μακροχρόνια φύλαξη.

Από την άλλη, η διαδικασία της απόψυξης πραγματοποιείται ως εξής:

- Το ειδικό φιαλίδιο κατάψυξης μεταφέρεται γρήγορα από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία 37^{o}C και ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση.
- Αφού ολοκληρωθεί η απόψυξη και το περιεχόμενο του φιαλιδίου έχει έρθει σε υγρή κατάσταση, πραγματοποιείται μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon (15 ml) και προστίθεται ποσότητα φρέσκου υλικού DMEM 1X (5 ml).
- Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, στις 1000 rpm για πέντε (5) λεπτά, το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πέντε (5) ml φρέσκου, πλήρους υλικού DMEM 1X.
- Πραγματοποιείται νέα φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου, στις 1000 rpm για πέντε (5) λεπτά. Κατόπιν, το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πέντε (5) ml φρέσκου υλικού (DMEM 1X) και μεταφέρονται σε φλάσκα καλλιέργειας.
- Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά των κυττάρων στον επωαστικό θάλαμο και διατήρησή τους σε συνθήκες 37^{o}C και 5% CO_2**.**

3.1.4 Υλικά κυτταροκαλλιεργειών

Παρακάτω αναφέρονται τα επιμέρους υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη διατήρηση, ανακαλλιέργεια και φύλαξη των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, καθώς και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν:

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10X (DMEM 10X, F-0455, Biochrom AG, Γερμανία).

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MEM, χωρίς phenol red (F-0385, Biochrom AG, Γερμανία).
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (L-1613, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα L-Γλουταμίνης (L-Glutamine, K-0282, Biochrom AG, Γερμανία).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS, S-0115, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Penicillin/Streptomycin, A-2122, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων (Non-essential amino acids, K-0293, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα άλατος όξινου διττανθρακικού νατρίου (Sodium bicarbonate, L-1713, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου (Sodium pyruvate, L-0473, Biochrom AG, Γερμανία).
- Διάλυμα Trypsin/EDTA (L-2143, Biochrom AG, Γερμανία).
- DMSO (D8418, Sigma-Aldrich, Γερμανία)
- Αποστειρωμένες φλάσκες εμβαδού 25 και 75 τετραγωνικών εκατοστών (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 60 ή 100 χιλιοστών (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένες πιπέττες 1, 5, 10 και 25 ml (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένες πιπέττες τύπου Pasteur (CellStar, Greiner-Bio-one, Η.Π.Α).
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου Falcon 15 και 50 ml.
- Σωλήνες τύπου eppendorf (0,5 και 1,5 ml).
- Ειδικά φιαλίδια κατάψυξης κυττάρων (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Δανία).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής (αντιβιοτικά ανσαμυκίνης, τύπου βενζοκινόνης) αγοράστηκαν από την εταιρεία Cayla-Invivogen (Γαλλία) και οι επιμέρους κωδικοί των προϊόντων αναφέρονται παρακάτω:

- Τζελνταναμυκίνη (Geldanamycin, ant-gl-5, Cayla-Invivogen, Γαλλία).
- 17-αλλυλάμινο-17-διμεθόξυ-τζελνταναμυκίνη (17-AAG, ant-agl-5, Cayla-Invivogen Γαλλία).
- 17-διμεθυλάμινοαιθυλάμινο-17-διμεθόξυτζελνταναμυκίνη (17-DMAG, ant-dgl-5, Cayla-Invivogen Γαλλία).

3.2 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

3.2.1 Δοκιμασία FACS - Κυτταρομετρία ροής

Η δοκιμασία FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) αποτελεί μια εξειδικευμένη αντίδραση κυτταρομετρίας ροής, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ανάλυση των αλλαγών που επιφέρει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου η χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~0,8x10^6) ενοφθαλμίζονται σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 60mm) και επωάζονται στους 37^{o}C και 5% CO_2.
- 24 ώρες αργότερα, γίνεται η προσθήκη των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα μέσα στο υλικό καλλιέργειας (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM και 10 μM), ενώ για δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται τρυβλίο που δεν περιέχει το φαρμακευτικό σκεύασμα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, DMEM 1X).
- Με την πάροδο 24 ωρών, το υλικό καλλιέργειας αφαιρείται, τα κύτταρα ξεπλένονται με όγκο (5 ml) παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X (4^{o}C) και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon (15 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για πέντε (5) λεπτά και επαναιώρηση σε όγκο (5 ml) ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X.
- Το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται δύο (2) φορές.

Η χημική σύσταση και οι ποσότητες των επιμέρους συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10X αναφέρονται παρακάτω:

- ✓ NaCl 80 gr
- ✓ KCl 2 gr
- ✓ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 36,3 gr
- ✓ KH_2PO_4 2,4 gr
- ✓ ddH_2O 1.000 ml

Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί διήθηση σε ηθμό με διάμετρο πόρων 0,45 μm (#6780-2504, Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο) και αποστείρωση (μισή ώρα σε θερμοκρασία 121^oC). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το ίζημα (περιέχει τα κύτταρα) επαναιωρείται σε όγκο (1 ml) παγωμένου διαλύματος PBS 1X (4^oC) και προστίθεται ίσος όγκος παγωμένης (-20^oC) αιθανόλης (100%, #32221, Sigma-Aldrich, Γερμανία) υπό ελαφρά ανάδευση. Σε αυτό το σημείο τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν για μικρό χρονικό διάστημα στους 4^oC.
- Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 1200 rpm, για πέντε (5) λεπτά σε θερμοκρασία 4^oC. Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και επαναιώρηση των κυττάρων σε ειδικό διάλυμα χρώσης, το οποίο περιέχει ποσότητα ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide, P4864, Sigma Aldrich, Γερμανία) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (500 μl). Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάκια τύπου eppendorf.

Το διάλυμα χρώσης των κυττάρων περιέχει:

- ✓ διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (50 μg/ml τελική συγκέντρωση),
- ✓ ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7,5 (10 mM τελική συγκέντρωση),
- ✓ διάλυμα $MgCl_2$ (τελική συγκέντρωση 5 mM),
- ✓ διάλυμα RNAse A (τελική συγκέντρωση 10 μg/ml).

Αφού προστεθεί το διάλυμα χρώσης σε κάθε δείγμα, τα σωληνάκια τύπου eppendorf καλύπτονται με αλουμινόχαρτο, ώστε η επώαση που θα ακολουθήσει να πραγματοποιηθεί κάτω από συνθήκες σκότους.

- Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4^{o}C για τριάντα (30) λεπτά ώστε να επέλθει η χρώση.
- Τέλος, τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής με τη βοήθεια του μετρητή FACScalibur (Beckton Dickinson, Η.Π.Α.). Γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε ειδικούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί ανάδευση για την αποφυγή κυτταρικών συσσωματωμάτων. Η μέτρηση πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 542 nm και η περαιτέρω επεξεργασία των μετρήσεων γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ModFit.

3.3 Δοκιμασία MTT

3.3.1 Προσδιορισμός της μεταβολικής δραστηριότητας των μιτοχονδρίων

Η δοκιμασία MTT χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μεταβολικής δραστηριότητας των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε μια *in vitro* καλλιέργεια. Το MTT (3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) είναι μια κίτρινη χρωστική, άλας του τετραζολίου, το οποίο μετατρέπεται σε ένα αδιάλυτο, κρυσταλλικό, χρωματισμένο προϊόν φορμαζάνης (MTT-formazan) από τη σουκινική αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων. Η ένταση του μπλε χρώματος της συγκεκριμένης χημικής ένωσης, μετράται με ειδικό φωτόμετρο τύπου ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων είναι ανάλογη του αριθμού των ενεργών μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Σε ειδικές, αποστειρωμένες πλάκες 48 μικροβοθρίων στρογγυλού πυθμένα (48-well plates) μεταφέρονται 0,4x10^6 κύτταρα σε τελικό όγκο θρεπτικού μέσου 500 μl (κάθε δοκιμασία εκτελείται ταυτόχρονα σε τρία (3) τουλάχιστον μικροβοθρία για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της πειραματικής διαδικασίας).
- Την επόμενη ημέρα γίνεται προσθήκη όγκου (0,5 ml) διαλύματος θρεπτικού μέσου, το οποίο περιέχει τις συγκεντρώσεις του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM και 10 μM), ενώ για δείγματα αναφοράς χρησιμοποιούνται μικροβοθρία που δεν περιέχουν το φαρμακευτικό παράγοντα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας).
- Με το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση του φαρμάκου, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο υλικό με πιπέττα Pasteur.
- Στη συνέχεια προστίθεται όγκος (200 μl) διαλύματος MTT σε κάθε δείγμα.

Η χημική σύνθεση του διαλύματος MTT είναι η εξής:

✓ Θρεπτικό μέσο MEM (w/o phenol red)	18,98 ml
✓ Διάλυμα L-Γλουταμίνης	0,2 ml
✓ Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES	0,2 ml
✓ Διάλυμα πενικιλλίνης/στρεπτομυκίνης	0,2 ml
✓ Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων	0,2 ml
✓ Διάλυμα όξινου διττανθρακικού νατρίου	0,08 ml
✓ Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου	0,2 ml
➢ Τελικός όγκος διαλύματος	20 ml

Σε κάθε είκοσι (20) ml διαλύματος MTT προστίθενται δέκα (10) mg MTT σκόνη (#M5655, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση του διαλύματος και διήθηση μέσω ηθμού (πόροι διαμέτρου 0,45 μm). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4^oC, κάτω από συνθήκες σκότους.

- Οι πλάκες 48 μικροβοθρίων στρογγυλού πυθμένα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για τέσσερις (4) ώρες, στους 37^{o}C και 5% CO_2.
- Ακολούθως, αφαιρείται προσεκτικά το διάλυμα MTT από τις πλάκες με πιπέττα Gilson. Προστίθεται όγκος (200μl) διαλύματος ισοπροπανόλης (100%, #33539, Sigma-Aldrich, Γερμανία) σε κάθε βοθρίο.
- Στη συνέχεια, οι πλάκες ανακινούνται με ισχυρό κυκλικό πρότυπο ανάδευσης επί δεκαπέντε (15) λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί πλήρης ομογενοποίηση των κρυστάλλων.
- Πραγματοποιείται μεταφορά ίσων όγκων (100 μl) από το κάθε δείγμα σε αντίστοιχη πλάκα 96 μικροβοθρίων στρογγυλού πυθμένα και τελικά,
- ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) σε ειδικό φωτόμετρο τύπου ELISA (Dynatech MR500, Dynatech Laboratories, Η.Π.Α.). Μετράται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 550 nm, ενώ η οπτική απορρόφηση αναφοράς μετράται στα 630 nm.

3.4 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα

Η απομόνωση ολικού RNA από καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης πραγματοποιήθηκε με βάση την παρακάτω διαδικασία:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~0,8x10^{6}) ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (διαμέτρου 60mm) και επωάζονται στους 37^{o}C και 5% CO_2.
- Την επόμενη, γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού που περιέχει τις επιμέρους συγκεντρώσεις του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM και 10 μM), ενώ για δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM 1X).
- Με το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση του παράγοντα, αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό με πιπέττα Pasteur και προστίθεται σε κάθε

τρυβλίο όγκος (1 ml) διαλύματος TRIzol (TR-118, MRC Inc, Η.Π.Α.). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε (5) λεπτά.

- Γίνεται συλλογή των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου απόξεσης (Cell scrappers, #99003, TPP, Ελβετία), και μεταφορά τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου eppendorf. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για είκοσι (20) λεπτά.
- Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε δείγμα όγκος (0,2 ml) διαλύματος χλωροφορμίου (100%, Sigma-Aldrich, Γερμανία). Τότε, στο διάλυμα, δημιουργούνται δύο (2) φάσεις, με τις πρωτεΐνες να εντοπίζονται στην μεσόφαση και το RNA στην ανώτερη, διαυγή φάση. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για είκοσι (20) δευτερόλεπτα (με αναδευτήρα vortex) και επώαση για δεκαπέντε (15) λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12500 στροφές, στους 4^{o}C, για δεκαπέντε (15) λεπτά και το υπερκείμενο διάλυμα (450-500 μl) μεταφέρεται σε νέο, αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf.
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται όγκος (0,5 ml) διαλύματος ισοπροπανόλης (100%, #33539, Sigma-Aldrich, Γερμανία), το οποίο πραγματοποιεί την κατακρήμνιση του RNA. Τα δείγματα επωάζονται στους -20^{o}C, για δέκα (10) λεπτά.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12500 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για οκτώ (8) λεπτά. Ακολούθως γίνεται προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος και στο εναπομείναν ίζημα (RNA) προστίθεται όγκος (1 ml) διαλύματος αιθανόλης (75%, #32221, Sigma-Aldrich, Γερμανία).
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 8000 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για πέντε (5) λεπτά.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και το δείγμα αφήνεται στον πάγο για να στεγνώσει, επί δέκα (10) λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται όγκος (50-100 μl) υπερ-καθαρού νερού (DEPC treated H_2O, RNAse free) και ακολουθεί προσεκτική επαναιώρηση του RNA.

- Τα δείγματα τοποθετούνται για δέκα (10) λεπτά σε θερμοκρασία 55-60^{o}C ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το RNA. Γίνεται διεξοδική, αλλά προσεκτική ανάδευση των δειγμάτων με πιπέττες τύπου Gilson.
- Αποθήκευση των δειγμάτων σε θερμοκρασία -70^{o}C.

3.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT)

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής προστίθενται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf τα ακόλουθα:

- Ολικό RNA (1 μg) α μl
- Εκκινητής oligo(dT) (50 mM) 1 μl
- Διάλυμα dNTPs (10 mM) 1 μl
- Υπερκαθαρό H_2O (DEPC-H_2O) 10,5 - α μl

➢ Ενδιάμεσος όγκος 12,5 μl

Το κάθε δείγμα τοποθετείται για επώαση στους 65^{o}C επί πέντε (5) λεπτά. Μετά την αποδιάταξη του RNA, τα σωληνάκια τοποθετούνται αμέσως στον πάγο, ενώ σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, στον ήδη υπάρχοντα ενδιάμεσο όγκο, προστίθενται τα ακόλουθα (kit αντίστροφης μεταγραφής, #28025-013, Invitrogen, Γερμανία):

- 5X διάλυμα First Strand Buffer 4 μl
- Διάλυμα DTT (0,1 M) 2 μl
- Διάλυμα αναστολέα RNase OUT (40 U/μl) 0,5 μl
- Αντίστροφη Μεταγραφάση (MMLV-RT) (150 U/μl) 1 μl

➢ Τελικός όγκος 20,0 μl

Στη συνέχεια, το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37^{o}C για πενήντα (50) λεπτά και κατόπιν ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου σε θερμοκρασία 70^{o}C για δεκαπέντε (15) λεπτά. Τα δείγματα φυλάσσονται στην κατάψυξη (-30^{o}C).

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (πρότυπη αλληλουχία), με τη βοήθεια ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών [298, 299]. Η μέθοδος στηρίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου τριών (3) βημάτων, που περιλαμβάνει αρχικά την αποδιάταξη των μορίων του DNA κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (95^{o}C), στη συνέχεια την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA και τέλος την αντίδραση της επιμήκυνσης. Το ένζυμο που καταλύει τη συγκεκριμένη αντίδραση, η πολυμεράση Taq (ένζυμο το οποίο απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*), παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, οι αλληλουχίες DNA που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα προέρχονται από τις αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής (cDNA). Μέσω της ανάλυσης των σχετικών ποσοτήτων των προϊόντων της PCR, αποκτούμε ένα δείκτη της μεταγραφικής ενεργότητας συγκεκριμένων γενετικών τόπων στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας το γονίδιο της αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (*GAPDH*), του οποίου η μεταγραφική ενεργότητα παραμένει σταθερή, παρά τις διάφορες συγκεντρώσεις του εκάστοτε φαρμακευτικού παράγοντα που εφαρμόζεται επί των κυττάρων.

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκαν το πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3). Τα επιμέρους συστατικά προστίθενται σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf (0,2 ml), όπου πραγματοποιείται ήπια ανάδευσή τους με τη βοήθεια πιπέττας τύπου Gilson. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρεία Operon (Η.Π.Α), το διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP's) προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Invitrogen (#10297-018, Invitrogen, Γερμανία), ενώ την πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα εφοδιαστήκαμε

από την εταιρεία Kapa Biosystems Inc. (KapaTaq polymerase, KK1022, Kapa Biosystems Inc., Η.Π.Α.).

Υλικά	Συγκέντρωση	Ποσότητα
cDNA	100 ng	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	10 X	2,5 μl
Εκκινητής 1 (πρόσθιος)	10 pmol	1 μl
Εκκινητής 2 (ανάστροφος)	10 pmol	1 μl
Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	2,5 mM	0,5 μl
KapaTaq DNA Πολυμεράση	5U/μl	0,1 μl
Υπερκαθαρό νερό	---	18,9 μl

Πίνακας 3: Επιμέρους ποσότητες των συστατικών που απαρτίζουν μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το DNA που χρησιμοποιείται ως πρότυπη αλληλουχία προέρχεται από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (cDNA). Όλα τα επιμέρους συστατικά προστίθενται σε παγωμένο (4^oC) αποστειρωμένο σωλήνα τύπου eppendorf (0,2 ml) και μετά την προσθήκη του κάθε διαλύματος ακολουθεί ήπια ανάδευση με πιπέττα τύπου Gilson.

Ένα τυπικό παράδειγμα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων γενετικών τόπων από cDNA καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, καθώς και οι επιμέρους θερμοκρασίες και το χρονικό διάστημα εφαρμογής της κάθε θερμοκρασίας, παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Το προϊόν της εκάστοτε αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φυλάσσεται βραχυπρόθεσμα σε θερμοκρασία -20^oC. Η ανάλυση των PCR προϊόντων, η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους του παραγόμενου προϊόντος, καθώς και η ανίχνευση μεταβολών στην μεταγραφική ενεργότητα των γενετικών τόπων που ενισχύθηκαν, πραγματοποιείται κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (βλέπε πιο κάτω, κεφάλαιο 3.7).

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο		
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 3 min	
Αποδιάταξη cDNA (denaturation)	95°C για 30 sec	Αριθμός κύκλων αντίδρασης : 28-35
Πρόσδεση εκκινητών (annealing)	**(Ta°C)*** για 30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (extension)	72°C για **b**** min	
Τελική επέκταση	72°C για 10 min	

Πίνακας 4: Τυπικό παράδειγμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Απεικονίζονται τα επιμέρους στάδια της μεθόδου, οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, καθώς και το χρονικό διάστημα που διαρκεί κάθε στάδιο. ***Ta**: θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (Tm) αυτών. Συνήθως ισχύει Ta = Tm - 4°C. ** **b**: ο χρόνος που απαιτείται για την επέκταση των εκκινητών εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.

Στη συνέχεια, ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 5) στον οποίο παρατίθενται οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών (Operon, Η.Π.Α) που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, καθώς και οι επιμέρους θερμοκρασίες πρόσδεσης των εκκινητών, ο αριθμός κύκλων πολλαπλασιασμού και το μέγεθος του εκάστοτε παραγόμενου προϊόντος, σε ζεύγη βάσεων (bp).

Όνομα γονιδίου	**Ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητή**	**Θερμοκρασία υβριδισμού (Ta)**	**Κύκλοι**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
Cyclin D1	πρόσθιος: 5′-GTGTCCTACTTCAAATGTGTGC-3′	57	30	270
	ανάστροφος: 5′-GGAGTTGTCGGTGTAGATGC-3'			
Hsp90α	πρόσθιος: 5′-CCAAGATGCCTGAGGAAAC-3′	53	30	190
	ανάστροφος: 5′-TCATACCGGATTTTGTCCAAT-3'			
Hsp90β	πρόσθιος: 5′-TCCTTTTCTTTTCAAGATGCC-3′	54	30	215
	ανάστροφος: 5′-TGTCCAACTTCGAAGGGTCT-3′			
Survivin	πρόσθιος: 5′-GAGCTGCAGGTTCCTTATC-3′	53	30	427
	ανάστροφος: 5′-ACAGCATCGAGCCAAGTCAT-3′			

cIAP1	πρόσθιος: 5′-GCCTTTCTCCAAACCCTCTT-3′	55	29	356
	ανάστροφος: 5′-CATTCGAGCTGCATGTGTCT-3′			
cIAP2	πρόσθιος: 5′-CAGTGGATATTTCCGTGGCT-3′	57	30	245
	ανάστροφος: 5′-ATTTTCCACCACAGGCAAAG-3′			
XIAP	πρόσθιος: 5′-CAAGACCCTTGGGAACAACA-3′	55	30	225
	ανάστροφος: GTCCTTGAAACTGAACCCCA-3′			
GAPDH	πρόσθιος: 5′-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3′	55	28	189
	ανάστροφος: 5′-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3′			
Bcl-2	πρόσθιος: 5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′	55	30	222
	ανάστροφος: 5′-AGCAGAGTCTTCAGAGACAG-3′			
Bcl-X_L	πρόσθιος: 5′-CGGGCATTCAGTGACCTGAC-3′	57	30	340
	ανάστροφος: 5′-TCAGGAACCAGCGGTTGAAG-3′			
p53	πρόσθιος: 5′-GGGACGGAACAGCTTTGAGG-3′	59	30	240
	ανάστροφος: 5′-TTCAGCTCTCGGAACATCTCG-3′			
Bok	πρόσθιος: 5′-GATGAGCTGGAGATGATCCG-3′	57	30	199
	ανάστροφος: 5′-CCTGCCTCACACAGTCCAC-3′			
Mcl-1	πρόσθιος: 5′-TTGGTGCCTTTGTGGCTAAAC-3′	57	30	230
	ανάστροφος: 5′-TGCCAAACCAGCTCCTACTC-3′			

Πίνακας 5: Γονίδια τα οποία μελετήθηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής. Αναφέρεται το όνομα του γενετικού τόπου που μελετήθηκε, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του εκάστοτε γονιδίου, οι συνθήκες της αντίδρασης (αριθμός κύκλων και θερμοκρασία αναδιάταξης), καθώς και το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης.

3.7 Ηλεκτροφόρηση RNA και προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός μορίων RNA και DNA διαφορετικού μήκους πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η πυκνότητα του πηκτώματος που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος των τμημάτων του νουκλεϊκού οξέος που θέλουμε να διαχωριστούν. Γενικότερα ισχύει η παραδοχή ότι όσο μικρότερα σε μέγεθος τα τμήματα προς διαχωρισμό, τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης απαιτείται στο πήκτωμα. Το πήκτωμα επίσης, περιλαμβάνει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων και να επιτρέπει την ανίχνευση μορίων RNA και DNA, κάτω από ενεργοποίηση με υπεριώδη ακτινοβολία. Τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα μεταναστεύουν προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, κάτω από την επίδραση τάσης ηλεκτρικού ρεύματος (~80 Volt). Για το διαχωρισμό μορίων RNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης (#16500-500, Invitrogen, Γερμανία) συγκέντρωσης 1% και για το διαχωρισμό PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Πραγματοποιείται ανάμειξη αγαρόζης (~ 1,2 gr) με όγκο διαλύματος (60 ml) TBE 0,5X και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων έως την πλήρη ομογενοποίηση του διαλύματος.

Η σύσταση του αρχικού διαλύματος TBE 10X είναι η ακόλουθη:

- ✓ Tris-Base 108 gr
- ✓ Βορικό οξύ 55 gr
- ✓ Διάλυμα EDTA (0,5 M) 40 ml
- ✓ DEPC-H_2O 960 ml
- ➢ Τελικός όγκος 1000 ml

Το διάλυμα διηθείται με ηθμό (διάμετρος πόρων 0,45 μm) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνθήκες σκότους.

- Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί η σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας του.
- Ακολουθεί πρόσθεση όγκου (~20 μl) διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου, συγκέντρωσης 1 mg/ml και ανάδευση του διαλύματος.
- Πραγματοποιείται μεταφορά του διαλύματος αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (#B2300, Consort, Η.Π.Α.) και ακολουθεί εφαρμογή της ειδικής χτένας για τη δημιουργία των βοθρίων (πηγαδάκια) φόρτωσης των δειγμάτων. Η συσκευή διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως την πλήρη πήξη του διαλύματος.
- Κατόπιν ακολουθεί αφαίρεση της χτένας και προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X έως την πλήρη κάλυψη του πηκτώματος.
- Στην συνέχεια, γίνεται ανάμειξη κάθε δείγματος (9 μl) με όγκο (1 μl) διαλύματος φόρτωσης (Loading buffer, #A185, TaKaRa, Ιαπωνία) και ακολουθεί φόρτωση του μίγματος στα βοθρία του πηκτώματος.
- Ακολούθως, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με εφαρμογή τάσης 80-100 Volt.
- Το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή απεικόνισης με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας (Vilber Lourmat, Γαλλία) όπου πραγματοποιείται ανίχνευση των ζωνών που διαχωρίστηκαν και φωτογράφιση με τη βοήθεια ενσωματωμένης ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια της ηλεκτροφορητικής μεθόδου. Η ποσότητα του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά, ενώ η ποιοτική αξιολόγηση πραγματοποιείται με βάση την ακεραιότητα των ζωνών που διαχωρίζονται. Η απουσία «αλείμματος» (smear) από το πήκτωμα της αγαρόζης, υποδηλώνει ότι το απομονωμένο RNA είναι ικανοποιητικής ποιότητας και επομένως το παραγόμενο cDNA αντιπροσωπεύει πραγματικά τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας του ελεγχόμενου γονιδίου. Σε ότι αφορά την αξιολόγηση των προϊόντων PCR, η ποσοτική και ποιοτική διαφοροποίηση των επιμέρους ζωνών σε απόκριση των

φαρμακευτικών παραγόντων αποδίδει τις μεταβολές μεταγραφικής έκφρασης του γενετικού τόπου υπό μελέτη.

3.8 Χορήγηση IGF-I σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

Η διαδικασία χορήγησης του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα Ι (IGF-I) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης πραγματοποιήθηκε ώστε να εξακριβωθεί η λειτουργική ακεραιότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF-IR/Akt/IKKs, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές χαμηλής κακοήθειας, οι οποίες δεν παρουσιάζουν επίπεδα συστατικής ενεργοποίησης του μονοπατιού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~0,8x10^6) χαμηλού βαθμού κακοήθειας (RT4 και RT112) ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (διαμέτρου 60mm) και επωάζονται στους 37^{o}C και 5% CO_2.
- Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία και προστίθεται ποσότητα (4 ml) θρεπτικού υλικού το οποίο δεν περιέχει διάλυμα ορού βοός (FBS).

Η σύσταση του θρεπτικού υλικού το οποίο δεν περιέχει διάλυμα ορού βοός (FBS) που χρησιμοποιείται είναι η εξής:

- Διάλυμα DMEM 10X 5 ml
- Διάλυμα L-Γλουταμίνης 1 ml
- Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 0,5 ml
- Διάλυμα μη βασικών αμινοξέων 0,5 ml
- Διάλυμα άλατος όξινου διττανθρακικού νατρίου 2,5 ml
- Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου 0,5 ml
- Αποστειρωμένο H_2O ~40 ml
- ✓ Τελικός όγκος διαλύματος 50 ml

Η προσθήκη θρεπτικού διαλύματος που δεν περιέχει ορό εξυπηρετεί στην απαλλαγή των κυττάρων από εξωτερικά ερεθίσματα (starvation, «νηστεία», έκπλυση μιτογόνων παραγόντων), γεγονός το οποίο θέτει τη βάση για την ταυτοποίηση της IGF-I επαγόμενης ενεργοποίησης της σηματοδότησης, στις κυτταρικές σειρές χαμηλού βαθμού κακοήθειας.

- Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για χρονικό διάστημα δύο (2) ωρών (37^{o}C και 5% CO_2).
- Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό καλλιέργειας και πραγματοποιείται χορήγηση του αυξητικού παράγοντα IGF-I για χρονικά διαστήματα δεκαπέντε (15), τριάντα (30) και εξήντα (60) λεπτών. Η τελική συγκέντρωση του IGF-I είναι 30 ng/ml, σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει διάλυμα ορού βοός.
- Πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων στον κλίβανο (37^{o}C και 5% CO_2) για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα της χορήγησης του παράγοντα και στη συνέχεια ακολουθεί συλλογή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, όπως περιγράφεται παρακάτω (κεφάλαιο 3.9).

3.9 Συλλογή ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων

Η διαδικασία της συλλογής ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (4^{o}C) προς αποφυγή της πρωτεόλυσης των δειγμάτων. Επιπλέον, στα δείγματά μας προστέθηκε ποσότητα διαλύματος αναστολέα πρωτεασών (PMSF, #P2714, Sigma-Aldrich, Γερμανία), προκειμένου να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος.

Η διαδικασία της συλλογής ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Τρυβλία (60mm) που περιέχουν κύτταρα στα οποία έχει γίνει χορήγηση χημειοθεραπευτικού παράγοντα για 24 ώρες τοποθετούνται σε επιφάνεια η οποία έχει προηγουμένως καθαριστεί διεξοδικά με αιθανόλη. Με ειδικά εργαλεία (cell scrappers) γίνεται προσεκτικά απόξεση της επιφάνειας κάθε τρυβλίου, τα κύτταρα

μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon (15 ml) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για οκτώ (8) λεπτά σε θερμοκρασία 4^{o}C, στις 1500 rpm.

- Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα με πιπέττα τύπου Pasteur. Στο εναπομένον ίζημα, το οποίο περιέχει τα άθικτα κύτταρα, προστίθεται όγκος (5 ml) ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X (4^{o}C) και πραγματοποιείται καλή ανάδευση για επαναιώρηση των κυττάρων. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση για οκτώ (8) λεπτά σε θερμοκρασία 4^{o}C, στις 1500 rpm.
- Ακολούθως, αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα με πιπέττα τύπου Pasteur και προστίθεται όγκος (1ml) παγωμένου διαλύματος PBS 1X (4^{o}C) στο ίζημα. Πραγματοποιείται επαναιώρηση των κυττάρων με πιπέττα Gilson και το διάλυμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για δέκα (10) λεπτά σε θερμοκρασία 4^{o}C, στις 1500 rpm.
- Το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται δύο (2) φορές.
- Ακολουθεί προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο (4^{o}C).
- Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθεται όγκος (0,4-0,6 ml, ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων στο ίζημα) διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών (sample buffer), το οποίο είναι προθερμασμένο σε θερμοκρασία 100^{o}C. Πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων για επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος.

Η χημική σύσταση και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών του διαλύματος sample buffer (για τελικό όγκο 5 ml) παρατίθενται πιο κάτω:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 6,8 0,625 ml
- ✓ Διάλυμα γλυκερόλης (100%) 0,5 ml
- ✓ Διάλυμα SDS (20%) 1,5 ml
- ✓ Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0,25 ml
- ✓ Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0,625 ml

- ✓ DEPC-H_2O 1,5 ml
- ✓ Διάλυμα αναστολέα πρωτεασών (PMSF) 50 μl
- ➢ Τελικός όγκος 5 ml

Το διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών (sample buffer) παρασκευάζεται εκ νέου σε κάθε διαδικασία απομόνωσης κυτταρικών εκχυλισμάτων και η σύντομη φύλαξή του γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες σκότους.

- Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται για δύο (2) λεπτά σε θερμοκρασία 100^oC.
- Ακολουθεί εκχύλιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων με «ηχοβολισμό» (sonication), σε κατάλληλη συσκευή παραγωγής υπερήχων. Κάθε δείγμα «ηχοβολείται» για χρονικό διάστημα δέκα (10) δευτερολέπτων (δύο φορές).
- Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για τριάντα (30) λεπτά σε θερμοκρασία 25^oC, στις 12500 rpm. Κατόπιν γίνεται συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος και μεταφορά σε νέα, αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου eppendorf.
- Πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση των δειγμάτων για τριάντα (30) λεπτά σε θερμοκρασία 25^oC, στις 12500 rpm. Γίνεται συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος και μεταφορά σε νέα σωληνάκια τύπου eppendorf. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύονται με πιπέττα Gilson και ακολουθεί ο διαχωρισμός του διαλύματος σε επιμέρους δείγματα (aliquots), όγκου 50 μl.
- Η φύλαξη των δειγμάτων γίνεται σε θερμοκρασία -30^oC.

3.10 Ανίχνευση και μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών

3.10.1 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών

Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου τάσης

60-90 Volt. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου διαθέτει πόρους, το σχετικό μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο με την εκάστοτε συγκέντρωση ακρυλαμιδίου. Το γεγονός αυτό, καθιστά εφικτή τη δυνατότητα παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς ανίχνευση πρωτεϊνών. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται από δύο (2) τμήματα, το πήκτωμα συμπύκνωσης και το πήκτωμα διαχωρισμού. Στο πήκτωμα συμπύκνωσης διασφαλίζεται η ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδος των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα διαχωρισμού, στο οποίο, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους «τρέχουν» σε μεγαλύτερες αποστάσεις εντός του πηκτώματος σε δεδομένο χρονικό διάστημα καθώς μεταναστεύουν ταχύτερα ανάμεσα από τους πόρους του πολυακρυλαμιδίου. Οι επιμέρους συγκεντρώσεις και όγκοι των χημικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των πηκτωμάτων, παρατίθενται στον Πίνακα 6.

Χημικά συστατικά πηκτώματος διαχωρισμού	**πήκτωμα διαχωρισμού 10%**	**πήκτωμα διαχωρισμού 12,5%**	**πήκτωμα διαχωρισμού 15%**
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 8,9	5 ml	5 ml	5 ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου/ bis ακρυλαμιδίου (30:1)	6,65 ml	7,98 ml	9,97 ml
Διάλυμα SDS (10%)	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Διάλυμα APS (10%)	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
Διάλυμα TEMED	20 μl	20 μl	20 μl
H_2O	8 ml	6,65 ml	4,5 ml
Τελικός όγκος	20 ml	20 ml	20 ml

Πίνακας 6: Επιμέρους ποσότητες χημικών συστατικών που περιλαμβάνονται στα πηκτώματα διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 10, 12,5 και 15%.

Η διαδικασία διαχωρισμού μείγματος ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης είναι η ακόλουθη:

- Τα επιμέρους τμήματα της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.), πλένονται και αποστειρώνονται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Αφού στεγνώσουν τα διάφορα τμήματα (γυάλινες πλάκες, συσκευές στήριξης και ηλεκτροφόρησης), συναρμολογούμε τη συσκευή, μεταφέρουμε το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (10, 12,5 ή 15%) ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες ηλεκτροφόρησης και αφήνουμε το σύστημα σε θερμοκρασία δωματίου για δύο (2) περίπου ώρες, ώστε να στερεοποιηθεί το πήκτωμα.
- Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το διάλυμα πηκτώματος συμπύκνωσης (5%) πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και προσθέτουμε τα πλαστικά χτένια, τα οποία θα σχηματίσουν τα βοθρία στα οποία θα προστεθούν στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά δείγματα.

Χημικά συστατικά πηκτώματος συμπύκνωσης	**Πήκτωμα συμπύκνωσης 5% Ποσότητα**
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου/ bis ακρυλαμιδίου (30:1)	3,4 ml
Διάλυμα SDS (10%)	0,1 ml
Διάλυμα APS (10%)	0,4 ml
Διάλυμα TEMED	40 μl
H_2O	14 ml
Τελικός όγκος	20 ml

Πίνακας 7: Επιμέρους ποσότητες χημικών συστατικών που περιλαμβάνονται στο πήκτωμα συμπύκνωσης πολυακρυλαμιδίου 5%.

- Αφήνουμε τη συσκευή για δύο (2) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στερεοποιηθεί και το πήκτωμα συμπύκνωσης.

- Στη συνέχεια, αφαιρούνται τα κτένια από τη συσκευή και τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκρασία 100^{o}C, ώστε να βράσουν για πέντε (5) λεπτά. Ακολούθως, «φορτώνεται» ποσότητα από το εκάστοτε πρωτεϊνικό δείγμα σε κάθε βοθρίο, καθώς και διάλυμα δείκτη πρότυπων πρωτεϊνικών μοριακών βαρών (molecular weight marker, #SM0441, Fermentas, Γερμανία).
- Προσθέτουμε στη συσκευή ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1X) και εφαρμόζουμε τάση 60 Volt ώστε τα δείγματα να εισέλθουν στο πήκτωμα συμπύκνωσης και να «πακεταριστούν».

Η χημική σύσταση του αρχικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 10X), καθώς και οι επιμέρους ποσότητες που προστίθενται, είναι η εξής:

- ✓ Tris-Base 15,1 gr
- ✓ Γλυκίνη 93 gr
- ✓ Διάλυμα SDS 20% 25 ml
- ✓ H_2O ~475 ml

Συμπληρώνουμε στα 500 ml με αποστειρωμένο νερό και αναδεύουμε έως ότου το διάλυμα ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί διήθηση του δείγματος με ηθμό (διάμετρος πόρων 0,45 μm) και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.

- Με την πάροδο της ηλεκτροφόρησης και αφού το μέτωπο των δειγμάτων προσεγγίσει το όριο ανάμεσα στα δύο (2) πηκτώματα, εφαρμόζουμε τάση 90 Volt, ώστε να γίνει είσοδος των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ποικίλει ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό μελέτη πρωτεΐνης και της πυκνότητας του πηκτώματος διαχωρισμού.
- Τέλος, διακόπτουμε τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης όταν το μέτωπο των πρωτεϊνών φτάσει κοντά στο κατώτατο σημείο του πηκτώματος διαχωρισμού, ώστε να μην διαχυθούν οι πρωτεΐνες στο διάλυμα. Παράλληλα προετοιμαζόμαστε για την επακόλουθη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3.10.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Στη συνέχεια της διαδικασίας ανίχνευσης των επιπέδων συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων, πραγματοποιείται ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής διάταξης και κάτω από την επίδραση ηλεκτρικής τάσης (30 Volt). Η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνεχή ανάδευση και διαρκεί γύρω στις δώδεκα (12) ώρες. Παρακάτω, περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

- Τα επιμέρους στοιχεία της συσκευής μεταφοράς (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.), όπως το πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών και οι σπόγγοι, πλένονται διεξοδικά και ακολούθως εμβαπτίζονται σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer).

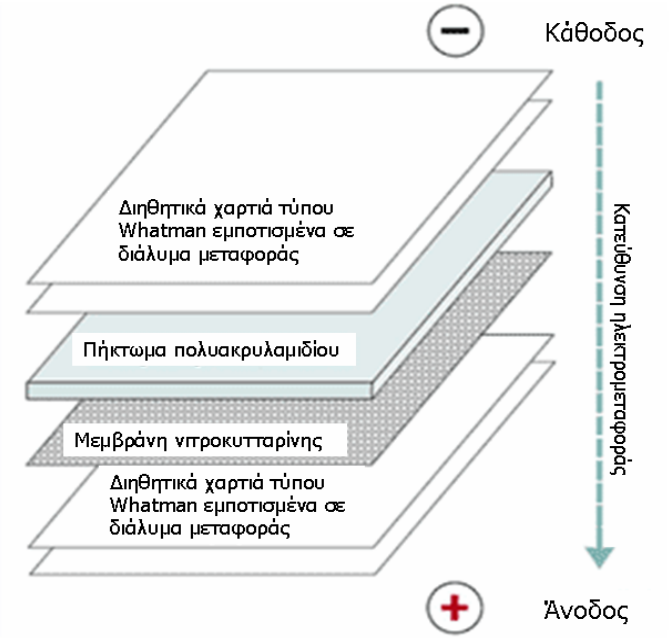
Η χημική σύνθεση του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς είναι η εξής:

- ✓ Tris-Base 3 gr
- ✓ Γλυκίνη 15 gr
- ✓ Μεθανόλη (100%) 200 ml
- ✓ H_2O ~800 ml
- ➢ Τελικός όγκος 1000 ml

Οι ποσότητες των επιμέρους συστατικών του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνθήκες σκότους.

- Δύο (2) χαρτιά τύπου Whatman εμβαπτίζονται στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και τοποθετούνται επάνω στο σπόγγο του πλέγματος μεταφοράς πρωτεϊνών.
- Στη συνέχεια, τοποθετούμε το πήκτωμα διαχωρισμού επάνω στο χαρτί τύπου Whatman και απομακρύνουμε τις όποιες ασυνέχειες

(φυσαλίδες) δημιουργούνται μεταξύ τους, ώστε να έρχονται σε άμεση επαφή σε ολόκληρο το εμβαδό τους.



Εικόνα 20: Διάταξη μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (λόγω SDS), απομακρυνόμενες από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου, μετακινούνται προς το θετικό πόλο και εντυπώνονται στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (πηγή: http://www.kollewin.com/blog/western-blotting/).

- Ακολούθως, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (#BA-85 Protran, Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο) εμποτίζεται με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και τοποθετείται επάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού με προσοχή.
- Στη συνέχεια, εμβαπτίζονται δυο (2) χαρτιά τύπου Whatman με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών και τοποθετούνται επάνω στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Ακολούθως, τοποθετείται και ο δεύτερος εμποτισμένος σπόγγος στο πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών.
- Ακολούθως, κλείνουμε προσεκτικά τη διάταξη και την μεταφέρουμε στο δοχείο ηλεκτρομεταφοράς, συμπληρώνοντας ποσότητα του ειδικού διαλύματος, ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών.

- Τέλος, προσαρμόζουμε το καπάκι της συσκευής στα ηλεκτρόδια του δοχείου (αρνητικός πόλος στην πλευρά της πηκτής) και εφαρμόζουμε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 30 Volt για περίπου δεκαέξι (16) ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και κάτω από συνεχή ανάδευση του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς.

3.10.3 Ανάλυση ανοσοστυπώματος Western

Στη συνέχεια της μεθόδου ανοσοεντοπισμού πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί υβριδισμός των αντιγονικών επιτόπων της υπό μελέτη πρωτεΐνης με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο εντοπίζει ειδικά το μέλος του κυτταρικού πρωτεώματος το οποίο σκοπεύουμε να ανιχνεύσουμε. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρείται προσεκτικά από το πλέγμα ηλεκτρομεταφοράς και τοποθετείται σε καθαρό, πλαστικό δοχείο. Ακολουθεί προσθήκη ειδικού διαλύματος έκπλυσης [διάλυμα TBS 1X το οποίο περιέχει 0,1% (v/v) απορρυπαντικό Tween-20 (#A4974, Applichem, Γερμανία), ή TBS-T]. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε θερμοκρασία δωματίου για δεκαπέντε (15) λεπτά, κάτω από συνθήκες συνεχούς ανάδευσης.

Η επιμέρους χημική σύσταση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος TBS (10X) είναι η εξής:

- Tris-Base 12,1 gr
- NaCl 40 gr
- H_2O 500 ml

Ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 7,6 με την προσθήκη διαλύματος (37% v/v) υδροχλωρικού οξέος (100317, Merk Chemicals, Darmstadt, Γερμανία), υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται (ηθμός με πόρους διαμέτρου 0,45 μm), και αποστειρώνεται σε ειδικό θάλαμο αποστείρωσης (121^oC για μισή ώρα). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Στη συνέχεια, αφού αφαιρεθεί το διάλυμα έκπλυσης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με ειδικό διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων [TBS-T το οποίο περιέχει 5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά]. Η μεμβράνη επωάζεται με το συγκεκριμένο διάλυμα για δύο (2) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και κάτω από συνεχή ανάδευση.
- Με το πέρας των δύο (2) ωρών επώασης, αφαιρείται το διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κλείνεται σε ειδική αποστειρωμένη σακούλα. Προστίθεται το διάλυμα του πρώτου αντισώματος σε αραίωση 1:1.000 (v/v) [TBS-T που περιέχει είτε 5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, είτε 5% (w/v) αλβουμίνη από ορό μοσχαριού, ανάλογα με τον τύπο του εκάστοτε αντισώματος]. Η μεμβράνη επωάζεται για δύο (2) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνεχή ανάδευση και ακολούθως μεταφέρεται σε θερμοκρασία 4^{o}C για να συνεχιστεί η επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας.
- Την επομένη, η μεμβράνη μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση συνεχίζεται για μια (1) ώρα.
- Το διάλυμα του πρώτου αντισώματος αφαιρείται και ακολουθούν έξι (6) πλύσεις διάρκειας δέκα (10) λεπτών η κάθε μια με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης (TBS-T).
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με ειδικό διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων [TBS-T το οποίο περιέχει 5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά]. Η επώαση διαρκεί μια (1) ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και κάτω από συνεχή ανάδευση.
- Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό αποστειρωμένο σακουλάκι και προστίθεται κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ειδικούς αντιγονικούς επιτόπους του πρώτου αντισώματος και είναι αραιωμένο στην ίδια ποσότητα διαλύματος. Η επώαση διαρκεί δύο (2) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από

συνεχή ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιείται κατά περίσταση [με ειδικότητα δέσμευσης έναντι του πρώτου αντισώματος που παρήχθη σε κουνέλι ή ποντικό, (anti-rabbit #A4914 ή anti-mouse #M6898 αντίστοιχα, Sigma-Aldrich, Γερμανία)], είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP) και χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:2000 (v/v) σε διάλυμα TBS-T το οποίο περιέχει 5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Η επώαση πραγματοποιείται για δύο (2) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνεχή ανάδευση.

- Στη συνέχεια, το διάλυμα που περιέχει το δεύτερο αντίσωμα αφαιρείται και ακολουθούν έξι (6) ξεπλύματα διάρκειας δέκα (10) λεπτών το κάθε ένα με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης (TBS-T).
- Ακολούθως, εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, GE Heathcare Life Sciences, Η.Π.Α.) με την προσθήκη διαλύματος λουμινόλης επί της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης. Το ένζυμο της υπεροξειδάσης καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, η οποία μεταπίπτει στη βασική της μορφή με παράλληλη εκπομπή φωτός.
- Οι μεμβράνες στις οποίες έχει προστεθεί λουμινόλη μεταφέρονται σε ειδική συσκευή ανίχνευσης της χημειοφωταύγειας (LAS 4000 Imager, Fujifilm Life Science, Η.Π.Α.), όπου πραγματοποιείται ο εντοπισμός των περιοχών που εκπέμπουν φωτισμό και αντιστοιχούν στις προς ανίχνευση πρωτεΐνες. Με τη βοήθεια ψυχόμενης (-30^{o}C) φωτογραφικής μηχανής CCD, που είναι συνδεδεμένη με την συσκευή, λαμβάνονται φωτογραφίες των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης, οι οποίες δύναται να τύχουν περαιτέρω επεξεργασίας με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού.

Ακολουθεί πίνακας που περιλαμβάνει το σύνολο των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, καθώς και στοιχεία που αφορούν την ειδικότητά τους, το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που ανιχνεύουν και την εταιρεία παραγωγής τους.

Πρώτο αντίσωμα έναντι αντιγονικού επιτόπου	Δεύτερο αντίσωμα εντοπισμού	Μοριακό βάρος ανιχνευόμενης πρωτεΐνης (kDa)	Εταιρεία	Κωδικός
Caspase-8	κουνέλι	57, 43, 41 και 18	Cell Signaling	9746
Caspase-9	κουνέλι	47, 37, 35 και 17	Cell Signaling	9502
Caspase-3	ποντικός	35, 19 και 17	Cell Signaling	9662
PARP	κουνέλι	116, 89 και 24	Cell Signaling	9542
Lamin A/C	κουνέλι	70 και 28	Cell Signaling	2032
Akt	κουνέλι	60	Cell Signaling	9272
phospho-Akt (Thr308)	κουνέλι	60	Cell Signaling	4056
phospho-Akt (Ser473)	κουνέλι	60	Cell Signaling	9271
IGF-IRα	κουνέλι	95	Cell Signaling	3022
phospho-IGF-IRβ (Tyr1131)	κουνέλι	95	Cell Signaling	3021
IKKα	κουνέλι	85	Cell Signaling	2682
IKKβ	κουνέλι	87	Cell Signaling	2684
phospho-IKKα/β (Ser180/Ser181)	κουνέλι	87 και 85	Cell Signaling	2681
NF-κB	ποντικός	65	Santa Cruz Biotechnology	sc-8008
IκBα	ποντικός	35-41	Santa Cruz Biotechnology	sc-1643
pan-Actin	ποντικός	41	Sigma-Aldrich	A 5060
pan-Actin	κουνέλι	45	Cell Signaling	4968
α-Tubulin	κουνέλι	52	Cell Signaling	2144
β3-Tubulin	ποντικός	55	Promega	C712A
total Tubulin	κουνέλι	55	Sigma-Aldrich	T 3526
acetylated Tubulin	ποντικός	55	Sigma-Aldrich	T 6793
c-Met	ποντικός	145	Cell Signaling	3127
phospho-c-Met (Tyr1234/Tyr1235)	κουνέλι	145	Cell Signaling	3129
p44/42	κουνέλι	44 και 42	Cell Signaling	9102
phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	κουνέλι	44 και 42	Cell Signaling	4377
Cdk4	ποντικός	34	Santa Cruz Biotechnology	sc-260
Hsp90	ποντικός	90	Santa Cruz Biotechnology	sc-13119
Hsp70	ποντικός	70	Santa Cruz Biotechnology	sc-24

Rb	ποντικός	110 και 106	Santa Cruz Biotechnology	sc-102
E2F1	ποντικός	68	Santa Cruz Biotechnology	sc-251
CHIP	κουνέλι	32	Cell Signaling	2080
FOXO1/FOXO4	κουνέλι	82, 78, 70 και 68	Cell Signaling	9462
phospho-FOXO3 (Thr32) phospho-FOXO1(Thr24)	κουνέλι	95, 82 και 78	Cell Signaling	9464
phospho FOXO1 (Ser256)	κουνέλι	82	Cell Signaling	9461
HDAC6	κουνέλι	134	Cell Signaling	2162
Ezrin-Radixin-Moesin	κουνέλι	80 και 75	Cell Signaling	3142
phospho-Ezrin (Thr567) phospho-Radixin(Thr564) phospho-Moesin (Thr558)	κουνέλι	80 και 75	Cell Signaling	3149

Πίνακας 8: Κατάλογος πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής. Απεικονίζεται η ειδικότητα του δεύτερου αντισώματος για την ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης και το εκάστοτε μοριακό βάρος της τελευταίας. Επίσης, αναφέρονται η εταιρεία παραγωγής και ο αριθμός καταλόγου του αντισώματος.

3.10.4 Αφαίρεση ανοσοσυμπλόκων από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping)

Μετά την ανάλυση ανοσοστυπώματος Western, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4^{o}C και κάτω από συνθήκες σκότους. Είναι δυνατή η αφαίρεση των ανοσοσυμπλόκων από την επιφάνεια μιας μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που έχει υποστεί ανάλυση ανοσοστυπώματος Western (stripping), χωρίς να αλλοιωθεί η ποσότητα και η ποιότητα των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί ηλεκτρομεταφορά. Με την αφαίρεση των συμπλόκων του πρώτου και δεύτερου αντισώματος, είναι δυνατόν να ακολουθήσει πρόσδεση νέου αντισώματος με ειδικότητα για άλλον αντιγονικό επίτοπο, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση πολλαπλών πρωτεϊνών από ένα πρωτεϊνικό κυτταρικό εκχύλισμα το οποίο έχει εντυπωθεί στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής, μεμβράνες νιτροκυτταρίνης στις οποίες είχε γίνει μεταφορά πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν σε διαδοχικά πειράματα ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western, εξασφαλίζοντας έτσι την

πολυδιάστατη ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη χρήση πολλαπλών πρώτων αντισωμάτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Οι χρησιμοποιημένες μεμβράνες νιτροκυτταρίνης κλείνονται προσεκτικά σε ειδικό αποστειρωμένο σακουλάκι, όπου προστίθεται αποδιατακτικό διάλυμα αφαίρεσης ανοσοσυμπλόκων.

Η χημική σύσταση του διαλύματος αφαίρεσης ανοσοσυμπλόκων είναι η εξής:

- ✓ Tris-HCl, pH 6,8 0,8 ml
- ✓ SDS (20%) 1,25 ml
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1 ml
- ✓ Αποστειρωμένο H_2O 10,5 ml
- ➢ Τελικός όγκος 12,5 ml

Σε κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προστίθεται ικανός όγκος (~8 ml) αποδιατακτικού διαλύματος ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια του στυπώματος. Η ύπαρξη αποδιατακτικών παραγόντων όπως είναι η β-μερκαπτοαιθανόλη και το SDS εξασφαλίζουν την απογύμνωση (stripping) των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης από τα σύμπλοκα των αντισωμάτων που είχαν δεσμευτεί σε ειδικές θέσεις, καθώς από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών του γάλακτος, τα οποία είχαν προσδεθεί σε μη ειδικές θέσεις, στην υπόλοιπη επιφάνεια της μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο, οι αντιγονικοί επίτοποι των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν υποστεί μεταφορά στην μεμβράνη είναι προσιτοί σε εκ νέου δέσμευση, με καινούργιο πρώτο αντίσωμα.

- Οι μεμβράνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55^{o}C και ακολουθεί επώαση των μεμβρανών για περίπου σαράντα πέντε (45) λεπτά.
- Στη συνέχεια, οι μεμβράνες μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρείται προσεκτικά το αποδιατακτικό διάλυμα αφαίρεσης ανοσοσυμπλόκων.

- Ακολουθούν έξι (6) πλύσεις διάρκειας δέκα (10) λεπτών η κάθε μια με ειδικό διάλυμα έκπλυσης TBS-T 1X, ώστε να αφαιρεθεί πλήρως το αποδιατακτικό διάλυμα.
- Στη συνέχεια, ακολουθείται εκ νέου η διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο της ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western (βλέπε κεφάλαιο 3.10.3).

3.11 Ανοσοκυτταροχημεία

Ο προσδιορισμός του υποκυτταρικού εντοπισμού επιλεγμένων μελών του κυτταρικού πρωτεώματος μελετήθηκε με την μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας. Πραγματοποιήθηκε σήμανση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων, σε *in vitro* καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης και ακολούθησε παρατήρηση σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον υποκυτταρικό εντοπισμό επιλεγμένων μελών του κυτταρικού πρωτεώματος είναι η εξής:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες που φέρουν επικάλυψη με θετικά φορτισμένη λυσίνη (poly-Lysine slides, Carl Roth, Η.Π.Α.). Τα κύτταρα τοποθετούνται εντός ομόκεντρων κύκλων (spots) που έχουν δημιουργηθεί με ειδικό, υδρόφοβο μαρκαδόρο (Pap pen, #Z377821, Sigma-Aldrich, Γερμανία) και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (διαμέτρου 100 mm).
- Ακολουθεί επώαση διάρκειας τεσσάρων (4) ωρών στον θάλαμο καλλιέργειας (37^oC και 5% CO_2) ώστε να επιτευχθεί προσκόλληση των κυττάρων.
- Κατόπιν, πραγματοποιείται χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων του εκάστοτε υπό μελέτη χημειοθεραπευτικού παράγοντα και ακολουθεί επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Στο σημείο αυτό, οι αντικειμενοφόρες πλάκες έχουν εμβαπτιστεί στο διάλυμα του θρεπτικού μέσου που περιέχει τις επιμέρους δόσεις του φαρμάκου,

ώστε να αποφευχθεί εξάτμιση του διαλύματος κατά τη διάρκεια της επώασης.

- Την επομένη, αφού πραγματοποιηθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, ακολουθούν πλύσεις των κυττάρων με όγκο (0,3 ml) ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται τρεις (3) φορές.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μονιμοποίηση των δειγμάτων με διάλυμα φορμαλδεϋδης (3% v/v) και ακολουθεί επώαση για δεκαπέντε (15) λεπτά στον κλίβανο (37^{o}C και 5% CO_2).
- Κατόπιν, γίνεται προσεκτικό ξέπλυμα των δειγμάτων με όγκο (0,3 ml) ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται τρεις (3) φορές.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης με 0,3% (v/v) διάλυμα Triton-X (#212314, Panreac Quimica Sau, Ισπανία) σε PBS 1X. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στο θάλαμο καλλιέργειας (37^{o}C και 5% CO_2) για είκοσι (20) λεπτά.
- Ακολούθως, τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις (3) φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X και ακολουθεί επώαση σε διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος [BSA 0,1% (w/v), σε διάλυμα PBS 1X] για ενενήντα (90) λεπτά στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2).
- Με το πέρας του χρόνου επώασης, αφαιρείται προσεκτικά το διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος και προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο 1:250 (v/v) σε διάλυμα PBS 1X, το οποίο περιέχει BSA 0,1% (w/v). Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 4 ^{o}C για 24 ώρες.
- Την επομένη, αφού αφαιρεθεί το διάλυμα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα, τα δείγματα ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X. Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιείται τρεις (3) φορές.
- Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη του δεύτερου αντισώματος, αραιωμένου 1:250 (v/v) σε διάλυμα PBS 1X, που περιέχει BSA 0,1% (w/v). Το δεύτερο αντίσωμα φέρει συζευγμένη φθορίζουσα

χρωστική [DyLight 488 (πράσινο) και DyLight 633 (κόκκινο) Thermo Fischer Scientific Inc., Η.Π.Α.]. Τα δείγματα επωάζονται για δύο (2) ώρες στον θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2).

- Με το πέρας των δύο (2) ωρών, αφαιρείται το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος και τα δείγματα ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X. Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιείται τρεις (3) φορές.*
- Στη συνέχεια, στα δείγματα προστίθεται όγκος (20 μl) διαλύματος εγκλεισμού (MOWIOL) και τοποθετείται αποστειρωμένη καλυπτρίδα.
- Τέλος, πραγματοποιείται παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και φωτογράφιση (Nikon EZ-C1, Nikon Instruments Inc., Ιαπωνία).

---

* Στα δείγματα που απαιτούνταν ταυτόχρονη χρώση του πυρήνα, εκτός από την ειδική σήμανση των πρωτεϊνικών μορίων υπό μελέτη με τη χρήση αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων σε διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (proidium iodide) για περίπου τριάντα (30) λεπτά.

3.12 Πρωτεωμική τεχνολογία

Ο όρος πρωτεωμική τεχνολογία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ταυτόχρονη ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών ενός κυττάρου. Η πρωτεωμική τεχνολογία συνίσταται στην απομόνωση των πρωτεϊνών του κυττάρου, το διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων και την επακόλουθη ταυτοποίησή τους με τη βοήθεια φασματογραφίας μάζας. Με τη βοήθεια της πρωτεωμικής τεχνολογίας μπορούν να ανιχνευθούν διαφορές που αφορούν στα επίπεδα έκφρασης, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών.

3.12.1 Ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων

Η ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων επιτρέπει το διαχωρισμό πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα συστατικά τους με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (πρώτη διάσταση) και το μοριακό βάρος (δεύτερη διάσταση) των επιμέρους πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αποτελεί μια σύνθετη μέθοδο που εφαρμόζεται στην πρωτεωμική τεχνολογία και πλεονεκτεί της απλής ηλεκτροφόρησης σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, καθώς φέρει υψηλή ικανότητα διαχωρισμού. Η μέθοδος αποτελείται από δύο (2) στάδια τα οποία περιγράφονται αναλυτικά πιο κάτω:

Ισοηλεκτρική εστίαση. Τα πρωτεϊνικά δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα διαβαθμισμένου pH και εφαρμόζεται τάση ηλεκτρικού ρεύματος. Οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν στο πήκτωμα με βάση το φορτίο τους και ακινητοποιούνται στο σημείο εκείνο που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, εκεί που το συνολικό φορτίο της εκάστοτε πρωτεϊνικής αλυσίδας ισούται με μηδέν (0). Για να είναι επιτυχής η ισοηλεκτρική εστίαση, απαιτείται πλήρης αποδιάταξη των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ώστε να εκτίθενται στο περιβάλλον όλες οι ηλεκτρικά φορτισμένες ομάδες τους. Επίσης, σημαντική προϋπόθεση για τη διασφάλιση της ακεραιότητας της μεθόδου αποτελεί η αφαίρεση όλων των υπόλοιπων φορτισμένων μορίων από το διάλυμα (DNA, RNA) και η πέψη τους με νουκλεάση, ώστε τα μοναδικά ιόντα του διαλύματος να προέρχονται από τις αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνικών αλυσίδων και να μην υπάρχει παρεμπόδιση της ισοηλεκτρικής εστίασής τους. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με διάλυμα ακετόνης ώστε να απομακρυνθούν διάφορα φορτισμένα μόρια, όπως ιόντα αλάτων, λιπίδια κ.λπ. Ακολούθως, το διάλυμα των πρωτεϊνών επωάζεται σε ειδικό διάλυμα ισοηλεκτρικής εστίασης, το οποίο περιέχει ισχυρούς αποδιατακτικούς παράγοντες (ουρία, CHAPS, θειουρία και DTT).

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

- Πραγματοποιείται προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων για την ισοηλεκτρική εστίαση με την προσθήκη διαλύματος βενζονάσης (0,1 μl/ml, Sigma-Aldrich, Γερμανία) και επώαση των δειγμάτων για μια (1) ώρα σε θερμοκρασία 37^{o}C.
- Στη συνέχεια, προστίθεται τριπλάσιος όγκος διαλύματος ακετόνης και πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων. Ακολουθεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία -20^{o}C για χρονικό διάστημα δεκαέξι (16) ωρών.
- Την επόμενη, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για τριάντα (30) λεπτά σε θερμοκρασία 4^{o}C, στις 13000 rpm.
- Στη συνέχεια, γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου υλικού και διαλυτοποίηση του ιζήματος (πρωτεΐνες) σε όγκο (350 μl) διαλύματος ισοηλεκτρικής εστίασης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση των δειγμάτων για δεκαπέντε (15) λεπτά σε αναδευτήρα τύπου vortex.

Το διάλυμα ισοηλεκτρικής εστίασης περιέχει τα παρακάτω:

✓ Ουρία	7 M
✓ Θειουρία	2 M
✓ Απορρυπαντικό CHAPS	2% (w/v)
✓ DTT	10 mg/ml

- Ακολούθως, πραγματοποιείται ισοηλεκτρική εστίαση των δειγμάτων στο σύστημα PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.).
- Ποσότητα των πρωτεϊνικών δειγμάτων (1 mg) φορτώνεται σε προκατασκευασμένες ταινίες πολυακρυλαμιδίου IPG, ειδικές για ηλεκτροφόρηση εστίασης μη γραμμικής κλίσης με εύρος pH 3-10NL ή 4-7L (Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.). Οι ταινίες πολυακρυλαμιδίου έχουν ενυδατωθεί σε ειδικό διάλυμα που περιέχει ουρία (8 M), διάλυμα CHAPS (4%) και διάλυμα DTT (1%), με επώαση για είκοσι (20) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με εφαρμογή τάσης ηλεκτρικού ρεύματος 250 Volt και σταδιακή αύξηση της τάσης στα 8000 Volt, με ρυθμό τριών (3) Volt ανά λεπτό (3V/min). Ακολουθεί εφαρμογή σταθερής τάσης 8000 Volt για χρονικό διάστημα εικοσιπέντε (25) ωρών (150000 Vhrs).
- Μετά την ισοηλεκτρική εστίαση, οι προκατασκευασμένες ταινίες πολυακρυλαμιδίου επωάζονται με το διάλυμα εξισορρόπησης I (equilibration buffer I).

Η σύσταση του διαλύματος εξισορρόπησης I είναι η εξής:

- ✓ Διάλυμα Tris-HCl, pH 6,8 50 mM
- ✓ Διάλυμα ουρίας 6 M
- ✓ Διάλυμα γλυκερόλης 30%
- ✓ Διάλυμα SDS 1%
- ✓ Διάλυμα DTT 7,5 mg/ml

- Οι μεμβράνες εμβαπτίζονται και επωάζονται στο διάλυμα εξισορρόπησης I για δεκαπέντε (15) λεπτά και κατόπιν στο διάλυμα εξισορρόπησης II, επίσης για χρονικό διάστημα δεκαπέντε (15) λεπτών.

Η χημική σύσταση του διαλύματος εξισορρόπησης II παρατίθενται πιο κάτω:

- ✓ Διάλυμα Tris-HCl, pH 8,8 50 mM
- ✓ Διάλυμα ουρίας 6 M
- ✓ Διάλυμα γλυκερόλης 30%
- ✓ Διάλυμα SDS 2%
- ✓ Διάλυμα ιωδοακεταμιδίου 45 mg/ml

- Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση στη δεύτερη διάσταση με τη βοήθεια της συσκευής

Protean II (Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.), σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 12% (διαστάσεων 180 x 200 x 1,5 mm).

- Η προκατασκευασμένη ταινία ισοηλεκτρικής εστίασης τοποθετείται και σταθεροποιείται στην κορυφή των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με τη χρήση προθερμασμένου διαλύματος αγαρόζης (0,5% w/v), το οποίο καλύπτει το κενό μεταξύ της ταινίας και του πηκτώματος συμπύκνωσης.
- Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 40 mA σε κάθε πήκτωμα, για χρονικό διάστημα περίπου πέντε (5) ωρών.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου δεύτερης διάστασης, πραγματοποιείται χρώση και ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

3.12.2 Χρώση και ανίχνευση πρωτεϊνών

Μετά την ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών όπως είναι η Colloidal Coomassie blue G250 (Novex, San Diego, Η.Π.Α.), που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, περιγράφεται παρακάτω:

- Πραγματοποιείται μονιμοποίηση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου σε διάλυμα το οποίο περιέχει 50% μεθανόλη (v/v) και 5% φωσφορικό οξύ (v/v) για δύο (2) ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια, γίνεται αφαίρεση του διαλύματος μονιμοποίησης και πλύση του πηκτώματος με διπλά αποσταγμένο νερό (ddH_2O) για μια (1) ώρα.
- Ακολούθως, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης που περιέχει τη χρωστική Coomassie blue G250 (0,1% v/v) και ακολουθεί επώαση για δεκαέξι (16) ώρες, υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός του πηκτώματος με διπλά αποσταγμένο νερό (ddH_2O), υπό ανάδευση.

Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η χρώση των πρωτεϊνών του εκάστοτε δείγματος, καθώς η χρωστική Coomassie G250 δεσμεύεται μη ομοιοπολικά στις άμινο-ομάδες (NH_3^+) των πρωτεϊνικών μορίων και επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής χρώσης των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, ακολούθησε σάρωση των κηλίδων που εντοπίστηκαν στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με ειδική συσκευή πυκνομέντρησης GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Η.Π.Α.), με τη βοήθεια το λογισμικού PD-Quest v8.0 (Bio-Rad, Hercules, Η.Π.Α.). Οι πρωτεϊνικές κηλίδες του πηκτώματος εντοπίστηκαν, αναλύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια λογισμικού επεξεργασίας εικόνας PD-Quest imaging software v8.0 (Bio-Rad, Hercules, Η.Π.Α.). Η επιλογή των πρωτεϊνικών κηλίδων στις οποίες πραγματοποιείται ταυτοποίηση με φασματογράφο μαζών γίνεται με βάση τη μεταβολή της οπτικής πυκνότητας (OD) των εκάστοτε δειγμάτων, σε απόκριση στις συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε (ελάχιστη μεταβολή OD: x1.25).

3.12.3 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματογράφο μάζας

Οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με την ηλεκτροφόρηση δύο (2) διαστάσεων και ανιχνεύονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με την μορφή κηλίδων ή στιγμάτων, ταυτοποιούνται με τη βοήθεια του φασματογράφου μάζας. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο διαχωρισμό ιονισμένων πεπτιδίων σύμφωνα με το λόγο μάζα/φορτίο (m/z). Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες ιονίζονται μέσα από μια διαδικασία γνωστή και ως «ηλεκτροψεκασμός», κατά την οποία τα πεπτίδια που απομονώνονται από το πήκτωμα αποκτούν ηλεκτρικό φορτίο με την εφαρμογή ισχυρού δυναμικού. Τα δεδομένα που συλλέγονται από το φασματογράφο μάζας υποβάλλονται σε επεξεργασία με τη βοήθεια αλγορίθμων προκειμένου να γίνει αναζήτηση των φασμάτων MS/MS σε βάσεις

δεδομένων και να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση της πρωτεΐνης. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Τα πρωτεϊνικά στίγματα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου σημειώνονται ημιαυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού Melanie 4.02.
- Ακολουθεί αποκοπή των στιγμάτων από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη βοήθεια της ρομποτικής συσκευής Proteiner SPII (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία) και μεταφορά τους σε πλάκες 96-μικροβοθρίων.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αποχρωματισμός των πρωτεϊνικών στιγμάτων με όγκο διαλύματος (180 μl) διττανθρακικού αμμωνίου (NH_4HCO_3, ammonium bicarbonate 100 mM) σε ακετονιτρίλιο (ACN, 30% v/v).
- Ακολουθεί πλήρης ξήρανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, καθώς πραγματοποιείται φυγοκέντρηση υπό κενό, σε ειδική φυγόκεντρο (MaxiDry Plus, Δανία) για μισή ώρα (30 min).
- Στη συνέχεια, τα αποξηραμένα δείγματα ενυδατώνονται με την προσθήκη όγκου (5 μl) διαλύματος ανασυνδυασμένης θρυψίνης (συγκέντρωση 20 μl/ml Roche Diagnostics, Ελβετία). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για δεκαέξι (16) ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την επώαση, σε κάθε δείγμα προστίθεται όγκος (10 μl) διαλύματος ακετονιτριλίου (50% v/v) το οποίο περιέχει τριφθορο-οξικό οξύ (0,3% v/v). Πραγματοποιείται νέα επώαση των δειγμάτων για δεκαπέντε (15) λεπτά, υπό ανάδευση.
- Στη συνέχεια, όγκος (1 μl) των θρυψινοποιημένων δειγμάτων φορτώνεται σε ειδική πλάκα αγκυροβόλησης MALDI και ακολουθεί ανάλυσή τους στον φασματογράφο μάζας MALDI-ToF (Ultraflex II, Bruker Daltonics, Η.Π.Α.).
- Με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Flexanalysis v2.2 (Bruker Daltonics, Η.Π.Α.) δημιουργούνται λίστες που

αντιπροσωπεύουν τις κορυφές που αντιστοιχούν σε ένταση του laser μεταξύ 40 και 60%.

- Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων και η αναζήτηση σε πρωτεϊνικές τράπεζες δεδομένων πραγματοποιείται αυτόματα με τη συσκευή MASCOT Server 2 (Matrix Science). Οι αλληλουχίες και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών συγκρίνονται με τις αντίστοιχες αλληλουχίες και τα θεωρητικά μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που απαρτίζουν το πρωτέωμα του ανθρώπου (*Homo sapiens*) στη βάση δεδομένων SWISSPROT.

3.13 Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Στην προσπάθεια μελέτης της αναστολής ενεργότητας λόγω παρεμπόδισης της μεταφοράς μεταγραφικών παραγόντων σε απόκριση στα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα που μελετήθηκαν, έγινε απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του πυρήνα καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~0,8x10^6) μεταφέρονται σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 60 mm) και τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2).
- Την επόμενη, πραγματοποιείται χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων των υπό μελέτη χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2) για 24 ώρες.
- Με το πέρας των 24 ωρών γίνεται απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια των τρυβλίων και μεταφορά τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon (15 ml).
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1500 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για δέκα (10) λεπτά.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε όγκο πέντε (5) ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X (4^{o}C) και

ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1500 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για δέκα (10) λεπτά. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο (2) φορές.

- Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρείται σε όγκο ενός (1) ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X και μεταφέρεται σε παγωμένους σωλήνες τύπου eppendorf (1,5 ml). Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1500 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C για δέκα (10) λεπτά.
- Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και προσθήκη όγκου (200 μl) του παγωμένου διαλύματος CERI (το οποίο περιλαμβάνεται στο kit απομόνωσης κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων της εταιρείας Pierce, NE-PER reagent kit, κωδικός προϊόντος #78333).
- Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά για δεκαπέντε (15) δευτερόλεπτα με αναδευτήρα τύπου vortex. Κατόπιν τοποθετούνται στον πάγο (4^{o}C) για δέκα (10) λεπτά.
- Ακολούθως, σε κάθε δείγμα προστίθεται ποσότητα (11 μl) παγωμένου διαλύματος CERII (το οποίο επίσης, περιλαμβάνεται στο NE-PER reagent kit της εταιρίας Pierce).
- Πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων για πέντε (5) δευτερόλεπτα στον αναδευτήρα τύπου vortex.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο (4^{o}C) για ένα (1) λεπτό.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων για πέντε (5) δευτερόλεπτα στον αναδευτήρα τύπου vortex.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για πέντε (5) λεπτά, στις 9000 rpm, σε θερμοκρασία 4^{o}C.
- Το υπερκείμενο διάλυμα περιέχει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και συνεπώς μεταφέρεται σε νέο, αποστειρωμένο σωληνάκι τύπου eppendorf. Τα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα φυλάσσονται στους -80^{o}C.
- Το ίζημα που παραμένει στα αρχικά σωληνάκια τύπου eppendorf περιέχει άθικτους τους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων.

Προστίθεται όγκος (100 μl) παγωμένου διαλύματος NER (το οποίο επίσης, περιλαμβάνεται στο NE-PER reagent kit της εταιρίας Pierce).

- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων για δεκαπέντε (15) δευτερόλεπτα και κατόπιν τοποθετούνται στον πάγο (4^oC) για χρονικό διάστημα σαράντα πέντε (45) λεπτών. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά για δεκαπέντε (15) δευτερόλεπτα, ανά δέκα (10) λεπτά.
- Ακολούθως πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 9000 rpm, για δέκα (10) λεπτά σε θερμοκρασία 4^oC.
- Το υπερκείμενο διάλυμα περιέχει τα πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα και μεταφέρεται σε νέα, παγωμένα σωληνάκια τύπου eppendorf. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα φυλάσσονται στους -80^oC.

3.14 Δοκιμασία μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω πρόσδεσης (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Η δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας χρησιμοποιείται συχνά για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA/RNA. Με τη διαδικασία αυτή μπορεί να καθοριστεί η ικανότητα μιας πρωτεΐνης να προσδεθεί σε συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας πραγματοποιείται σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Το σύμπλοκο DNA/RNA-πρωτεΐνης εμφανίζει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε σχέση με αυτή των ελεύθερων ή δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα να μεταναστεύουν πιο αργά μέσα στο πήκτωμα, σε σχέση με το ελεύθερο DNA ή RNA. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία πάνω στην οποία ελέγχεται η δυνατότητα πρόσδεσης πρωτεϊνών είναι σημασμένη με μόρια, όπως π.χ. βιοτίνη, ραδιενεργός φωσφόρος, κ.λπ. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, οι δοκιμασίες μεταβολής κινητικότητας πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την ανάλυση της ενεργότητας

του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, σε απόκριση στους υπό μελέτη φαρμακευτικούς παράγοντες. Για τη δοκιμασία μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που πραγματοποιήθηκε εδώ, χρησιμοποιήθηκε το Light-Shift Chemiluminescent EMSA kit (#89880, Pierce, Η.Π.Α.) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

Συστατικά πηκτώματος	**Ποσότητα**
Διάλυμα TBE 10X	1 ml
Διάλυμα ακρυλαμιδίου/ bis ακρυλαμιδίου (30:1)	2,6 ml
Διάλυμα APS (10%)	200 ml
Διάλυμα TEMED	40 μl
H_2O	16,5 ml
Τελικός όγκος	20 ml

Πίνακας 9: Χημική σύνθεση διαλύματος πολυακρυλαμιδίου, πυκνότητας 4%, για την παρασκευή μη αποδιατακτικού πηκτώματος.

- Παρασκευάζεται το μη αποδιατακτικό (καθώς δεν περιέχει SDS) διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο θα σχηματίσει το πήκτωμα. Η χημική σύνθεση του διαλύματος παρατίθεται στον Πίνακα 9.
- Η πυκνότητα των συγκεκριμένων πηκτωμάτων είναι 4% σε ακρυλαμίδιο, το δε διάλυμα μεταφέρεται στην ειδική συσκευή παρασκευής πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με τις γυάλινες πλάκες (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.). Κατόπιν, προστίθεται το ειδικό κτένι, για τη δημιουργία των βοθρίων του πηκτώματος, μέσα στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση. Το πήκτωμα επωάζεται για μια (1) ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στερεοποιηθεί.
- Συναρμολογούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτουμε διάλυμα TBE 0,5X ώστε να καλύπτει το πήκτωμα.

- Στη συνέχεια, αν και δεν έχουμε φορτώσει ακόμα τα δείγματά μας, εφαρμόζουμε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 90 Volt και αφήνουμε την ηλεκτροφόρηση του άδειου πηκτώματος να συνεχιστεί για μια (1) ώρα (pre-run).
- Κατά τη διάρκεια της προ-ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιείται προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων, όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 10.

Συστατικά	**Α ποσότητα**	**Β ποσότητα**	**Γ ποσότητα**
H_2O	12 μl	8 μl	6 μl
10Χ Διάλυμα πρόσδεσης	2 μl	2 μl	2 μl
Διάλυμα γλυκερόλης 50%	1 μl	1 μl	1 μl
Διάλυμα $MgCl_2$ (100 mM)	1 μl	1 μl	1 μl
Διάλυμα poly dI/dC (1 μg/ml)	1 μl	1 μl	1 μl
Διάλυμα NP40 (1%)	1 μl	1 μl	1 μl
Μη-σημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής (2 pmol/μl)	-	-	2 μl
Πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών	-	4 μl	4 μl
Σημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής (10 fmol/μl)	2 μl	2 μl	2 μl

Πίνακας 10: Για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα που μελετάται, προετοιμάζονται τρία (3) δοκιμαστικά σωληνάκια τύπου eppendorf (Α,Β και Γ). Το σωληνάκι Α αποτελεί το θετικό μάρτυρα, καθώς δεν περιέχει πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών παρά μόνο το σημασμένο ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή, το σωληνάκι Β αποτελεί το κατεξοχήν δείγμα καθώς περιέχει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και το σημασμένο ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή, ενώ το σωληνάκι Γ λειτουργεί ως μάρτυρας της ειδικότητας της αντίδρασης πρόσδεσης, καθώς, εκτός των παραπάνω συστατικών, περιέχει πολλαπλάσια ποσότητα μη-σημασμένου ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή, ο οποίος λειτουργεί ανταγωνιστικά προς το σημασμένο ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή.

Τα συστατικά του Πίνακα 10 προστίθενται σε καθαρά, αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου eppendorf και τοποθετούνται στον πάγο (4^oC). Τα διαλύματα πρόσδεσης, γλυκερόλης, $MgCl_2$ και poly dI/dC αποτελούν τυποποιημένες συσκευασίες του Light-Shift Chemiluminescent EMSA kit

(#20148, Pierce, Η.Π.Α.). Σε όλα τα δείγματα, το τελευταίο συστατικό που προστίθεται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα είναι ο σημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής, αφού μάλιστα έχει προηγηθεί μια σύντομη επώαση δύο (2) λεπτών, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.

Όνομα	**Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή**	**Τροποποίηση στο 5' άκρο**
NF-κB	Sense: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3	Βιοτίνη
	Anti-sense: 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'	Βιοτίνη
NF-κB	Sense: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3’	-
	Anti-sense: 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'	-

Πίνακας 10a: Ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο των δοκιμασιών μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω πρόσδεσης. Απεικονίζονται το όνομα, η ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία και η τροποποίηση του κάθε ανιχνευτή στο 5’ άκρο.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί πως οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές (Πίνακας 10a), σημασμένοι και μη, υβριδοποιούνται για να αποτελέσουν δίκλωνα μόρια, μέσα από μια διαδικασία που περιγράφεται συντόμως εδώ. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές αραιώνονται σε ειδικό διάλυμα υβριδοποίησης (annealing buffer 1X), η χημική σύσταση του οποίου παρατίθεται πιο κάτω:

- ✓ Διάλυμα Tris-HCl, pH 7,5 (1 M) 100 μl
- ✓ Διάλυμα NaCl (5 M) 200 μl
- ✓ Διάλυμα EDTA (0,5 M) 20 μl
- ✓ DEPC-H_2O 680 μl
- ➢ Τελικός όγκος 1000 μl

Οι ανιχνευτές αραιώνονται σε διάλυμα υβριδοποίησης σε τελική συγκέντρωση 10 pmol/μl, επωάζονται σε θερμοκρασία 95^oC για δύο (2) λεπτά και κατόπιν αφήνονται στον πάγκο, ώστε να επανέλθουν σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, πραγματοποιείται επώαση για δύο (2) επιπλέον ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί πλήρης

υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, οι υβριδοποιημένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές φυλάσσονται σε θερμοκρασία -30^{o}C.

- Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, αφού προστίθενται όλα τα επιμέρους συστατικά που αναγράφονται στον Πίνακα 10, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα (30 min).
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται όγκος (5 μl) διαλύματος φόρτωσης (loading buffer, #20148, Pierce, Η.Π.Α.) και τα δείγματα φορτώνονται στα βοθρία του πηκτώματος, που έχει ήδη ηλεκτροφορηθεί για μια (1) ώρα.
- Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε τάση 100 Volt. Η διαδικασία διακόπτεται όταν το μέτωπο των πρωτεϊνών φτάσει περίπου στην μέση του πηκτώματος.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, γίνεται ηλεκτρομεταφορά των ανιχνευτών σε μεμβράνη νάιλον (Hybond GE Heathcare Life Sciences, Η.Π.Α.). Το διάλυμα μεταφοράς είναι διάλυμα TBE 0,5X (4^{o}C), ενώ η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται στους 4^{o}C, για μια (1) ώρα.
- Η μεμβράνη τοποθετείται σε καθαρό δοχείο και προστίθεται όγκος (20 ml) διαλύματος πρόσδεσης μη ειδικών θέσεων (blocking buffer, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.). Ακολουθεί επώαση για είκοσι (20) λεπτά, υπό ανάδευση.
- Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και προστίθεται φρέσκο διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων, στο οποίο έχει διαλυθεί ποσότητα διαλύματος (66,7 μl) ανοσοσυμπλόκου που φέρει το ένζυμο υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας (HRP-conjugate, #89880, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.) σε αραίωση 1:300 (v/v). Ακολουθεί επώαση για δεκαπέντε (15) λεπτά, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθως, το διάλυμα αφαιρείται και πραγματοποιούνται ξεπλύματα της μεμβράνης με ειδικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer,

#89880, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.). Το διάλυμα έκπλυσης ανανεώνεται κάθε δέκα (10) λεπτά, πέντε (5) φορές.

- Η μεμβράνη μεταφέρεται σε καινούργιο δοχείο και επωάζεται σε ειδικό διάλυμα εξισορρόπησης υποστρώματος (substrate equilibration buffer, #89880, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.) Η επώαση διαρκεί πέντε (5) λεπτά και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνθήκες συνεχούς ανάδευσης.
- Η μεμβράνη αφαιρείται από το δοχείο και πραγματοποιείται η αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας με την προσθήκη ειδικού διαλύματος, το οποίο αποτελείται από διάλυμα ενίσχυσης λουμινόλης (luminol enhancer solution, #89880, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.) και διάλυμα σταθεροποίησης του υπεροξειδίου (stable peroxide solution, #89880, Light-shift Chemiluminescent EMSA kit, Pierce, Η.Π.Α.), σε αναλογία 1:1. Η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα χημειοφωταύγειας για τρία (3) λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, πραγματοποιείται εμφάνιση σε ειδική συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (LAS400, Fujifilm, Η.Π.Α.).

3.15 Ανίχνευση ενεργοποίησης λυσοσωμάτων και ανάπτυξη αυτοφαγίας

Στην προσπάθεια μελέτης των μονοπατιών θανάτου που ενεργοποιούνται μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε καρκινικά κύτταρα, επιχειρήθηκε η ανίχνευση της ενεργοποίησης αυτοφαγικού θανάτου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης, μετά από επίδραση διαφόρων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες που φέρουν επικάλυψη με θετικά

φορτισμένη λυσίνη (poly-Lysine slides, Roth). Τα κύτταρα μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2) αφού εμβαπτιστούν σε θρεπτικό υλικό.

- Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το υλικό καλλιέργειας και χορηγούνται στα κύτταρα οι διάφορες συγκεντρώσεις του μελετώμενου χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Τα δείγματα τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2) για χρονικό διάστημα 24 ωρών.
- Με το πέρας του 24ώρου, αφαιρείται το υλικό που φέρει το φαρμακευτικό παράγοντα και προστίθεται σε κάθε δείγμα υλικό καλλιέργειας που φέρει την χημική ένωση LysoTracker Red (#L7528, Invitrogen, Η.Π.Α.) σε συγκέντρωση 100 nM. Το LysoTracker Red είναι μια ειδική χρωστική, η οποία έχει την ικανότητα πρόσδεσης σε ενεργά λυσοσώματα, όντας έτσι δείκτης ανάπτυξης αυτοφαγικού φαινοτύπου. Τα δείγματα τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για μισή ώρα.
- Κατόπιν, αφαιρείται το υλικό που φέρει τη χρωστική και τα κύτταρα εμβαπτίζονται σε φρέσκο υλικό καλλιέργειας (DMEM 1X).
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εγκλεισμός των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικού διαλύματος (MOWIOL) και την τοποθέτηση καλυπτρίδας.
- Ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (Nikon EZ-C1, Nikon Instruments Inc., Ιαπωνία).

3.16 Δοκιμασία Επούλωσης Πληγής

Σε μια προσπάθεια προσέγγισης της μεταβολής της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης χρησιμοποιήθηκε μια πειραματική διαδικασία γνωστή ως δοκιμασία επούλωσης πληγής (scratch wound assay). Με τη βοήθεια της συγκεκριμένης μεθόδου είναι δυνατόν να εκτιμηθεί ποιοτικά η μεταβολή του μεταναστευτικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων τόσο

κάτω από «φυσιολογικές» συνθήκες, όσο και μετά από επέμβαση με χημειοθεραπευτικό σκεύασμα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~0,8x10^6) μεταφέρονται σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 60 mm) και τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2).
- Την επομένη, οι επιφάνειες των τρυβλίων, που πλέον φέρουν μονοκυτταρικό ταπήτιο, χαράσσονται ελαφρά με το άκρο αποστειρωμένης πιπέττας Pasteur σε συγκεκριμένα σημεία, δημιουργώντας χάσματα στη συνέχεια της κυτταρικής μονοστιβάδας.
- Στη συνέχεια, το υλικό καλλιέργειας αφαιρείται, ενώ προστίθεται υλικό το οποίο φέρει τις διάφορες δόσεις του ελεγχόμενου χημειοθεραπευτικού παράγοντα και τα δείγματα τοποθετούνται εκ νέου στον επωαστικό θάλαμο (37^{o}C και 5% CO_2).
- Με το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση του φαρμακευτικού παράγοντα, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Carl Zeiss Axiovert 25, Η.Π.Α.), όπου γίνεται παρατήρηση των σημείων στα οποία είχαν προηγουμένως δημιουργηθεί οι ασυνέχειες του μονόστιβου ταπητίου και φωτογράφιση με τη βοήθεια συνδεδεμένης ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Cannon Powershot G9, Cannon Inc., Η.Π.Α.).

3.17 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Excel (Microsoft Office, Η.Π.Α.). Τα γραφήματα και οι πίνακες που παρουσιάζονται στα πλαίσια των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ΜΤΤ αποτελούν μέσους όρους τουλάχιστον τριών (3) ανεξάρτητων πειραματικών μετρήσεων, ενώ υπολογίστηκε και το και απεικονίζεται και το εκάστοτε ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error of the mean). Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που παρουσιάζονται στη διατριβή αυτή έχουν πραγματοποιηθεί περισσότερο

της μιας (1) φοράς, ενώ σε ότι αφορά τα πειράματα ανοσοστυπωμάτων Western, RT-PCR, FACS και ανοσοκυτταροχημείας, απεικονίζονται τυπικά αποτελέσματα από ένα (1) αντιπροσωπευτικό πείραμα. Τα μαθηματικά δεδομένα έχουν αναλυθεί με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (Single t-Test) έναντι της υποθετικής τιμής ένα (1) και η τιμή *p* χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο σημαντικότητας των αποτελεσμάτων. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε για $p<0.05$.

3.18 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

3.18.1 Συσκευές

- Αναδευτήρας (K-550-GE Vortex Genie, Scientific Industries Inc., Η.Π.Α.).
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος (5410 Eppendorf centrifuge, Η.Π.Α.).
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος (Z-323-K HERMLE centrifuge, Γερμανία).
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (7780 Compact high speed refrigerated centrifuge, Kubota, Ιαπωνία).
- Επωαστικός θάλαμος ευκαρυωτικών κυττάρων με παροχή CO_2 (5425-1 NAPCO automatic CO_2 incubator, NAPCO, Η.Π.Α.).
- Εστία κάθετης νηματικής ροής (Bioquell, Microflow advanced biosafety cabinet, class II, Η.Π.Α.).
- Εστία κάθετης νηματικής ροής (Laminar Cabinet, Flow Laboratories, Η.Π.Α.).
- Ηλεκτρονικός ζυγός (P-1200, Mettler, Η.Π.Α.).
- Ηλεκτρονικός μικροζυγός (TE64 Sartorius, Sartorius Mechatronics AG, Γερμανία).
- Θερμαινόμενη πλάκα (D1200 Heatblock Accublock, Labnet International Inc., Η.Π.Α.).
- Καταψύκτης -30^{o}C (Revco Industries, Η.Π.Α.).

- Καταψύκτης -80^{o}C (Science Temp Corp. Freezer, Michigan, Η.Π.Α.).
- Καταψύκτης -80^{o}C (HERA Freeze, Thermo electron corporation, Η.Π.Α.).
- Μαγνητικοί αναδευτήρες (Gallenkamp magnetic stirrer-hotplate, Ηνωμένο Βασίλειο).
- Συσκευές ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.).
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Η.Π.Α.).
- Συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Biometra T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Γερμανία).
- Τροφοδοτικά ρεύματος (E143, Consort power supply, Βέλγιο).
- Υδατόλουτρο (3015WB, General purpose water bath, Η.Π.Α.).
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop (ND1000 Nanodrop, Thermo Fischer Scientific, Γερμανία).
- Φούρνος μικροκυμάτων (ER748, Toshiba microwave, Toshiba, Η.Π.Α.).
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αγαρόζης (B2300 Consort, Βέλγιο).
- Συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (LAS 4000 Imager, Fujifilm Life Science, Η.Π.Α.).
- Συσκευή εμφάνισης πηκτωμάτων αγαρόζης (Vilber Lourmat GmbH, Γερμανία).
- Κυτταρόμετρο ροής (FACScalibur, Beckton Dickinson, Η.Π.Α.).
- Συσκευή παραγωγής υπερήχων για «ηχοβολισμό» δειγμάτων.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (Carl Zeiss Axiovert 25, Η.Π.Α.).
- Συνεστιακό μικροσκόπιο laser (Nikon EZ-C1, Nikon Instruments Inc., Ιαπωνία).
- Οπτικό μικροσκόπιο (Euromex microscopes FE.2020, Ολλανδία)
- Φασματοφωτόμετρο ELISA plate (Dynatech MR500, Dynatech Laboratories, Η.Π.Α.)
- Φιάλες υγρού αζώτου (Cryo-diffusion B2036, Γαλλία).

3.18.2 Γυάλινα-Πλαστικά Σκεύη

- Πλαστικά ακρορύγχια (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Σωλήνες προπυλενίου τύπου falcon 15 και 50 ml (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Πλαστικοί σωλήνες τύπου eppendorf 0.2, 0.5 και 1.5 ml (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Πλαστικά φιαλίδια για φύλαξη στο υγρό άζωτο (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Δανία).
- Πιπέττες Pasteur, ογκομετρικοί κύλινδροι, ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως (ISOLAB Laborgerate GmbH, Γερμανία).
- Γυάλινες πιπέττες 5, 10 και 25 ml (Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Γερμανία).
- Ρύγχη πιπεττών 1, 200 και 1000 μl (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένες φλάσκες καλλιέργειας 25 και 75 τετραγωνικών εκατοστών (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αποστειρωμένα τρυβλία καλλιέργειας (διαμέτρου 60 και 100 mm) (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Γυάλινες καλυπτρίδες (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Πλακίδια 48- και 96- βοθρίων (CellStar, Greiner Bio-one, Η.Π.Α.).
- Γυάλινα μπουκάλια 100, 250 και 500 ml (Pyrex ScilLabware, Γερμανία).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

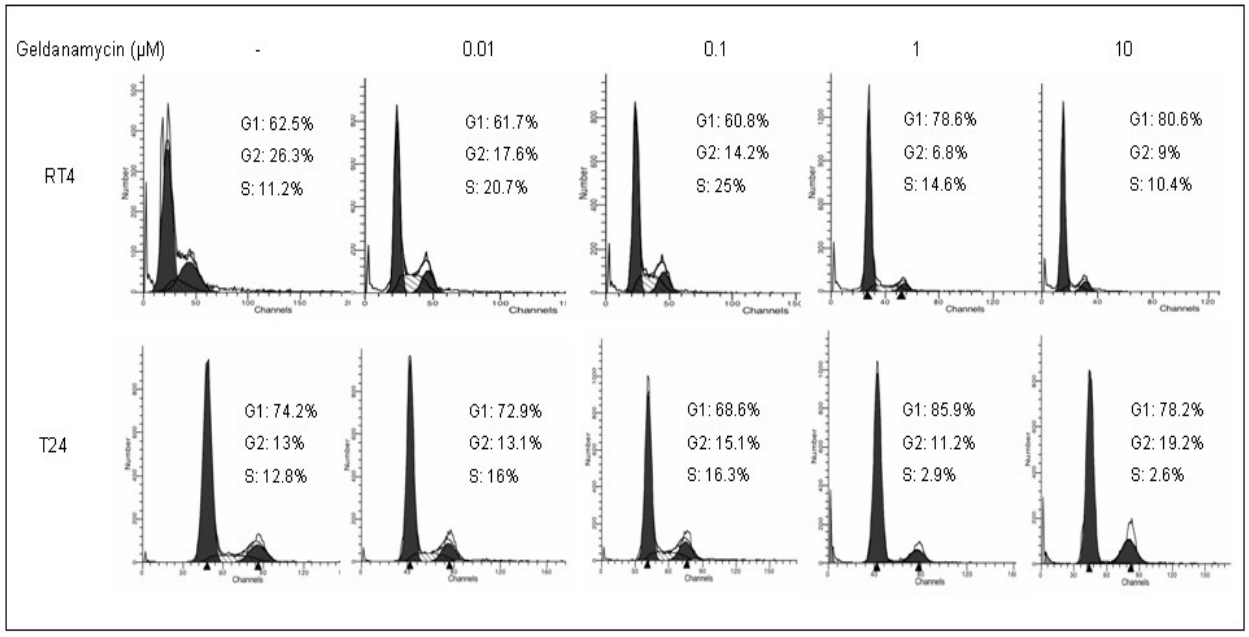
4. Αποτελέσματα

4.1 Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

4.1.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης, τύπου βενζοκινόνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Η πειραματική προσέγγιση η οποία παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, αφορά τη βιολογική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές διαφορετικού βαθμού κακοήθειας. Στο πλαίσιο των πειραματικών δοκιμασιών που έλαβαν χώρα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των RT4 (βαθμού κακοήθειας I) και T24 (βαθμού κακοήθειας III) κυτταρικών σειρών, με τη χρήση εξειδικευμένης αντίδρασης κυτταρομετρίας ροής (δοκιμασία FACS). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 21, τα καρκινικά κύτταρα RT4 (χαμηλής κακοήθειας) εμφανίζουν ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση διπλασιασμού S (G1/S σημείο ελέγχου), με το σχετικό ποσοστό των κυττάρων που καταμετρώνται στο συγκεκριμένο κλάσμα του κυτταρικού κύκλου να παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενη αύξηση από 62,5% (κάτω από φυσιολογικές συνθήκες) ως και 80,6% κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM). Παράλληλα με την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και τη συσσώρευση των καρκινικών κυττάρων στη G1 φάση, παρατηρείται και μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των κυττάρων που εγκλωβίζονται στο σημείο ελέγχου της μετάβασης από την G2 φάση στην M (G2/M σημείο ελέγχου), με αντίστοιχη μείωση του ποσοστού των κλασματοποιημένων κυττάρων από 26,3% (κάτω από

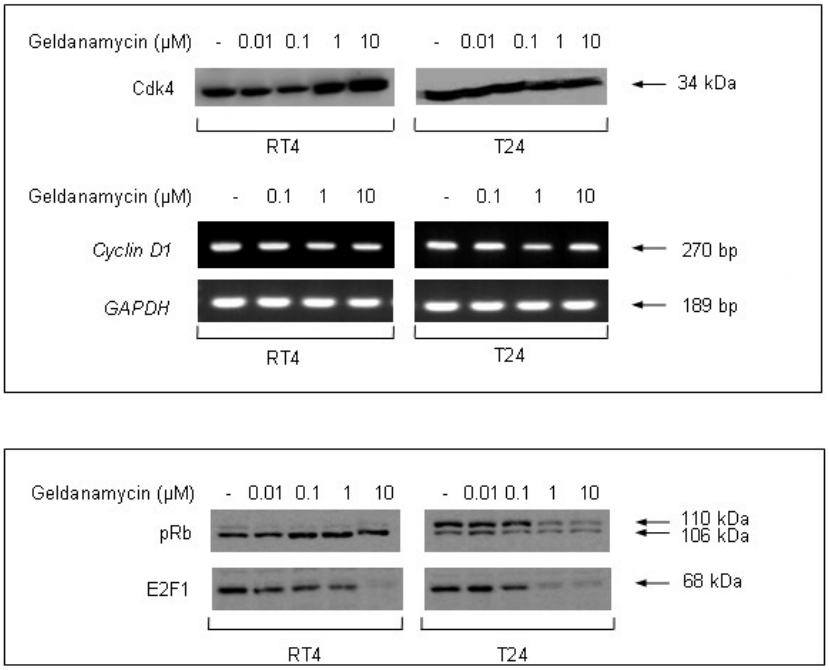
συνθήκες ελέγχου) σε 9%, για την υψηλότερη συγκέντρωση (10 μM) τζελνταναμυκίνης.



Εικόνα 21: Ενδεικτικά αποτελέσματα μεταβολής των κλασμάτων του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη.

Στα T24 (υψηλής κακοήθειας) καρκινικά κύτταρα, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης φαίνεται πως προκαλεί σχετικά ήπια αναστολή του κυτταρικού κύκλου, τόσο στο σημείο ελέγχου G1/S, όσο και στο σημείο ελέγχου G2/M, με ταυτόχρονη συσσώρευση καρκινικών κυττάρων και στα δύο (2) επιμέρους κλάσματα. Ειδικότερα, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του επιμέρους ποσοστού των καταμετρημένων κυττάρων που συσσωρεύονται στη G1 φάση, από 74,2% (σε φυσιολογικές συνθήκες) σε 85,9% κάτω από την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης τζελνταναμυκίνης (1 μM). Αντίστοιχα, το ποσοστό των κυττάρων που εγκλωβίζονται στη φάση G2 αυξάνονται γραμμικά από 13% (κάτω από συνθήκες ελέγχου) σε 19,2%, σε απόκριση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM τζελνταναμυκίνης). Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων

ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ειδικού αναστολέα της Hsp90, επιφέροντας μείωση του μιτωτικού δυναμικού και ανάσχεση του απορρυθμισμένου πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων.



Εικόνα 22: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στην έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επάνω, επίδραση της τζελνταναμυκίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης Cdk4 και στην μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου της κυκλίνης D1 (*Cyclin D1*). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1.

Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω επίδρασης της τζελνταναμυκίνης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διερευνήθηκε περαιτέρω, καθώς πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην μετάβαση των κυττάρων από το σημείο ελέγχου G1 (G1/S checkpoint), ελέγχοντας επί της ουσίας, την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της τζελνταναμυκίνης στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα συγκεκριμένων

πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, των συμπλόκων κυκλινών/κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cyclin/cyclin dependent kinase complex). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (Cdk4) και της κυκλίνης D1 (Cyclin D1) κάτω από την επίδραση αυξανόμενων δόσεων του φαρμακευτικού παράγοντα, καθώς οι δύο (2) αυτές πρωτεΐνες συνθέτουν το σύμπλοκο που είναι επιφορτισμένο με την μετάβαση των κυττάρων από το σημείο ελέγχου G1 και την προώθησή τους στην φάση S, όπου πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού [300, 301]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, παρατηρείται ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (Cdk4) μέχρι την συγκέντρωση του 0,1 μM τζελνταναμυκίνης, το οποίο διακόπτεται από την επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Cdk4, κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (1 και 10 μM τζελνταναμυκίνης) στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4. Το συγκεκριμένο πρότυπο μειορύθμισης και επακόλουθης αύξησης των επιπέδων ενός πρωτεϊνικού μορίου σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης παρατηρείται για πρώτη φορά στην ερευνητική βιβλιογραφία και θα αναλυθεί εκτενώς πιο κάτω. Στα καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, παρατηρείται ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης της συγκεκριμένης κινάσης σε απόκριση αυξανόμενων δόσεων της τζελνταναμυκίνης. Εκτός από την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Cdk4, ισχυρό πρότυπο μειορύθμισης παρατηρείται και στα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την κυκλίνη D1 (c*yclin D1*), με τα T24 (υψηλής κακοήθειας) καρκινικά κύτταρα να παρουσιάζουν την πιο ισχυρή αναστολή έκφρασης. Ειδικότερα, τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης του γενετικού τόπου *Cyclin D1* ακολουθούν γραμμική μειορύθμιση στην καρκινική σειρά RT4, με την ελάττωση των επιπέδων να είναι εμφανής κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 εμφανίζουν ισχυρό δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο αναστολής των επιπέδων, η οποία προκύπτει στην ενδιάμεση

συγκέντρωση του 1 μM του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, αναδεικνύεται η άμεση διασύνδεση ανάμεσα στην μειορύθμιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *Cyclin D1*, της πρωτεϊνικής έκφρασης της κινάσης Cdk4 και στην παρατηρούμενη ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στην G1 φάση, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων της τζελνταναμυκίνης.

Σε συνέχεια της μελέτης πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, επιχειρήθηκε η ανίχνευση της επίδρασης της τζελνταναμυκίνης στα επίπεδα έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1. Τα δύο (2) αυτά μόρια συγκροτούν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο κατέχει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της πορείας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η συστατική φωσφορυλίωση της pRb οδηγεί σε απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 στον πυρήνα και επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων (*Cyclin A*, *Cyclin E*, *PCNA* κ.λπ.), που οδηγούν στην προώθηση του μιτωτικού δυναμικού και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [134, 302]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, μετά από επεμβάσεις με τζελνταναμυκίνη παρατηρείται ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης των επιπέδων των πρωτεϊνών pRb και E2F1 και για τις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας (RT4) δεν παρουσιάζουν συστατική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (ανίχνευση ζώνης σε μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε 110 kDa), σε αντίθεση με τα T24 (υψηλής κακοήθειας) καρκινικά κύτταρα, τα οποία επιδεικνύουν υψηλά επίπεδα θεμελιώδους φωσφορυλίωσης του συγκεκριμένου μορίου. Η ύπαρξη υψηλών επιπέδων συστατικά φωσφορυλιωμένης pRb στα καρκινικά κύτταρα T24 βρίσκεται σε συμφωνία με τον αυξημένο βαθμό κακοήθειας και συνεισφέρει στην ανάπτυξη του επιθετικού φαινοτύπου της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Η κυτταρο-ειδική (cell type specific) συστατική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του

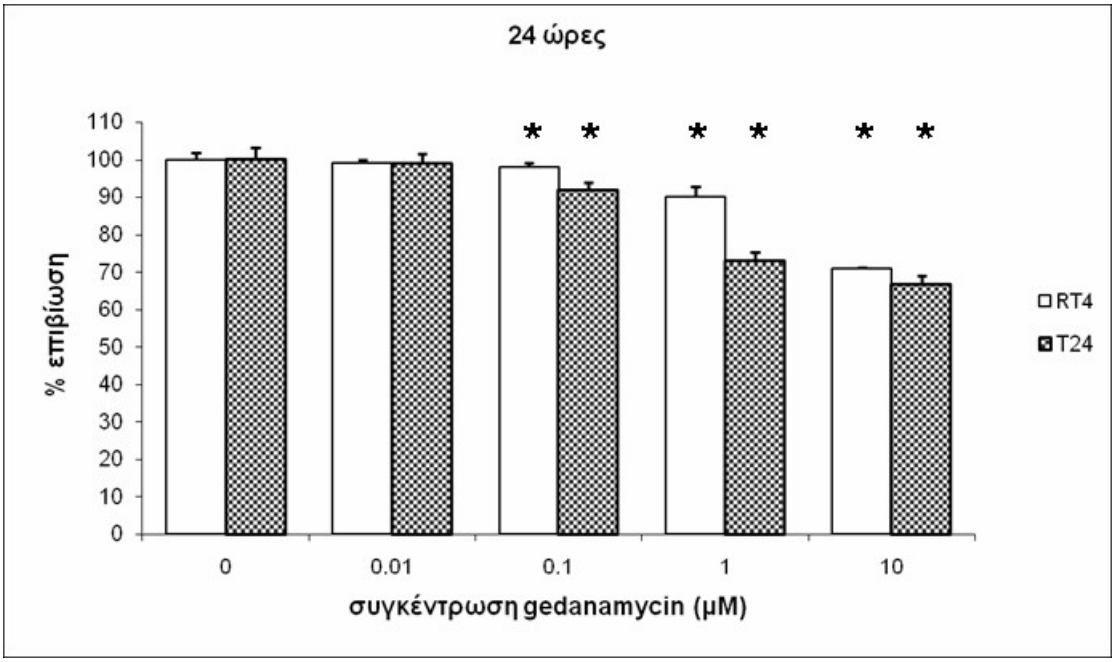
ρετινοβλαστώματος, καθώς και η διασύνδεσή της με αυξημένο βαθμό κακοήθειας, αναδεικνύει την πιθανή κλινική αξία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως μοριακό βιοδιαγνωστικό εργαλείο υψηλής προγνωστικής σημασίας στην ταυτοποίηση όγκων ουροδόχου κύστης σε ασθενείς. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της pRb στα κύτταρα T24 επιδεικνύουν δοσο-εξαρτώμενη μείωση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, με την μέγιστη αναστολή να παρατηρείται κάτω από τις υψηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα (1 και 10 μM). Η μείωση της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Rb συντελείται ταυτόχρονα με τη δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης Rb. Στα κύτταρα RT4, η αναστολή των επιπέδων της πρωτεΐνης Rb κάτω από την κυτταροστατική επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα δεν παρουσιάζει πρότυπο μειορύθμισης, με τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα να παραμένουν σταθερά ακόμα και στις υψηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα. Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που έχουν αναφερθεί μέχρι το σημείο αυτό, μελετήθηκε η μεταβολή των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 λόγω αναστολής της Hsp90, με ανάλυση ανοσοστυπώματος Western. Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 22, τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 εμφανίζουν ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αναστολής και για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, τα κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας) εμφανίζουν ισχυρότερο πρότυπο ανάσχεσης της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα, καθώς παρατηρείται ολική εξάλειψη των πρωτεϊνικών επιπέδων του E2F1 σε χαμηλότερη συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, συγκριτικά με τα κύτταρα RT4 (1 μM έναντι 10 μM, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, ενισχύουν περαιτέρω και επεξηγούν μηχανιστικά την παρατηρούμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, καθώς πρωτεϊνικά μόρια που συνθέτουν σύμπλοκα-«κλειδιά» στη ρύθμιση της μιτωτικής διαδικασίας και την μετάβαση των κυττάρων από τη G1 στην S φάση του κύκλου, όπως είναι η κινάση Cdk4, η κυκλίνη D1 και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1, οδηγούνται σε ισχυρή αναστολή της μεταγραφικής τους ενεργότητας, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης. Με βάση τα παραπάνω, αποδεικνύεται

ξεκάθαρα η αρνητική επίδραση του ειδικού αναστολέα της Hsp90 στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου, καθώς οδηγεί σε άμεση ανάσχεση του μιτωτικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών. Κάτω λοιπόν από το πρίσμα της δομικής και λειτουργικής αναστολής της μοριακής συνοδού Hsp90, αποκαλύπτεται η επαγωγή του κυτταροστατικού χαρακτήρα των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης.

4.1.2 Η τζελνταναμυκίνη εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραματικών αποτελεσμάτων που ανέδειξαν τη σημαντική φαρμακο-επαγόμενη ανάσχεση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων σε απόκριση της τζελνταναμυκίνης, επιχειρήθηκε η μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου χημειοθεραπευτικού παράγοντα στη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Για να εκτιμηθεί η δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στην επιβίωση των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες μέτρησης της μεταβολικής ενεργότητας των μιτοχονδρίων (MTT) σε *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων RT4 και T24. Οι δύο (2) κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις τζελνταναμυκίνης για 24 και 48 ώρες, χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι τελικές μετρήσεις και έγινε υπολογισμός της εκάστοτε επιβίωσης των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ (Εικόνες 23 και 24), οι καρκινικές κυτταρικές σειρές εμφάνισαν δοσο-εξαρτώμενη μείωση της επιβίωσής τους σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα και για τα δύο (2) χρονικά διαστήματα που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις (24 και 48 ώρες). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, τα καρκινικά κύτταρα T24 (χαμηλής διαφοροποίησης) φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων

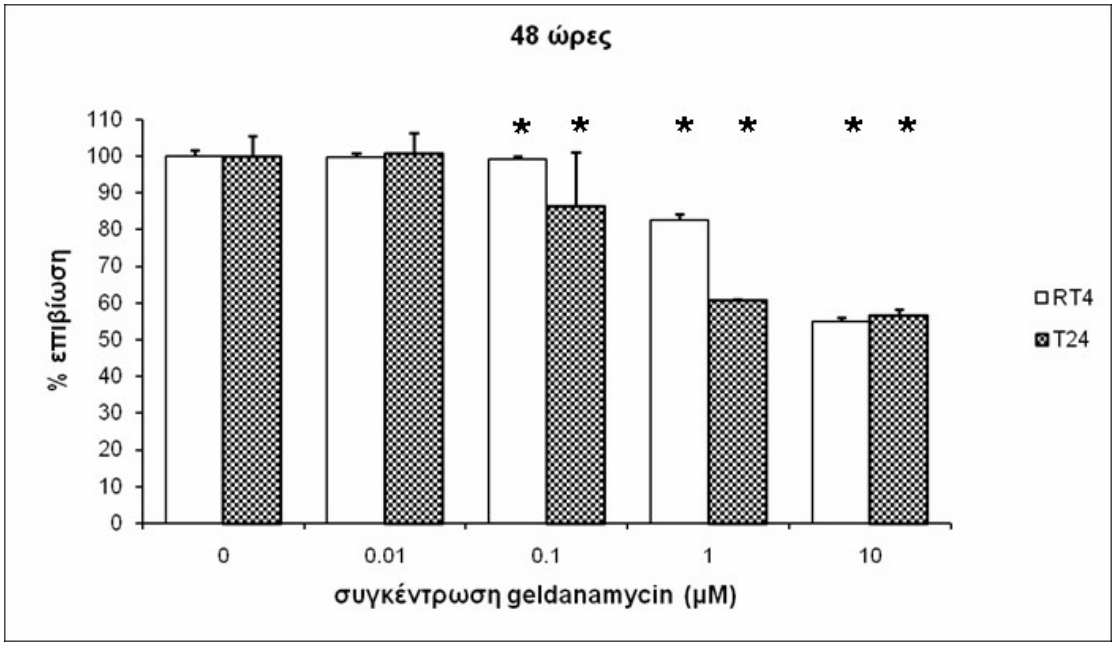
συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, τόσο σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, όσο και στην μέτρηση των 48 ωρών (Εικόνα 24).



Εικόνα 23: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων RT4 και T24 της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 24 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, p<0,05).

Η επιβίωση των κυττάρων T24 στην υψηλή συγκέντρωση της τζελνταναμυκίνης (10 μM) δεν ξεπερνά το 65% (24 ώρες επώασης), ενώ η αντίστοιχη μέτρηση στις 48 ώρες καταδεικνύει επιπλέον μείωση της βιωσιμότητας, με το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων που καταμετρώνται ζωντανά να μην ξεπερνά το 55%. Τα κύτταρα RT4 (χαμηλής κακοήθειας) επιδεικνύουν ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση της επιβίωσής τους σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα. Ειδικότερα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις της τζελνταναμυκίνης δεν φαίνεται να επηρεάζουν την επιβίωση των κυττάρων RT4, καθώς μέχρι και τη συγκέντρωση του 1 μM δεν συντελείται σημαντική μείωση της βιωσιμότητας (~90%), ενώ η κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου αντανακλάται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης (10 μM τζελνταναμυκίνης), με τα επιμέρους επίπεδα επιβίωσης να κυμαίνονται γύρω στο 70%. Τα κύτταρα RT4 παρουσιάζονται πιο ανθεκτικά στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα, σε

σύγκριση με τα κύτταρα T24, στα οποία καταγράφεται σημαντική μείωση βιωσιμότητας κάτω από την ανασταλτική δράση χαμηλότερων δόσεων τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM στην μέτρηση των 24 ωρών).



Εικόνα 24: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων RT4 και T24 της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 48 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, $p<0,05$).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, η μέτρηση των 48 ωρών καταδεικνύει ξεκάθαρα τη σημαντική μείωση της επιβίωσης των καρκινικών σειρών ουροδόχου κύστης μετά από επώαση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Επίσης, είναι φανερό ότι τα καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας (T24) εμφανίζονται πιο ευαίσθητα στην κυτταροτοξική επίδραση της τζελνταναμυκίνης, καθώς απαιτούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα για να επιφέρουν αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης με αυτά που επιδεικνύει η κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας (RT4). Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά RT4 επιδεικνύει ένα ήπιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης ελάττωσης της κυτταρικής επιβίωσης μέχρι την ενδιάμεση συγκέντρωση του 0,1 μM τζελνταναμυκίνης (~100% επιβίωση), με την κυτταροτοξική επίδραση του παράγοντα να γίνεται πιο εμφανής για τις υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου (1 και 10 μM), με τα

αντίστοιχα ποσοστά των ζωντανών κυττάρων να υπολογίζονται στο 80% και 50% της επιβίωσης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Τα κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης T24, εμφανίζουν καλύτερη απόκριση στην κυτταροτοξική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με το μοτίβο της επιβίωσης να παραμένει δοσο-εξαρτώμενο. Η επιβίωση των κυττάρων T24 κάτω από την επίδραση της ενδιάμεσης συγκέντρωσης του παράγοντα υπολογίζεται στο 85%, με τα επίπεδα να μειώνονται σημαντικά στις υψηλότερες δόσεις της τζελνταναμυκίνης (~50% στα 10 μM).

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ, καταδεικνύεται η κυτταροτοξική δράση της τζελνταναμυκίνης έναντι καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, με αυξημένη αποτελεσματικότητα για την κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας T24. Πέρα από την κυτταροστατική δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (βλέπε παράγραφο 4.1.1), αποδεικνύεται η ικανότητά του να οδηγήσει σε ελάττωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, με μεγαλύτερη επιτυχία σε κύτταρα υψηλής κακοήθειας. Η εξειδικευμένη, στοχευμένη δραστικότητα που επιδεικνύει η τζελνταναμυκίνη έναντι κυττάρων υψηλής εξαλλαγής μπορεί να αποδειχθεί πολύ σημαντική στη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης, καθώς η υψηλή συγγένεια δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε εξαλλαγμένα κύτταρα αποτελεί σημαντική ιδιότητα, την οποία εκμεταλλεύονται τα σύγχρονα φαρμακευτικά σχήματα, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

4.1.3 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης ενεργοποιεί μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου

Η μείωση της βιωσιμότητας καρκινικών κυττάρων ως αποτέλεσμα της επίδρασης φαρμακευτικών παραγόντων είναι στενά συνδεδεμένη με τη λειτουργία μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραματικών διαδικασιών, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της ανάπτυξης αποπτωτικού φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα

ουροδόχου κύστης, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης. Η πειραματική προσέγγιση ανίχνευσης της απόπτωσης περιλάμβανε τον εντοπισμό της ενεργοποίησης μιας ομάδας πρωτεολυτικών ενζύμων, των κασπασών (Caspases), σημαντικών στην ανάπτυξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Οι κασπάσες συνθέτουν μια ομάδα πρωτεϊνικών ενζύμων, με ενδογενή ενεργότητα πρωτεάσης κυστεΐνης (CED-3/ICE πρωτεάσες), οι οποίες καθοδηγούν την ενζυμική πρωτεόλυση επιλεγμένων υποστρωμάτων σε αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος [303-306]. Οι κασπάσες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή ανενεργών πρόδρομων μορίων, οι οποίες αποκτούν λειτουργική ενεργότητα μέσω πρωτεόλυσης της αμινοτελικής τους επικράτειας και αναδιάταξης της τρισδιάστατης στερεοδομής τους στο χώρο. Με την πρωτεόλυση των εναρκτήριων κασπασών (κασπάση-8, -9, -2) λόγω ενεργοποίησης των μονοπατιών αποπτωτικού φαινοτύπου, συντελείται η πρωτεόλυση και επακόλουθη κατωρροϊκή ενεργοποίηση ενός καταρράκτη μορίων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της τελικής ή εκτελεστικής κασπάσης (κασπάση-3, -6, -7), η οποία ενορχηστρώνει και καθοδηγεί την πρωτεολυτική διάσπαση και τον κατακερματισμό δομικών στοιχείων του πυρήνα (μεταξύ άλλων) των κυττάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου [303, 305].

Τα επιμέρους πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρόδρομων κασπασών και τα προϊόντα της πρωτεολυτικής ενεργοποίησής τους (κασπάση-8, κασπάση-9 και κασπάση-3) ανιχνεύτηκαν με ανάλυση ανοσοστυπώματος Western και τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 25. Ειδικότερα, σε ότι αφορά τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, είναι προφανής η δοσο-εξαρτώμενη πρωτεολυτική ενεργοποίηση των πρόδρομων μελών του καταρράκτη των κασπασών, η οποία συντελείται με αυξανόμενο μοτίβο έντασης, πέρα από την κρίσιμη συγκέντρωση του 0,01 μM τζελνταναμυκίνης. Η πρωτεόλυση της πρόδρομης κασπάσης-8 σε πρωτεϊνικά θραύσματα μοριακού βάρους 43, 41 και 18 kDa, αναδεικνύει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης, μέσω των υποδοχέων θανάτου (εξωγενές μονοπάτι θανάτου) [304]. Παράλληλα με την κινητοποίηση και τη διέγερση των υποδοχέων θανάτου κάτω από την επίδραση αυξανόμενων

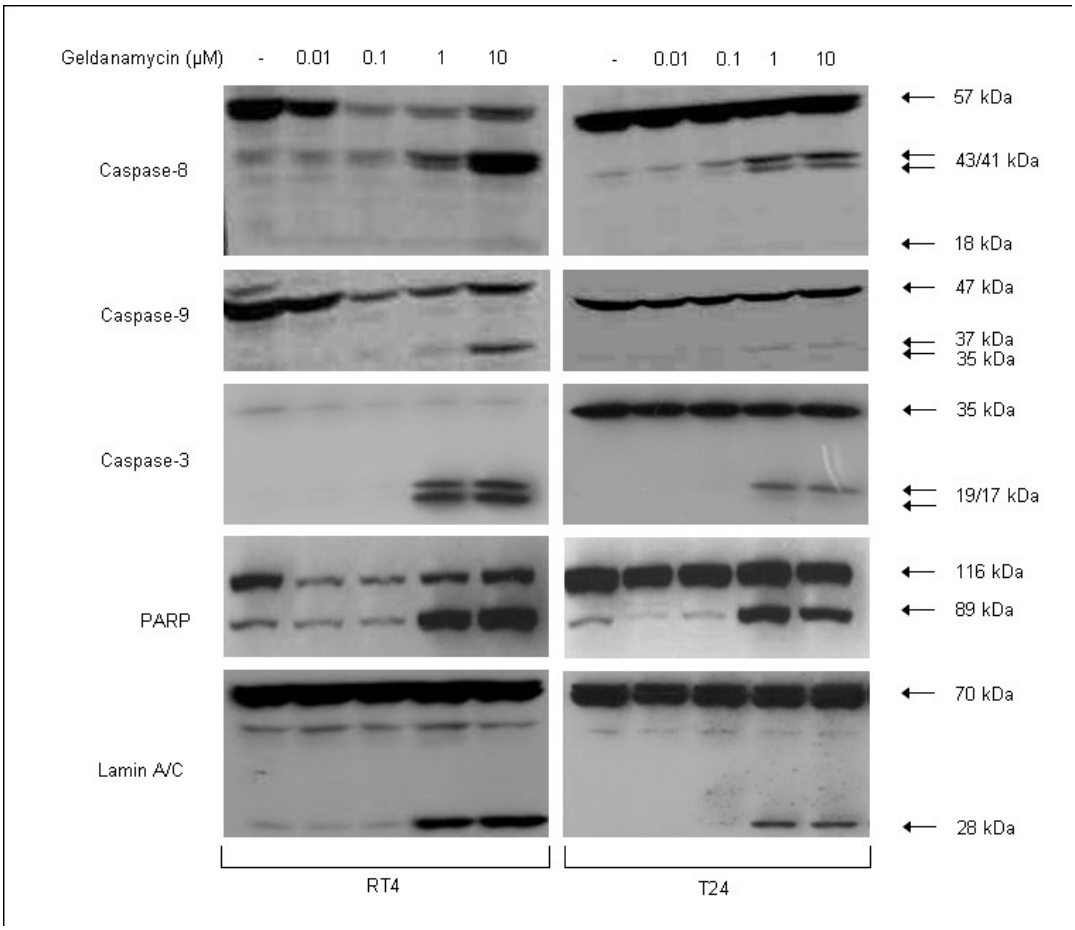
συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη πρωτεολυτική ενεργοποίηση της καση-9, με την παραγωγή θραυσμάτων μοριακού βάρους 37 και 35 kDa, γεγονός που αντανακλά την ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού μονοπατιού θανάτου (ενδογενές, μιτοχονδριακό μονοπάτι). Η απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, λόγω αποδιοργάνωσης των μιτοχονδρίων, οδηγεί σε ενεργοποίηση της προκασπάσης-9, με τη δημιουργία ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου, του αποπτωσώματος (κυτόχρωμα c, Apaf-1 και προκασπάση-9) και την κατωρροϊκή ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών [305]. Η δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση της πρόδρομης μορφής της κασπάσης-9 (μοριακό βάρος 47 kDa), ακολουθείται από την παραγωγή πρωτεϊνικών θραυσμάτων στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μM τζελνταναμυκίνης). Η ενεργοποίηση και των δύο (2) μονοπατιών θανάτου στα καρκινικά κύτταρα RT4, με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και της κασπάσης-9, οδηγεί στην ισχυρή ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3, γεγονός που αποτυπώνεται στην Εικόνα 25. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM) παρατηρήθηκε η δημιουργία πρωτεολυτικών θραυσμάτων της κασπάσης-3, σε μοριακά βάρη 19 και 17 kDa.

Σε ότι αφορά την κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας T24, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της κασπάσης-8, με την παραγωγή πρωτεολυτικών θραυσμάτων μοριακού βάρους 43 και 41 kDa, κάτω από την επίδραση των υψηλών δόσεων της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM). Επίσης, η επαγωγή του ενδογενούς μονοπατιού θανάτου, με την ανάπτυξη του αποπτωσώματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, φαίνεται να ακολουθεί ένα πιο ήπιο, από άποψη έντασης, δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο, συγκριτικά με αυτό που παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Τέλος, η επαγωγή των δύο (2) μονοπατιών θανάτου φαίνεται πως ενορχηστρώνει την ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3, με την παραγωγή των ενεργών, πρωτεϊνικών θραυσμάτων 19 και 17 kDa στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα (1 και 10 μM τζελνταναμυκίνη). Επομένως, παρατηρείται μια σαφής δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρόδρομων μορφών όλων των κασπασών που μελετήθηκαν με ταυτόχρονη

ανάπτυξη των ενεργοποιημένων πρωτεολυτικών θραυσμάτων τους στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1 και 10 μM) του χημειοθεραπευτικού παράγοντα και στις δύο (2) υπό μελέτη καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ καταδεικνύουν την ικανότητα της τζελνταναμυκίνης να επάγει δοσο-εξαρτώμενο αποπτωτικό θάνατο, με ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3 και επακόλουθη πρωτεόλυση των υποστρωμάτων της, όπως είναι οι λαμίνες (Lamin A/C) και το PARP [Poly (ADP) Ribose Polymerase], πρωτεϊνικά μόρια που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του πυρήνα (Εικόνα 25). Και για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε πρωτεολυτική αποικοδόμηση των λαμινών A/C, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM), με την παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνικών θραυσμάτων, τα οποία ανιχνεύτηκαν σε μοριακό βάρος 28 kDa. Παρόμοιο μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης ανάσχεσης της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του πυρηνικού αντιγόνου PARP, παρατηρήθηκε τόσο στα κύτταρα υψηλής (RT4), όσο και στα κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης (T4). Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην Εικόνα 25, κάτω από την κυτταροτοξική επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του παράγοντα (όπου παρατηρείται ενεργή κασπάση-3), πραγματοποιήθηκε πρωτεολυτικός κατακερματισμός του PARP, με την παραγωγή πρωτεϊνικών θραυσμάτων με μοριακό βάρος 89 kDa. Η διάσπαση των πρωτεϊνικών μορίων-υποστρωμάτων της εκτελεστικής κασπάσης-3, αν και αναδεικνύει παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης επαγωγής σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, διαφέρει ποιοτικά στη φαινοτυπική ένταση, με τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 να εμφανίζουν υψηλότερη ένταση του φαινομένου.

Συνοψίζοντας τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, ο κατακερματισμός των δομικών πρωτεϊνών του πυρήνα μέσω πρωτεολυτικής διάσπασής τους από την ενεργοποιημένη, εκτελεστική κασπάση-3, κάτω από την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, αποτελεί αδιάσειστη απόδειξη για την επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, μέσα από προγραμματισμένη

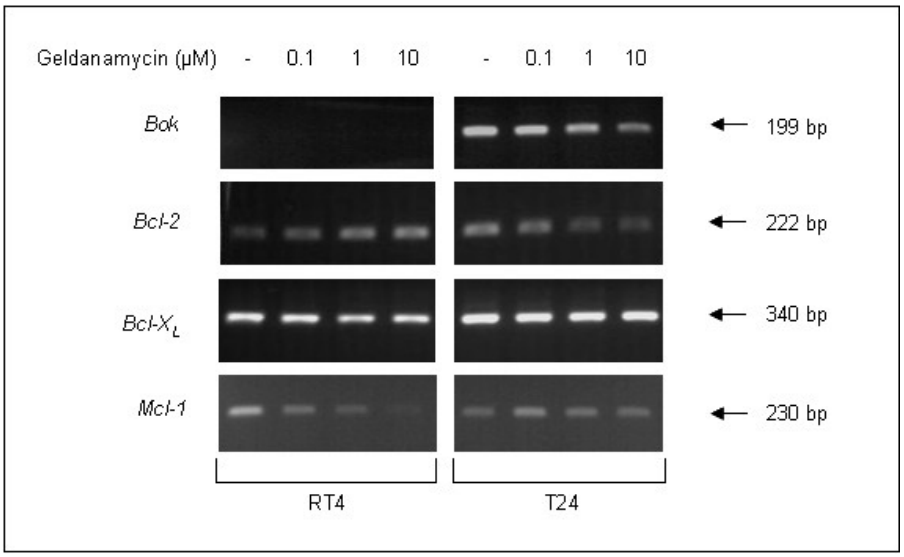
ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και πρωτεόλυση των υποστρωμάτων του μεγάλου ρεπερτορίου τους.



Εικόνα 25: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στην πρωτεολυτική ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24.

Η ανάπτυξη απόπτωσης λόγω της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την μελέτη της μεταβολής της μεταγραφικής ενεργότητας γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία ασκούν αντι-αποπτωτική δράση υποκυτταρικά, καταστέλλοντας την ανάπτυξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στην Εικόνα 26 παρουσιάζεται η μεταβολή της έκφρασης συγκεκριμένων αντι-αποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας Bcl-2, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, με τη χρήση πειραμάτων αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές σειρές

ουροδόχου κύστης RT4 και T24 παρουσίασαν δοσο-εξαρτώμενη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων *Mcl-1* και *Bcl-X*$_L$, με το πρότυπο της μειορύθμισης να είναι πιο ισχυρό στην κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η κυτταρο-ειδική ανάπτυξη διαφορικού προτύπου μεταβολής της έκφρασης του γενετικού τόπου *Bcl-2*, με τα κύτταρα RT4 να εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας, ενώ η κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας ακολουθεί ένα μοτίβο μειορύθμισης, παρόμοιο με αυτό των *Mcl-1* και *Bcl-X*$_L$. Τέλος, η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *Bok* ανέδειξε τη διαφορική ενεργότητα του συγκεκριμένου γενετικού τόπου ανά κυτταρική σειρά, με τα RT4 να μην εμφανίζουν συστατική έκφραση του γονιδίου. Τα κύτταρα T24, από την άλλη, παρουσίασαν ένα μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της μεταγραφικής ενεργότητας, με το μέγιστο της μειορύθμισης να παρατηρείται στην υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμακευτικού παράγοντα. Η διαφορική, βαθμο-ειδική συστατική έκφραση του γονιδίου *Bok* αναδεικνύει την ενδεχόμενη κλινική και προγνωστική αξία του συγκεκριμένου γενετικού τόπου ως βιολογικού δείκτη για την ακριβή σταδιοποίηση ασθενών με νεοπλασίες του ουροποιητικού συστήματος.



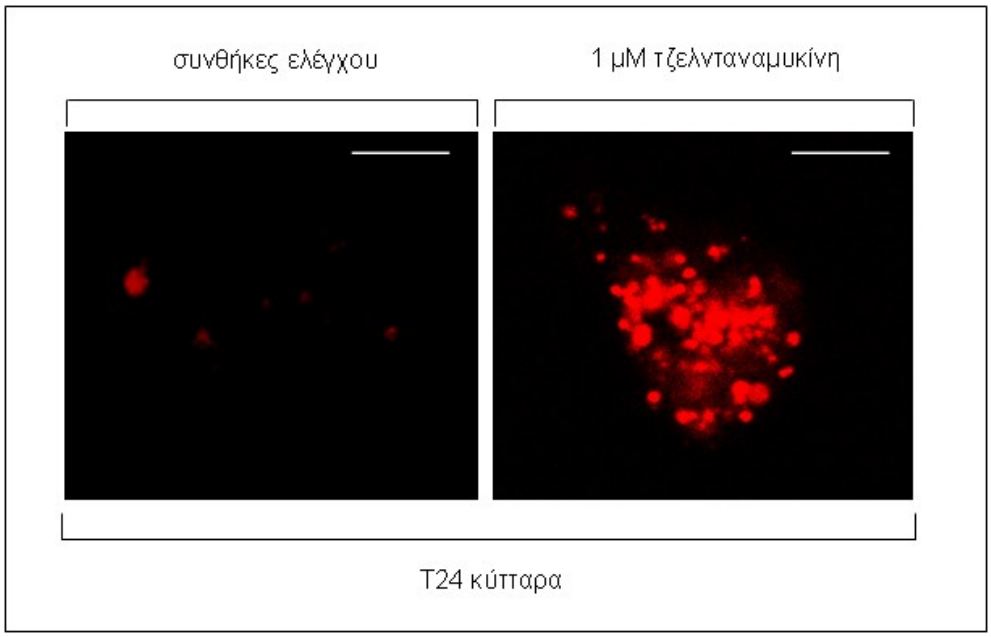
Εικόνα 26: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στην μεταγραφική ενεργότητα γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν στην καταστολή του αποπτωτικού φαινοτύπου.

Η αντι-νεοπλασματική δράση της τζελνταναμυκίνης επιβεβαιώνεται με την μειορύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην καταστολή της απόπτωσης και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ, φαίνεται πως η μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24, λόγω επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, οφείλεται στην ανάπτυξη ενδογενών μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση.

4.1.4 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης ενεργοποιεί εναλλακτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης – Αυτοφαγία

Η μείωση της βιωσιμότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη μονοπατιών προγραμματισμένου θανάτου. Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών οδηγεί στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου και το θάνατο των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Σε συνέχεια των πειραματικών δεδομένων που παρατίθενται πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση εναλλακτικών μηχανισμών ενεργοποίησης κυτταρικού θανάτου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης. Επιχειρήθηκε πιθανή ανίχνευση της ενεργοποίησης του μονοπατιού της αυτοφαγίας, με τη βοήθεια συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser. Η παρατήρηση της φαινοτυπικής ενεργοποίησης των λυσοσωμάτων σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης έγινε με τη βοήθεια μιας ειδικής φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται μη αντιστρεπτά με ενεργοποιημένα λυσοσώματα (Lysotracker Red). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 27, η επίδραση υψηλής συγκέντρωσης τζελνταναμυκίνης (1 μM) για 24 ώρες σε καρκινικά κύτταρα T24, οδήγησε στην έντονη χρώση των κυττάρων, αποκαλύπτοντας την ενεργοποίηση των

λυσοσωμάτων σε απόκριση υψηλής συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα και την επικείμενη ανάπτυξη αυτοφαγικού θανάτου.



Εικόνα 27: Ανάπτυξη αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, κάτω από την επίδραση 1 μM τζελνταναμυκίνης. Η χρώση των ενεργών λυσοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με Lysotracker Red (Sigma-Aldrich) και η παρατήρηση έγινε κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

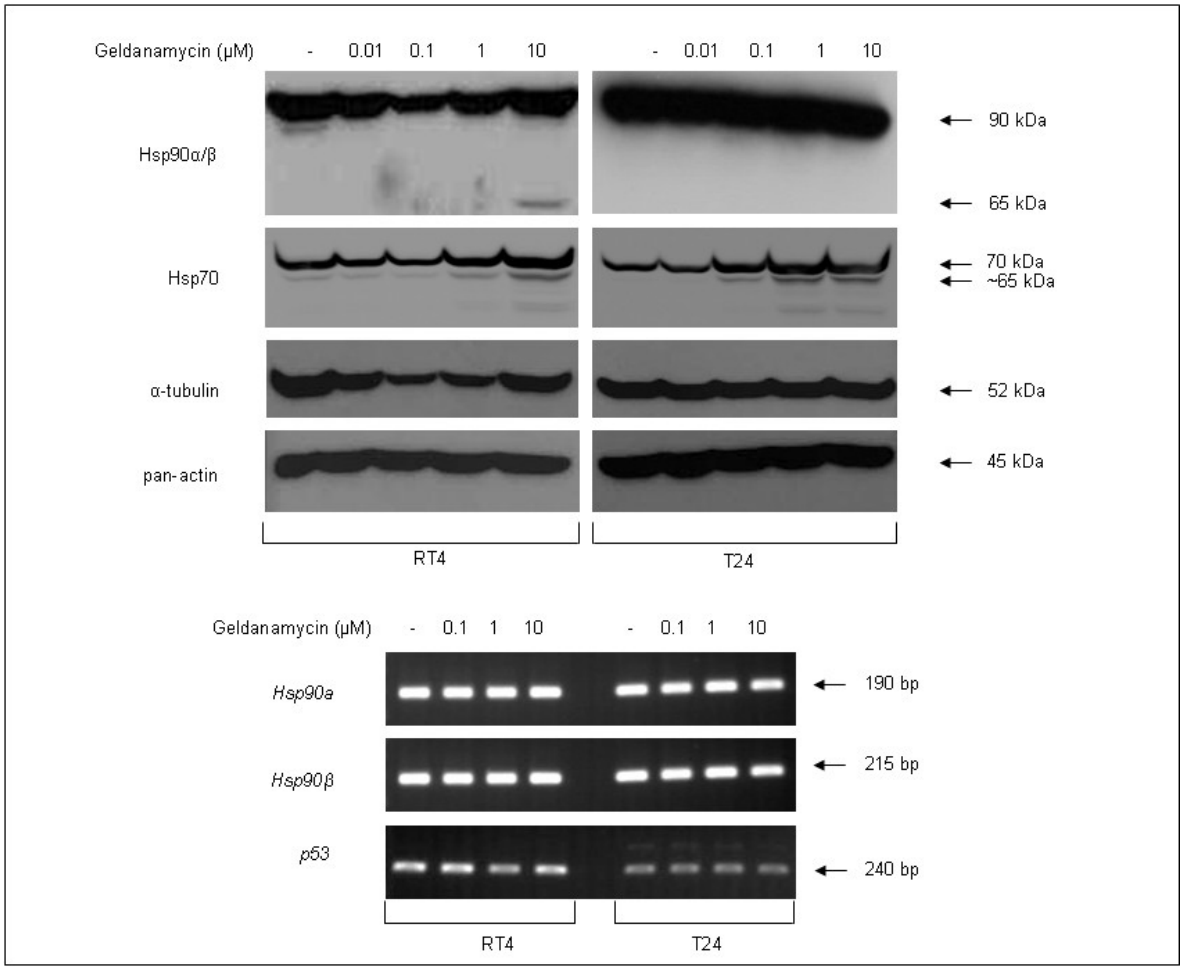
4.1.5 Τζελνταναμυκίνη και αναστολή της Hsp90

Ο κυτταροστατικός και κυτταροτοξικός χαρακτήρας της τζελνταναμυκίνης (όπως αναλύθηκε παραπάνω) οφείλεται στην ικανότητα αναστολής του μορίου-«στόχου» της, της Hsp90. Πέρα από τις πειραματικές διαδικασίες αξιολόγησης του αντι-νεοπλασματικού δυναμικού της συγκεκριμένης ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της τζελνταναμυκίνης επί της δομικής ακεραιότητας της πρωτεΐνης Hsp90 και των επιμέρους συνοδευτικών πρωτεϊνών που απαρτίζουν το ώριμο σύμπλοκο των συνοδών πρωτεϊνών, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24, με τη βοήθεια ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, τα κύτταρα (χαμηλής κακοήθειας) RT4 παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της Hsp90 ως την ενδιάμεση συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,1 μM

τζελνταναμυκίνη). Εξαιρετικά ενδιαφέρον φαινόμενο αποτελεί η επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μΜ), όπου το ομαλό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης που παρουσιάζεται στις ήπιες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα διακόπτεται. Παράλληλα, η ανίχνευση ενός προϊόντος κατακερματισμού της Hsp90 σε μοριακό βάρος ~65 kDa, κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης της τζελνταναμυκίνης, αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα, το οποίο παρουσιάζεται για πρώτη φορά στην ερευνητική βιβλιογραφία. Το πρότυπο της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90, που παρατηρείται στην κυτταρική σειρά RT4, εκλείπει από την κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας T24, όπου σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης παρουσιάζεται μοτίβο ήπιας δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης, χωρίς την παραγωγή προϊόντων κατακερματισμού του μορίου. Το πρότυπο αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της μοριακής συνοδού Hsp90 στα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, που παρουσιάζεται για πρώτη φορά εδώ, βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα μοτίβα μεταβολής πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90, όπως η Cdk4 κ.λπ.

Σε συνέχεια της επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων επιπλέον μελών του συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (Hsp70). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp70 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο και στις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (RT4 και T24). Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η ανίχνευση ενός επιπλέον πρωτεϊνικού θραύσματος σε μοριακό βάρος ελάχιστα μικρότερο από αυτό της Hsp70 (~65 kDa), το οποίο κάνει την εμφάνισή του και στις δύο (2) κυτταρικές σειρές, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μΜ στα RT4, 0,1, 1 και 10 μΜ τζελνταναμυκίνης στα καρκινικά κύτταρα T24) και παρατηρείται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Το πρότυπο της φαρμακο-

επαγόμενης παραγωγής της κατακερματισμένης ισομορφής της Hsp70 φαίνεται πως ακολουθεί ένα μοτίβο δοσο-εξαρτώμενο, σε απόκριση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα.



Εικόνα 28: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στον μοριακό του στόχο - την Hsp90 και τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου μοριακών συνοδών. Επάνω, η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μοριακών συνοδών Hsp90 και Hsp70 με μια προσέγγιση μέσω ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Hsp90α*, *Hsp90β* και *p53*, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24.

Σε μια απόπειρα ερμηνείας των επιπέδων έκφρασης της Hsp90 σε απόκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη, επιχειρήθηκε η μελέτη της έκφρασης ενός επιπλέον μέλους του συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών της Hsp90, γνωστής και ως αλληλεπιδρούσας με το καρβοξυτελικό άκρο της Hsp70 πρωτεΐνης (carboxy

terminus of Hsp70 interacting protein, ή CHIP). Η πρωτεΐνη CHIP αποτελεί μια Ε3 λιγάση ουβικουϊτίνης, η οποία ρυθμίζει το πρωτεϊνικό ισοζύγιο πολλών πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ίδιας της μοριακής συνοδού, καθοδηγώντας την αποικοδόμηση τους μέσω πρωτεασώματος [307-309]. Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λιγάσης CHIP παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, καθώς επίσης, και διαφορετικά βασικά επίπεδα έκφρασης ανά κυτταρική σειρά, με πιθανή σύνδεση της συστατικής έκφρασής τους με το βαθμό κακοήθειας των εκάστοτε υπό μελέτη κυττάρων (Εικόνα 28). Η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της λιγάσης CHIP δεν φαίνεται να υποδεικνύει έναν κεντρικό ρόλο της συγκεκριμένης λιγάσης ουβικουϊτίνης στο πρότυπο αυξομείωσης των επιπέδων της Hsp90 και συγκεκριμένων πρωτεϊνών-«πελατών» της. Πιθανή επεξήγηση της αξιοσημείωτης μεταβολής των επιπέδων της Hsp90, κάτω από την επίδραση τζελνταναμυκίνης, ενδεχομένως να αποτελεί η ύπαρξη μιας κρίσιμης συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων της λιγάσης CHIP, δηλαδή ένα «κατώφλι» ενεργοποίησης (threshold effect), με την επικείμενη πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πέρα από το συγκεκριμένο όριο να οδηγεί τη λιγάση σε μειωμένη δραστηριότητα, με αποτέλεσμα την αναστροφή της μειορύθμισης των στόχων της.

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραματικών αναλύσεων, χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς ένα σημαντικό μόριο του κυτταροσκελετού, η ακτίνη (Εικόνα 28), ενώ η α-τουμπουλίνη, ένα άλλο μέλος του δομικού δικτύου των κυττάρων, παρουσιάζει μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης αλλαγής των πρωτεϊνικών επιπέδων της όμοιο με αυτό της Hsp90 μοριακής συνοδού, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στις κυτταρικές καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης. Το συγκεκριμένο εύρημα υποστηρίζεται από πρόσφατες ερευνητικές εργασίες που συνδέουν στενά τα δύο (2) αυτά πρωτεϊνικά μόρια, καθιστώντας την τουμπουλίνη του κυτταροσκελετού *bona fide* «πελάτη» της Hsp90 [310].

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της τζελνταναμυκίνης στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των γενετικών τόπων *Hsp90α* και *Hsp90β*, που κωδικοποιούν για τις ισομορφές της πρωτεϊνικής συνοδού Hsp90, στις (2) καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης. Η συγκεκριμένη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε ώστε να διαπιστωθεί αν η διαφοροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα συμβαίνει λόγω μεταβολής των επιπέδων mRNA και του μεταγραφικού προφίλ των γονιδίων. Όπως φαίνεται πιο πάνω, στην Εικόνα 28 (κάτω), τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων *Hsp90α* και *Hsp90β* παρέμειναν αναλλοίωτα με τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, καταδεικνύοντας πως οποιαδήποτε αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της μοριακής συνοδού Hsp90, λαμβάνει χώρα σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο.

4.1.6 Η χορήγηση τζελνταναμυκίνης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της σηματοδότησης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

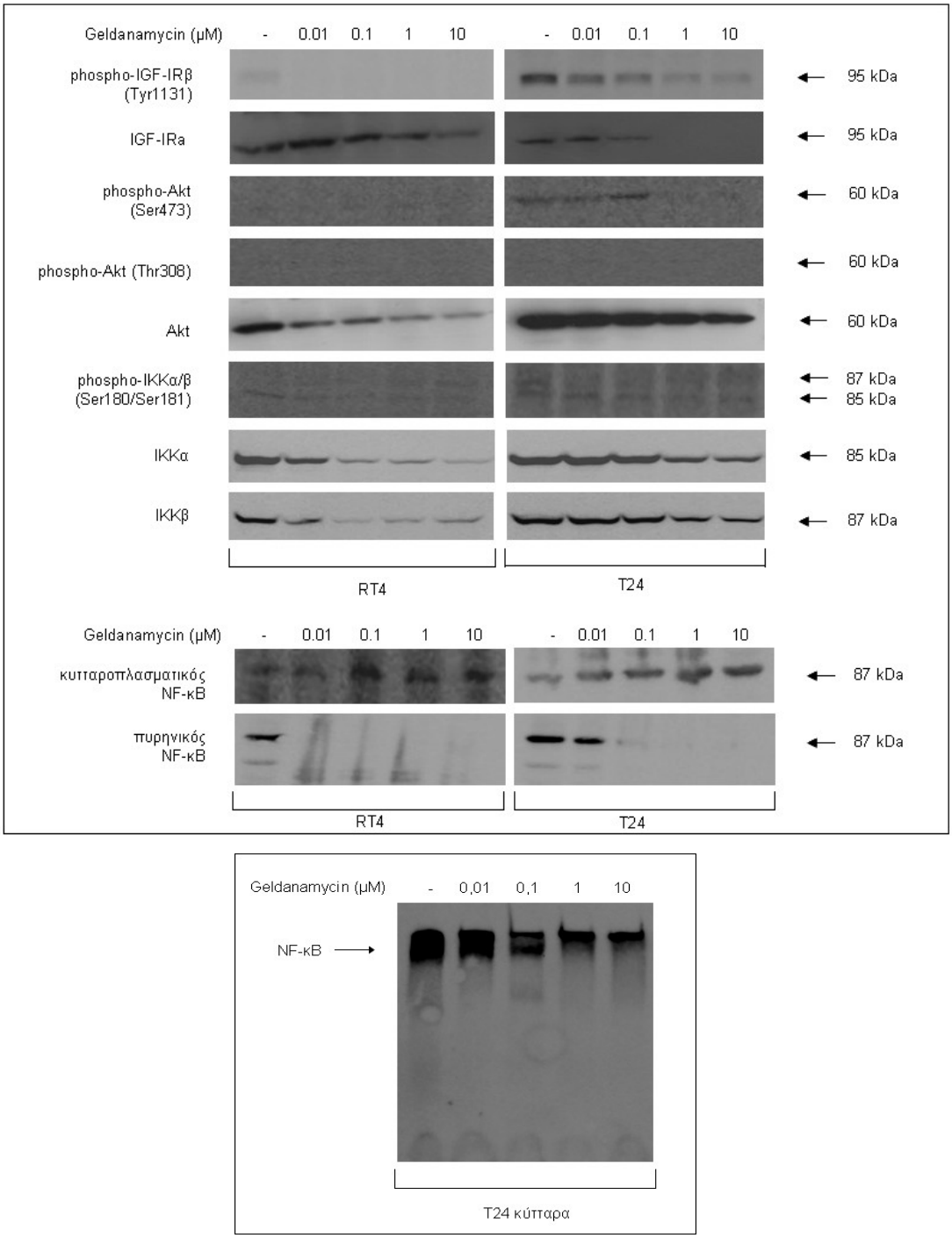
Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου τζελνταναμυκίνη σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης και η επακόλουθη αναστολή της Hsp90, ενδέχεται να οδηγήσει πολλαπλές πρωτεΐνες-«πελάτες» της τελευταίας σε απορρύθμιση της δομικής ή/και λειτουργικής τους ακεραιότητας. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι μια ποικιλία κινασών, υποδοχέων, μεταγραφικών παραγόντων, κ.λπ. Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που αναφέρονται πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της μοριακής συνοδού Hsp90 στη σηματοδότηση καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, με τη βοήθεια ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Όπως φαίνεται σαφώς στην Εικόνα 29, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων της συγκεκριμένης ανσαμυκίνης οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση ή/και εξάλειψη των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I (Insulin-like growth factor I receptor, IGF-IR), και στους δύο (2) κυτταρικούς τύπους, με

ισχυρότερη ένταση ωστόσο, στην περίπτωση των (υψηλής κακοήθειας) κυττάρων T24. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα RT4 εμφανίζουν ήπια μειορύθμιση των επιπέδων του υποδοχέα του IGF-I μέχρι και τη συγκέντρωση του 1 μM τζελνταναμυκίνης, με σημαντική καταστολή της πρωτεΐνης να παρουσιάζεται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης δόσης του παράγοντα (10 μM τζελνταναμυκίνη). Τα κύτταρα T24 παρουσιάζουν υψηλή αναστολή των επιπέδων του IGF-IR ακόμα και κάτω από τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα (0,1 μM 17-AAG), ενώ κάτω από την επίδραση των υψηλών δόσεων της ανσαμυκίνης (1 και 10 μM), τα πρωτεϊνικά επίπεδά του εξαλείφονται. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ενεργοποιημένου υποδοχέα, ο οποίος δύναται να φωσφορυλιωθεί σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης, της θέσης 1131 (Tyr1131) και να οδηγήσει στην κατωρροϊκή μεταγωγή σήματος, μέσω Akt ή MAPK μονοπατιών. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν παρουσιάζουν βασική φωσφορυλίωση του υποδοχέα του IGF-I, ενώ τα κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας) εμφανίζουν υψηλά επίπεδα συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα, με τη φωσφορυλίωση να παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενη αναστολή σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα. Η ύπαρξη υψηλών επιπέδων συστατικά φωσφορυλιωμένου υποδοχέα του IGF-I στα καρκινικά κύτταρα T24 βρίσκεται σε συμφωνία με τον αυξημένο βαθμό κακοήθειας και πιθανότατα συνεισφέρει στην ανάπτυξη του επιθετικού φαινοτύπου της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Η κυτταρο-ειδική (cell-type specific) συστατική φωσφορυλίωση του IGF-IR, καθώς και η διασύνδεσή της με αυξημένους βαθμούς κακοήθειας, αναδεικνύει την κλινική αξία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως μοριακού βιοδιαγνωστικού εργαλείου στην ταυτοποίηση όγκων ουροδόχου κύστης σε ασθενείς, με πιθανά υψηλή προγνωστική σημασία.

Ένα πολύ σημαντικό μόριο, που εντοπίζεται κατωρροϊκά του υποδοχέα IGF-I, είναι η κινάση Akt, η οποία αποτελεί και την πιο σημαντική πρωτεΐνη-«πελάτη» της μοριακής συνοδού Hsp90 [186, 311]. Η πρωτεϊνική κινάση Akt κατέχει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς αποτελεί μόριο-«κλειδί», που συμμετέχει σε πολλαπλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος [312,

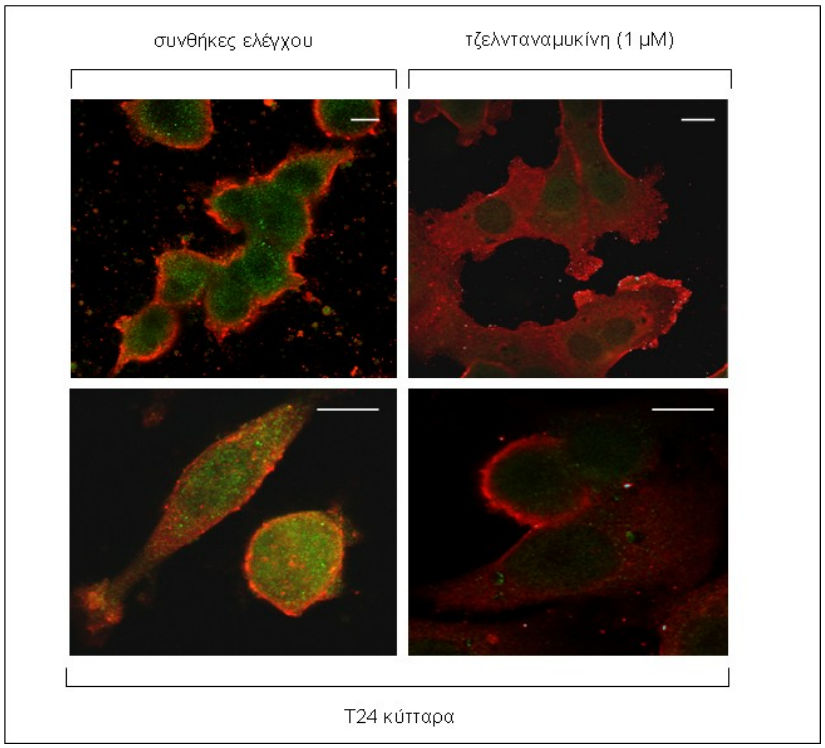
313]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της κινάσης Akt και στις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές, RT4 και T24. Πρέπει να σημειωθεί ότι η κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας (RT4) παρουσιάζει ισχυρό πρότυπο μειορύθμισης των επιπέδων της κινάσης Akt, με την μέγιστη αναστολή να επιτυγχάνεται κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (1 και 10 μM τζελνταναμυκίνη). Τα κύτταρα T24 εμφανίζουν επίσης δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο καταστολής των επιπέδων της πρωτεΐνης Akt, με σαφώς ηπιότερη ένταση, καθώς ουσιαστική μειορύθμιση εμφανίζεται σε απόκριση των υψηλότερων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα συστατικά πρωτεϊνικά επίπεδα της κινάσης Akt εμφανίζουν κυτταρο-ειδικό μοτίβο, με την καρκινική σειρά χαμηλής διαφοροποίησης T24 να εμφανίζει υψηλά επίπεδα συστατικής έκφρασης της πρωτεΐνης, συγκριτικά με την κυτταρική σειρά RT4 (χαμηλής κακοήθειας), αναδεικνύοντας την στενή σύνδεση της κινάσης Akt στη σηματοδότηση της ογκογένεσης και την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η καταστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Akt σε απόκριση υψηλής συγκέντρωσης τζελνταναμυκίνης (10 μM) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser, σε δείγματα καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης T24, με την μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας (Εικόνα 30). Η κινάση Akt (πράσινο χρώμα), έχει σημανθεί με ειδικό αντίσωμα, ενώ ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Hsp90 (κόκκινο χρώμα). Στην Εικόνα 30 φαίνεται η σαφής μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Akt κάτω από την επίδραση 10 μM τζελνταναμυκίνης (δραματική εξάλειψη της ειδικής, πράσινης χρώσης), καθώς και η αναστολή του συν-εντοπισμού της συγκεκριμένης κινάσης με την Hsp90, που παρατηρείται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (πορτοκαλί χρώμα για φυσιολογικές συνθήκες, σαφής χρωματικός διαχωρισμός κάτω από την επίδραση της ανσαμυκίνης). Με την μέθοδο αυτή, καταδεικνύεται με σαφήνεια η επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης λειτουργικής αναστολής της Hsp90 στη

διατήρηση της δομικής ακεραιότητας μιας εκ των πιο σημαντικών πρωτεϊνών-«πελατών» της, της κινάσης Akt.



Εικόνα 29: Επίδραση της τζελνταναμυκίνης στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν στον άξονα σηματοδότησης IGF-IR/Akt/IKKs, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24 (επάνω). Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης στον πυρηνικό εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με δοκιμασία μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω πρόσδεσης (EMSA).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt σε δύο (2) ειδικές θέσεις, σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης στη θέση 308 (Thr308) της πεπτιδικής αλυσίδας και σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης στη θέση 473 (Ser473). Συστατικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στο κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 308 δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όσο και σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (Εικόνα 29). Η έλλειψη συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στη θρεονίνη της θέσης 308 του πεπτιδίου, ενδεχομένως καταδεικνύει την έλλειψη ουσιαστικής συμβολής της συγκεκριμένης ενεργοποίησης στην ανάπτυξη του καρκινικού φαινοτύπου.



Εικόνα 30: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στα πρωτεϊνικά επίπεδα της κινάσης Akt σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Hsp90, κόκκινο) και της κινάσης Akt (πράσινο χρώμα), τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες (αριστερή στήλη), όσο και κάτω από την επίδραση 1 μM τζελνταναμυκίνης (δεξιά στήλη). Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 308 (Thr308), η ενεργοποίηση της κινάσης Akt με φωσφορυλίωση της σερίνης στην αμινοξική θέση 473 (Ser473) ακολουθεί ένα κυτταρο-ειδικό πρότυπο, το οποίο φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένο με το βαθμό κακοήθειας των εκάστοτε υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών (grade-dependent και cell type-specific). Τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν εμφανίζουν συστατική φωσφορυλίωση της κινάσης Akt, ενώ τα κύτταρα T24 (χαμηλής διαφοροποίησης) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στη θέση Ser473, τα οποία εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης. Πρέπει να σημειωθεί, πως κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μM), παρατηρείται ολική ανάσχεση της ενεργότητας Akt, με εξάλειψη των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κινάσης (Εικόνα 29).

Η ανάσχεση της σηματοδοτικής ικανότητας της κινάσης Akt, λόγω επίδρασης της τζελνταναμυκίνης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, οδήγησε στη μελέτη των πρωτεϊνικών μορίων που βρίσκονται κατωρροϊκά στο σηματοδοτικό άξονα IGF-IR/Akt, ώστε να διαπιστωθεί αν η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε ανάσχεση της ενεργότητας του μονοπατιού. Ενδεχόμενη καταστολή της κυτταρικής σηματοδότησης συνεπάγεται την απενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, γεγονός το οποίο προκαλεί την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας γενετικών τόπων-«στόχων», η μεταγραφή των οποίων αποτελεί την τελική απόκριση του κυττάρου στο εξωγενές σήμα. Από τις πιο γνωστές κινάσες που εντοπίζονται κατωρροϊκά της κινάσης Akt και συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα του IGF-I προς τον πυρήνα, είναι οι κινάσες IKK (IκB kinases) [256, 314, 315]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των κινασών IKK παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης και στις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, τα κύτταρα RT4 εμφανίζουν ένα πρότυπο ισχυρής δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο της IKKα, όσο και της IKKβ,

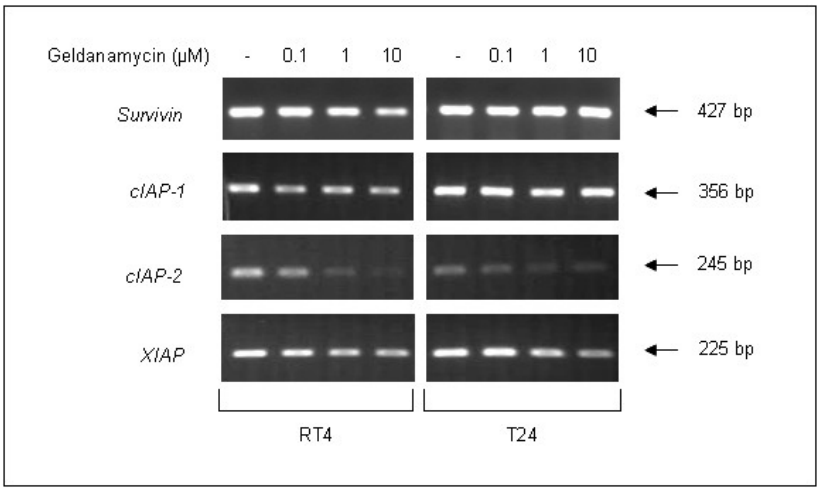
καθώς επιτελείται σημαντική καταστολή κάτω από την επίδραση της ενδιάμεσης συγκέντρωσης του παράγοντα (0,1 μM τζελντανανμυκίνη). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζουν ένα ηπιότερο μοτίβο μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων των κινασών IKK, σε απόκριση στο φαρμακευτικό παράγοντα, με το φαινόμενο να εντείνεται κάτω από την ισχυρή ανασταλτική δράση των υψηλότερων δόσεων της τζελντανανμυκίνης (1 και 10 μM). Χαρακτηριστικό στοιχείο αποτελεί η ανίχνευση υψηλότερων συστατικών πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης IKKα, συγκριτικά με αυτά της IKKβ, στις δύο (2) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Επιπλέον, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των κινασών IKKα και IKKβ (με τα T24 κύτταρα να παρουσιάζουν ελάχιστα αυξημένα επίπεδα) στα κατάλοιπα σερίνης των θέσεων 180 (Ser180) και 181 (Ser 181) αντίστοιχα. Κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελντανανμυκίνης και λόγω αναστολής της Hsp90, παρατηρείται ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αναστολής της φωσφορυλίωσης των κινασών IKK και στις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η μείωση της ενεργότητας των κινασών IKKα και IKKβ καταδεικνύει το «κλείσιμο» του συγκεκριμένου άξονα σηματοδότησης, λόγω της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελντανανμυκίνης. Οι κινάσες IKK αποτελούν *bona fide* πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90 και η αναστολή της λειτουργικής και δομικής ακεραιότητας της μοριακής συνοδού φαίνεται πως οδηγεί σε μειορύθμιση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών της κυτταρικής σηματοδότησης.

Η πολυανυσματική επίδραση της επαγόμενης από τζελντανανμυκίνη αναστολής της Hsp90 σε διάφορα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF-IR/Akt/IKK και η δραματική μείωση της μεταγωγής σήματος από την πλασματική μεμβράνη προς τον πυρήνα, οδήγησε στην μελέτη της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, τον τελικό «στόχο» του συγκεκριμένου άξονα σηματοδότησης [316]. Με τη χρήση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον πυρήνα, με τη βοήθεια της ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, τόσο τα κύτταρα

RT4 (χαμηλής κακοήθειας) όσο και τα T24 (υψηλής εξαλλαγής), παρουσιάζουν συστατικά επίπεδα μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ εντός του πυρήνα, αναδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του στην ενεργοποίηση γονιδίων που οδηγούν σε προαγωγή της εξαλλαγής και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, βρέθηκε πως η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του NF-κΒ που ανιχνεύονται εντός του πυρήνα, με το φαινόμενο να εμφανίζεται με αυξημένη ένταση στα κύτταρα RT4, καθώς από την μικρότερη συγκέντρωση του φαρμακευτικού παράγοντα (0,01 μΜ τζελνταναμυκίνης), φαίνεται πως ο NF-κΒ παραμένει εγκλωβισμένος εκτός του πυρήνα, καθώς τα επίπεδα κυτταροπλασματικού NF-κΒ αυξάνουν, γεγονός που οδηγεί σε ανάσχεση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Στα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 φαίνεται πως επάγεται δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πυρηνικών πρωτεϊνικών επιπέδων του NF-κΒ, η οποία οδηγεί σε πλήρη εξάλειψη της πρωτεΐνης στην ενδιάμεση δόση της τζελνταναμυκίνης (0,1 μΜ) και ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα που ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα. Ο πυρηνικός αποκλεισμός του μεταγραφικού παράγοντα βρίσκεται σε συμφωνία με την ανωρροϊκή ανάσχεση των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται η Akt, λόγω αναστολής της Hsp90 σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αναστολέα ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα ενισχύονται από τα αποτελέσματα των δοκιμασιών μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω πρόσδεσης (EMSA) του πυρηνικού NF-κΒ, που καταδεικνύεται στην Εικόνα 29 (κάτω). Απεικονίζεται ξεκάθαρα μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση της πρόσδεσης του ειδικού, σημασμένου (βιοτίνη) ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή με τον μεταγραφικό παράγοντα, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, γεγονός που αποδεικνύει τον τοπολογικό εγκλωβισμό του NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης.

Η πολυανυσματική επίδραση της επαγόμενης από τζελνταναμυκίνη αναστολής της Hsp90 σε διάφορα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF-IR/Akt/IKKα/β και η δραματική μείωση της μεταγωγής σήματος

(φωσφορυλίωσης) από την πλασματική μεμβράνη προς τον πυρήνα, οδήγησε στην μελέτη της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, τον τελικό «στόχο» του συγκεκριμένου άξονα σηματοδότησης. Σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρατέθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της τζελνταναμυκίνης στην μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων-«στόχων» του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, όπως είναι τα γονίδια *cIAP1*, *cIAP2*, *XIAP* και *Survivn* (Εικόνα 31). Είναι ξεκάθαρο πως σε απόκριση της αναστολής της Hsp90 από αυξανόμενες συγκεντρώσεις τζελνταναμυκίνης, τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες ευνοούν την κυτταρική επιβίωση με τον αντι-αποπτωτικό τους ρόλο, παρουσιάζουν μειορύθμιση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, αποδεικνύοντας έμμεσα την αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα NF-κB, τόσο σε καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας (T24), όσο και σε κύτταρα χαμηλής επιθετικότητας (RT4).



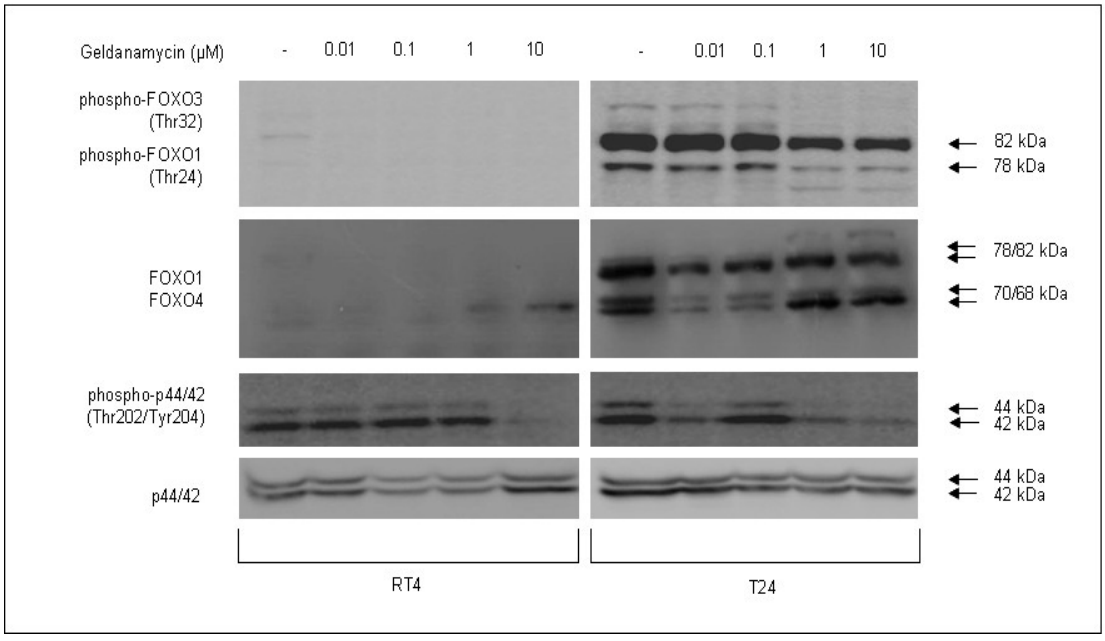
Εικόνα 31: Ο πυρηνικός αποκλεισμός του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση τζελνταναμυκίνης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του ανωτέρω παράγοντα *cIAP1*, *cIAP2*, *XIAP* και *Survivin* σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της ανάσχεσης της ενεργότητας της κινάσης Akt λόγω φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 σε μια ομάδα κατωρροϊκών μεταγραφικών παραγόντων, των παραγόντων FOXO (Forkhead box O transcription factors), η δράση των οποίων είναι στενά

συνδεδεμένη με την αναστολή ενεργοποίησης μονοπατιών κυτταρικού θανάτου [317-319]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1 (μοριακό βάρος 78 kDa) παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με το φαινόμενο να εντοπίζεται ισχυρότερο στην καρκινική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του παράγοντα FOXO4 (μοριακό βάρος 68 kDa) παρουσιάζει όμοιο πρότυπο αυξομείωσης με αυτό της Hsp90 και της α-τουμπουλίνης που παρατηρήθηκαν πιο πάνω για τις κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης, οι οποίες μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής. Παρατηρείται λοιπόν μια χαρακτηριστική μεταστροφή των πρωτεϊνικών επιπέδων της ζώνης που συστατικά ανιχνεύεται έντονα σε μοριακό βάρος 70 kDa, καθώς παρατηρείται ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της, η οποία ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων της FOXO πρωτεΐνης που εντοπίζεται σε μοριακό βάρος 68 kDa, με τα μέγιστα επίπεδα ανίχνευσης να παρατηρούνται κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του παράγοντα. Το συγκεκριμένο μοτίβο παρατηρείται και στις δύο (2) υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, με χαρακτηριστική ένταση για τα κύτταρα T24, κάτω από την ανασταλτική δράση 1 και 10 μM τζελνταναμυκίνης.

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε ο εντοπισμός της μεταβολής της φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων FOXO στο κατάλοιπο θρεονίνης στη θέση 32 (Thr32) του παράγοντα FOXO3 και στο κατάλοιπο θρεονίνης στη θέση 24 (Thr24) του παράγοντα FOXO1. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 32, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν ανιχνεύεται συστατική φωσφορυλίωση σε καμία από τις δύο (2) αμινοξικές θέσεις, ενώ το πρότυπο φαίνεται πως έχει κύτταρο-ειδικό μοτίβο, καθώς τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης και των δύο (2) μεταγραφικών παραγόντων. Τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης των FOXO παρουσιάζουν, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης, η οποία καθίσταται σημαντική κάτω από την επίδραση

των υψηλότερων συγκεντρώσεων της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μM). Η αναστολή της φωσφορυλίωσης των FOXO σε απόκριση της κυτταροτοξικής επίδρασης του αντιβιοτικού ανσαμυκίνης, οδηγεί στην επακόλουθη απελευθέρωση των παραγόντων στον πυρήνα των κυττάρων, όπου ενεργοποιούν την μεταγραφή γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πολλαπλά προ-αποπτωτικά πρωτεϊνικά μόρια, διευκολύνοντας την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, καταδεικνύεται πως η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε «ευαισθητοποίηση» των καρκινικών κυττάρων, καθώς αναστέλλονται σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, ενώ ενεργοποιούνται σηματοδοτικά δίκτυα τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 32: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη στην κυτταρική σηματοδότηση των FOXO μεταγραφικών παραγόντων (επάνω) και των MAP κινασών p44/42 (Erk1/2, κάτω) σε RT4 και T24 καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Σε συνέχεια των αποτελεσμάτων που παρατίθενται πιο πάνω, επιχειρήθηκε η ανίχνευση της επίδρασης της τζελνταναμυκίνης στη σηματοδότηση πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα

(mitogen activated protein kinases, MAP kinases). Το περίπλοκο δίκτυο μεταγωγής σήματος από MAP κινάσες είναι στενά συνυφασμένο με τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η κινάση Akt, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται αλληλοσυμπλήρωση και συνεργισμός. Η σηματοδότηση MAPK είναι στενά συνδεδεμένη με την ανάπτυξη και την προαγωγή σημαντικών λειτουργικών χαρακτηριστικών του καρκινικού φαινοτύπου (π.χ. κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμός, διήθηση παρακείμενων ιστών, μετανάστευση) [320-322]. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην Εικόνα 32, η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των MAP κινασών p44/42 (γνωστές και ως κινάσες Erk1/2) σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, μετά από χορήγηση τζελνταναμυκίνης, παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο αυξομείωσης με αυτό που παρουσιάζει η Hsp90, δηλαδή ένα κυτταρο-ειδικό πρότυπο μεταβολής. Τα καρκινικά κύτταρα RT4 (χαμηλής κακοήθειας) εμφανίζουν αρχικά δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των κινασών p44/42 μέχρι τη συγκέντρωση του 1 μM τζελνταναμυκίνης, η οποία διακόπτεται από επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων στην υψηλότερη δόση (10 μM τζελνταναμυκίνης). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζουν μια ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p44/42, η οποία προκύπτει από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM τζελνταναμυκίνης). Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική επίδραση της τζελνταναμυκίνης στη σηματοδότηση των κινασών p44/42, επιχειρήθηκε η ανίχνευση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών σε κατάλοιπα θρεονίνης της θέσης 202 (Thr202) για την p44 ή Erk1 και σε κατάλοιπα τυροσίνης της θέσης 204 (Tyr204) για την p42 ή Erk2, σε ανταπόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, παρατηρείται συστατική φωσφορυλίωση των κινασών p44/42 και στις δύο (2) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας. Το πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, είναι παρόμοιο και για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές, με τα κύτταρα RT4 να εμφανίζονται πιο ανθεκτικά, καθώς η ολική εξάλειψη της

φωσφορυλίωσης επιτυγχάνεται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης δόσης του παράγοντα (10 μΜ τζελνταναμυκίνη). Η κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας Τ24 εμφανίζει εντονότερο μοτίβο καταστολής της φωσφορυλίωσης των κινασών p44/42, καθώς παρατηρείται υψηλή απενεργοποίηση των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων στις υψηλές συγκεντρώσεις της τζελνταναμυκίνης (1 και 10 μΜ). Η ανάσχεση της σηματοδότησης p44/42 οδηγεί στην αναστολή πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων-«στόχων» που εντοπίζονται κατωρροϊκά (εντός του πυρήνα) και συμμετέχουν στην μεταγραφή γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και γενικά την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής [323-325].

4.2 Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

4.2.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου

Μετά την μελέτη της αντι-νεοπλασματικής δράσης του φυσικού παράγοντα τζελνταναμυκίνη σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, πραγματοποιήθηκε πειραματική ανάλυση των νεότερων ημισυνθετικών μελών της οικογένειας των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, 17-AAG και 17-DMAG, στο ίδιο βιολογικό σύστημα, με σκοπό την αξιολόγηση της δραστικότητας τους και τη σύγκρισή τους με την πρωτότυπη χημική ένωση. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικές σειρές διαφορετικού βαθμού κακοήθειας, που προέρχονται από καρκίνο ανθρώπινης ουροδόχου κύστης.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση του ημισυνθετικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην πορεία του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης RT4, RT112 και Τ24, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (δοκιμασία

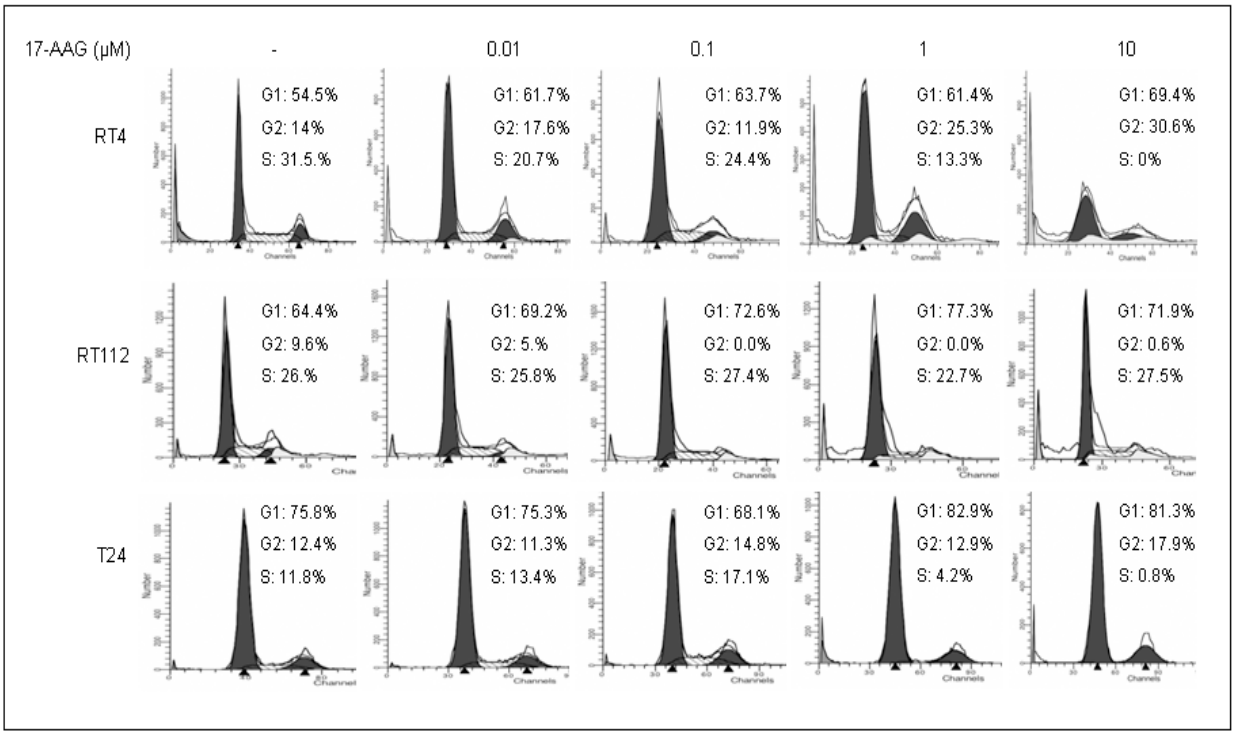
FACS). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 33, τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 υπόκεινται αναστολή του κυτταρικού κύκλου κατά την μετάβαση από την φάση G1 στη φάση διπλασιασμού S (σημείο ελέγχου G1/S), με το επιμέρους ποσοστό των κυττάρων που αναλογεί στο συγκεκριμένο κλάσμα του κυτταρικού κύκλου να αυξάνει από 54,5% του συνολικού αριθμού καταμετρημένων κυττάρων στις συνθήκες ελέγχου ως και 69,4% κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG). Παράλληλα με την ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1, παρατηρείται μια δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της μετάβασης των καρκινικών κυττάρων από τη φάση G2 στη φάση M (G2/M σημείο ελέγχου), με το επιμέρους ποσοστό των καταμετρημένων κυττάρων από 14% σε συνθήκες ελέγχου να αυξάνεται σε 30,6% στη συγκέντρωση 10 μM 17-AAG. Σε ότι αφορά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου της καρκινικής σειράς RT112 (ενδιάμεσης κακοήθειας) κάτω από την επίδραση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, είναι σαφές πως παρατηρείται συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G1 του κύκλου, με το επιμέρους ποσοστό των καταμετρημένων κυττάρων από 64,4% σε συνθήκες ελέγχου να οδηγείται σε χαρακτηριστική δοσο-εξαρτώμενη αύξηση (77,3%), κάτω από την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-AAG). Η ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1 φαίνεται να συνοδεύεται από κατακράτηση κυττάρων στη φάση S (ήπια αύξηση του επιμέρους ποσοστού κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση, 10 μM 17-AAG), με το συνολικό ποσοστό των κυττάρων να παραμένει σταθερό, ενώ παράλληλα καταδεικνύεται ένα πρότυπο γραμμικής, δοσο-εξαρτώμενη μείωσης των κυττάρων που συσσωρεύονται στην φάση G2, με αποτέλεσμα να μηδενίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,1-10 μM 17-AAG).

Τέλος, στα καρκινικά κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας), η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG φαίνεται πως προκαλεί σχετικά ήπια ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1, με το επιμέρους ποσοστό των κυττάρων που καταμετρώνται στο συγκεκριμένο κλάσμα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες να αγγίζει το 75,8%, ενώ η μέγιστη συσσώρευση

κυττάρων στη G1 φάση παρατηρείται κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG (82,9%). Το επιμέρους ποσοστό των T24 που δεν υπερβαίνουν το σημείο ελέγχου G1/S υπολογίζεται στο 81,3% των συνολικά καταμετρημένων κυττάρων για την υψηλότερη συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM), καταδεικνύοντας την ήπια αναστολή του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας κάτω από την επίδραση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG. Επίσης, εκτός από την αναστολή του κύκλου στο σημείο μετάβασης G1/S, παρατηρήθηκε και ήπια αύξηση του κλάσματος των κυττάρων που συσσωρεύτηκαν στη φάση G2, με το επιμέρους ποσοστό να ακολουθεί δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο αύξησης, από 12,4% κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, σε 17,9% για την υψηλότερη συγκέντρωση του 17-AAG (10 μM). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι και για την κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας T24, τα ποσοστά κυττάρων που καταμετρήθηκαν στη φάση S του κύκλου, ακολούθησαν ένα πρότυπο γραμμικής ελάττωσης, με το ποσοστό να αγγίζει το μηδέν (0,8%) κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στην σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Το πρότυπο απόκρισης των κυττάρων της ουροδόχου κύστης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 17-AAG καταδεικνύει την συσσώρευση κυττάρων στα κλάσματα G1 και G2 για τις κυτταρικές σειρές RT4 και T24, ενώ τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 ανακόπτουν την μιτωτική τους πορεία στα κλάσματα G1 και S, αναδεικνύοντας ένα κυτταρο-ειδικό μοτίβο αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 33).

Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μελετήθηκε περαιτέρω, καθώς πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των επιμέρους επιπέδων έκφρασης γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν την μετάβαση των κυττάρων από το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G1, προωθώντας την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του 17-AAG στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα κυκλινών/κυκλινοεξαρτώμενων κινασών

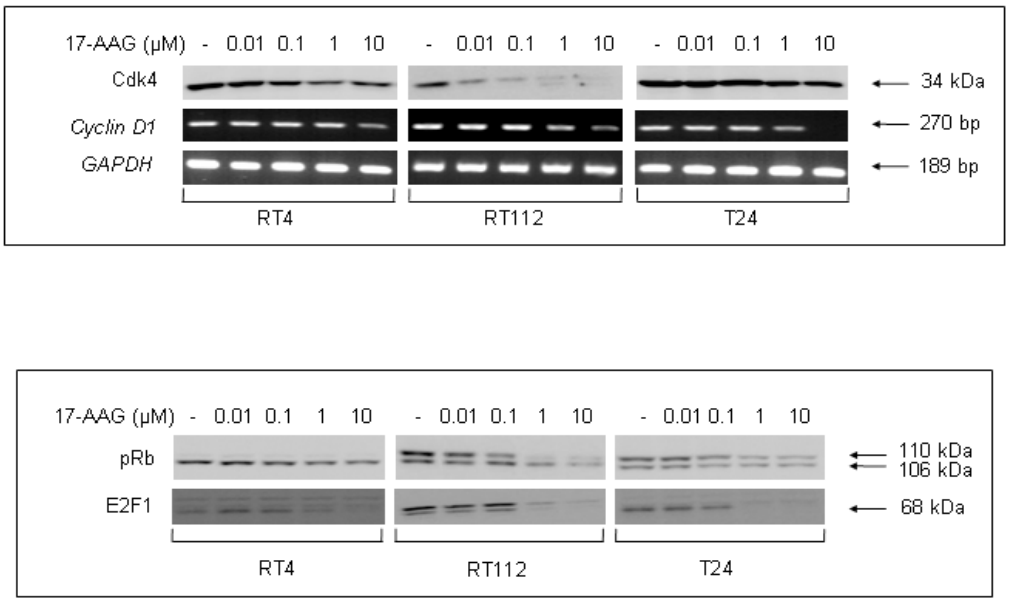
(cyclin/cyclin dependent kinase), συγκεκριμένα στο σύμπλοκο της κυκλίνης D1 με την κινάση Cdk4, το οποίο είναι επιφορτισμένο με την μετάβαση των κυττάρων από τη G1 φάση του κύκλου, στη φάση διπλασιασμού του γενετικού υλικού S.



Εικόνα 33: Ενδεικτικά αποτελέσματα μεταβολής των κλασμάτων του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης κάτω από την επίδραση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG.

Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 34, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 4 (Cdk4) και για τις τρεις (3) καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής. Το πρότυπο της μειορύθμισης των επιπέδων της κινάσης Cdk4 στα κύτταρα RT4 φαίνεται πως είναι δοσο-εξαρτώμενο, μέχρι τη συγκέντρωση του 1 μM 17-AAG, καθώς το μοτίβο της γραμμικής μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης φαίνεται πως διακόπτεται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), με τα επίπεδα της Cdk4 να εμφανίζουν επακόλουθη αύξηση.

Αξίζει να σημειωθεί πως παρόμοιο πρότυπο αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Cdk4 στην καρκινική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4 παρατηρήθηκε κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων τζελνταναμυκίνης, όπως αναλύθηκε παραπάνω (βλέπε κεφάλαιο 4.1.1). Η κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 φαίνεται πως παρουσιάζει το ισχυρότερο πρότυπο φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Cdk4, καθώς από την ενδιάμεση συγκέντρωση των 0,1 μM 17-AAG, παρατηρείται δραματική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων, με επακόλουθη εξάλειψη της πρωτεΐνης στις υψηλότερες δόσεις του παράγοντα (1 και 10 μM).



Εικόνα 34: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG στην έκφραση πρωτεϊνών-«κλειδιά» στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επάνω, επίδραση του 17-AAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης Cdk4 και στην μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου της κυκλίνης D1 (*Cyclin D1*). Ο γενετικός τόπος *GAPDH* χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Κάτω, επίδραση του 17-AAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1.

Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 φαίνεται πως παρουσιάζουν ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της κινάσης Cdk4, με την μειορύθμιση να είναι αισθητή κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του 17-AAG. Παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης παρατηρείται και στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του

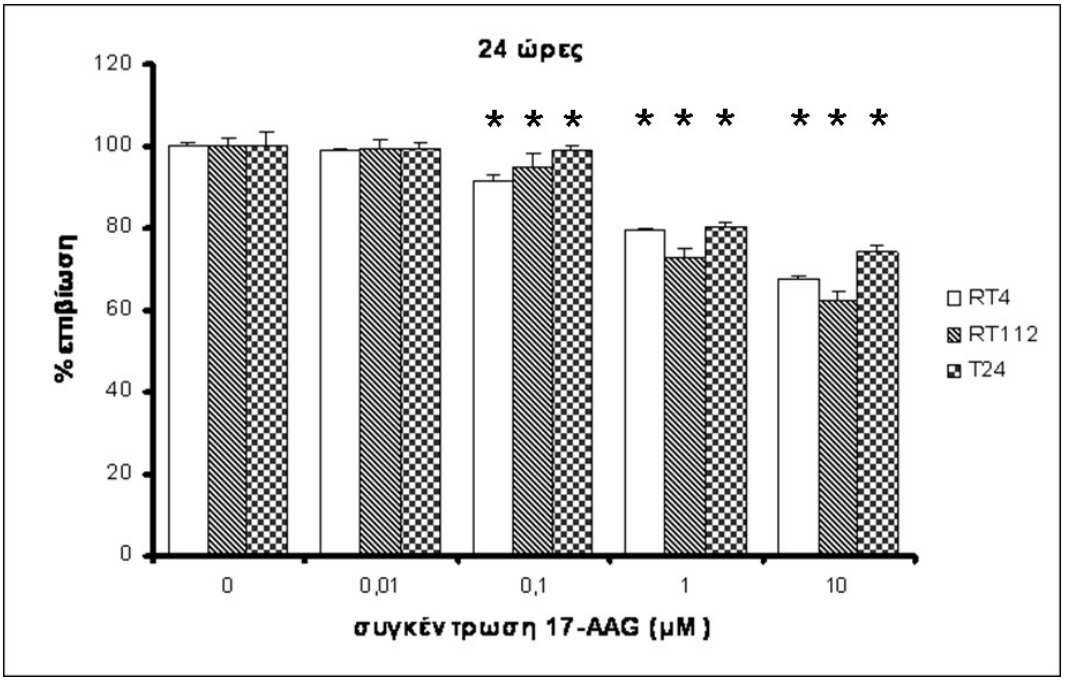
γενετικού τόπου που κωδικοποιεί για την κυκλίνη D1 (*Cyclin D1*), με τα κύτταρα T24 να παρουσιάζουν την πιο ισχυρή αναστολή έκφρασης στην υψηλότερη συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), με πλήρη εξάλειψη της μεταγραφικής ενεργότητας (Εικόνα 34). Οι καρκινικές σειρές χαμηλής (RT4) και ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας εμφανίζουν ηπιότερο πρότυπο καταστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *Cyclin D1*, με την μείωση να καθίσταται εμφανής, κάτω από την επίδραση των υψηλών δόσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει άμεση συσχέτιση της μειορύθμισης της *Cyclin D1* και της κινάσης Cdk4 με την παρατηρούμενη ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στο σημείο ελέγχου της φάσης G1, κάτω από την επίδραση του παράγοντα 17-AAG.

Σε συνέχεια της μελέτης πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν την ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, επιχειρήθηκε η ανίχνευση της επίδρασης του 17-AAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), που θεωρούνται μόρια-«κλειδιά» στην πορεία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα ενεργότητας του πρωτεϊνικού συμπλόκου Cdk4/Cyclin D1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34, παρατηρείται μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών pRb και E2F1 και για τις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (βλέπε κεφάλαιο 4.1.1), εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν παρουσιάζουν συστατική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), σε αντίθεση με τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24. Στο πλαίσιο της μελέτης του χημειοθεραπευτικού αναλόγου της τζελνταναμυκίνης 17-AAG, καταδεικνύεται πως και η κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 φέρει φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb κάτω από συνθήκες ελέγχου, γεγονός που τη διαχωρίζει από τη σειρά υψηλής διαφοροποίησης RT4 και αναδεικνύει την πιθανή προγνωστική σημασία του συγκεκριμένου φαινοτυπικού γνωρίσματος στη σταδιοποίηση της καρκινικής εξαλλαγής της ουροδόχου κύστης. Τα

επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, για τις καρκινικές σειρές ενδιάμεσης και υψηλής κακοήθειας, επιδεικνύουν δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο μειορύθμισης, σε απόκριση αυξανόμενων δόσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με τα κύτταρα RT112 να εμφανίζουν την ισχυρότερη καταστολή, αφού τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης εξαλείφονται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του 17-AAG (1 και 10 μM). Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, ενισχύουν την παρατηρούμενη ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στη φάση G1, η οποία παρατηρείται σε απόκριση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, καθώς η κινάση Cdk4, η κυκλίνη D1, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1, σχετίζονται άμεσα με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ομαλή διάβαση των κυττάρων από το σημείο ελέγχου G1/S. Στο κεφάλαιο αυτό αναδεικνύεται σαφώς ο κυτταροστατικός χαρακτήρας του χημικού ημισυνθετικού αναλόγου 17-AAG, το οποίο ενορχηστρώνει την αναστολή του μιτωτικού δυναμικού των εξαλλαγμένων κυττάρων, συνεισφέροντας στον έλεγχο των ογκογονικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των νεοπλασματικών κυττάρων.

4.2.2 Το 17-AAG εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

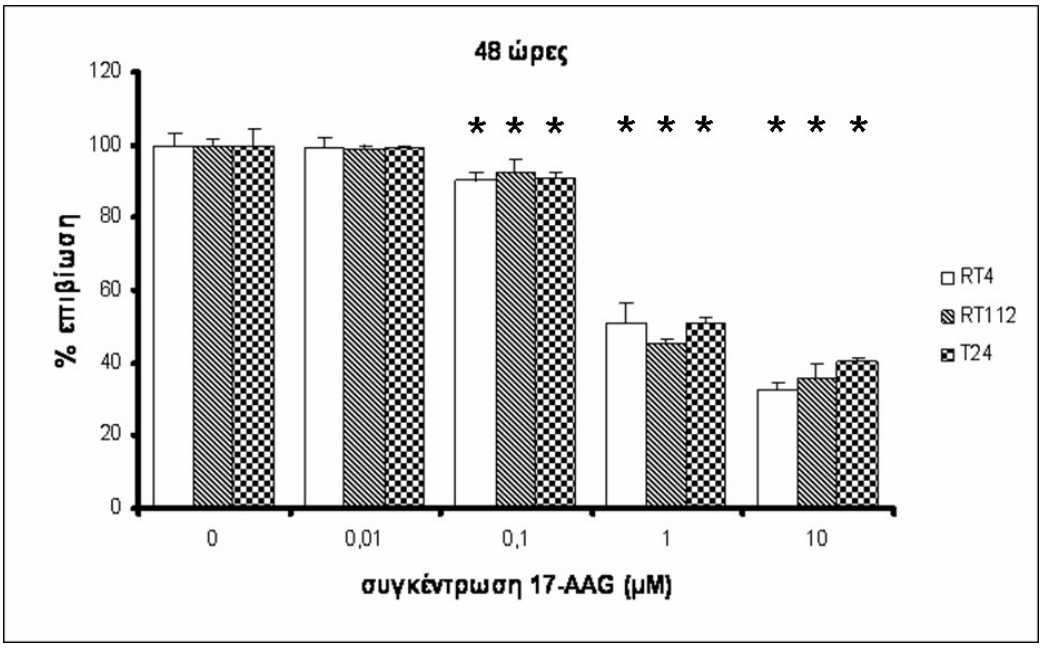
Για να εκτιμηθεί η βιολογική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες μέτρησης της μεταβολικής ενεργότητας των μιτοχονδρίων (MTT) σε κύτταρα RT4, RT112 και T24. Οι κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με λογαριθμικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ημισυνθετικού αντιβιοτικού ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης για 24 και 48 ώρες, χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές μετρήσεις.



Εικόνα 35: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-AAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 24 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, p<0,05).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 35 και 36, και οι τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές παρουσίασαν φαρμακο-επαγόμενη, δοσο-εξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας τους, τόσο στην μέτρηση των 24 ωρών, όσο και στην μέτρηση των 48 ωρών. Τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρουσιάζουν ένα ήπιο πρότυπο μείωσης της κυτταρικής επιβίωσης σε χρονικό διάστημα 24 ωρών (Εικόνα 35), με τη βιωσιμότητα να παραμένει αναλλοίωτη για τις χαμηλότερες δόσεις του παράγοντα (έως και 0,1 μM 17-AAG) και το ποσοστό της επιβίωσης να ξεπερνά το 90%. Στις υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου (1 και 10 μM 17-AAG) καταγράφεται γραμμική πτώση της επιβίωσης των κυττάρων σε απόκριση της αυξανόμενης τοξικότητας, με το ποσοστό βιώσιμων κυττάρων να μην ξεπερνά το 70% για την υψηλότερη δόση. Τα (ενδιάμεσης κακοήθειας) καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 φαίνεται πως είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-AAG σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο ελάττωσης της βιωσιμότητας, με τις επιμέρους τιμές να καταγράφουν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης ανά συγκέντρωση του 17-AAG

(ποσοστό μικρότερο του 65% για τη συγκέντρωση των 10 μM). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, παρουσιάζονται ελαφρώς πιο ανθεκτικά στην κυτταροτοξική επίδραση του φαρμάκου (Εικόνα 35), με το πρότυπο της βιωσιμότητας να εμφανίζει μικρά ποσοστά μείωσης σε απόκριση ακόμα και των υψηλότερων δόσεων του χημειοθεραπευτικού, με τη επιβίωση να ξεπερνά το 80%.



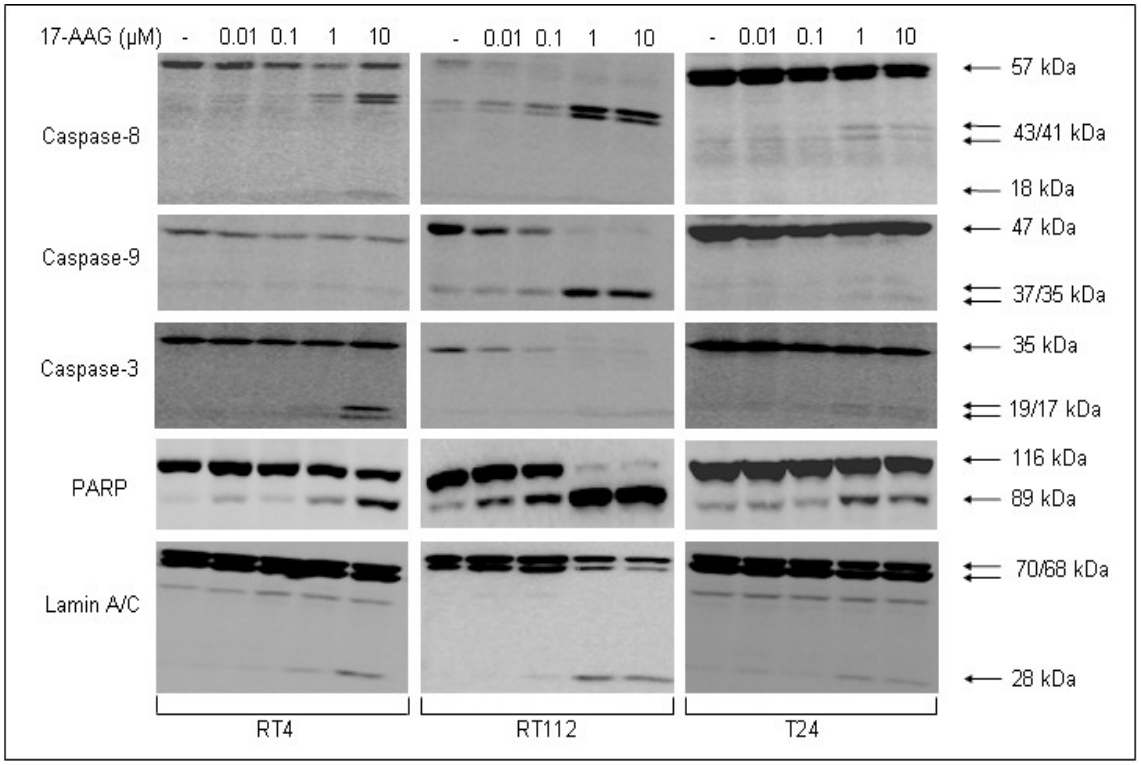
Εικόνα 36: Επίδραση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-AAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 48 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, p<0,05).

Στην Εικόνα 36 φαίνεται ξεκάθαρα η σημαντική μείωση της επιβίωσης των τριών (3) καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης, μετά από επώαση γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων του 17-AAG, στις πειραματικές μετρήσεις των 48 ωρών. Οι δοκιμασίες μέτρησης της μεταβολικής ενεργότητας των μιτοχονδρίων, μετά από 48ωρη επώαση με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα, διατηρούν το δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μείωσης που παρατηρείται και στις 24 ώρες, με τις κυτταρικές σειρές να παρουσιάζονται ανθεκτικές στις χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου και το επιμέρους ποσοστό επιβίωσης (για τα κύτταρα RT4, RT112 και T24) να ξεπερνά το 90%, στην ενδιάμεση δόση του 0,1 μM 17-AAG. Όπως

καταδεικνύεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 36, κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μΜ), τα ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης μειώνονται δραματικά και για τις τρεις (3) σειρές, ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας, σε τιμές που κυμαίνονται από 30% (RT4) έως και 40% (T24). Από την ανάλυση επιβίωσης στις 24 και τις 48 ώρες επώασης με το φάρμακο, γίνεται σαφές ότι κύτταρα τα οποία καταμετρώνται ζωντανά στις πειραματικές μετρήσεις των 24 ωρών, είναι επί της ουσίας δεσμευμένα σε ανάπτυξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, γεγονός που επεξηγεί την μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα που παρατηρείται στις 48 ώρες επώασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα.

4.2.3 Το 17-AAG ενεργοποιεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου

Η μείωση της επιβίωσης καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, είναι στενά συνδεδεμένη με την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου. Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που κατέδειξαν την κυτταροτοξική επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των κασπασών, οι οποίες καταλαμβάνουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, μέσω ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Τα επιμέρους πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης και πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των κασπασών (κασπάση-8, κασπάση-9 και κασπάση-3), σε απόκριση κυτταροτοξικών δόσεων του 17-AAG, παρουσιάζονται στην Εικόνα 37. Φαίνεται σαφώς μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρόδρομων μορφών των κασπασών και ακόλουθη ανάπτυξη πρωτεολυτικών θραυσμάτων τους στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης.



Εικόνα 37: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Πιο αναλυτικά, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, φαίνεται πως η πρόδρομη μορφή της κασπάσης-8 (57 kDa) ακολουθεί ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης, με παράλληλη ανάπτυξη των πρωτεολυτικών θραυσμάτων (43 και 41 kDa) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του 17-AAG (1 και 10 μM). Κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), το φαινόμενο της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών είναι εντονότερο, με την ανίχνευση μιας πρωτεϊνικής ζώνης σε μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε 18 kDa, το οποίο επίσης, αποτελεί προϊόν πρωτεολυτικής επεξεργασίας της πρόδρομης κασπάσης-8. Σε ότι αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρόδρομης κασπάσης-9, εμφανίζουν μια ήπια ελάττωση κάτω από αυξανόμενες δόσεις του 17-AAG, χωρίς ωστόσο να ανιχνεύεται παράλληλη ανάπτυξη πρωτεολυτικών θραυσμάτων σε μοριακά βάρη 35 και 37 kDa. Τέλος, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση της πρόδρομης, εκτελεστικής κασπάσης-3, με το φαινόμενο να αναπτύσσεται στην μέγιστη έντασή του κάτω από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1 και 10

μΜ) και την επακόλουθη πρωτεολυτική ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μορίου να αντανακλά την ανάπτυξη του αποπτωτικού φαινοτύπου (πρωτεϊνικά θραύσματα σε μοριακά βάρη 19 και 17 kDa).

Η κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 εμφανίζει ισχυρό πρότυπο μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων των πρόδρομων μορίων που απαρτίζουν το μονοπάτι των κασπασών, με την παράλληλη πρωτεολυτική ενεργοποίηση των επιμέρους μορίων να ανιχνεύεται κάτω από την επίδραση της ενδιάμεσης συγκέντρωσης του παράγοντα (0,1 μΜ 17-AAG) και να παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις 17-AAG (1 και 10 μΜ). Επίσης, παρατηρείται πλήρης εξάλειψη των πρόδρομων μορίων των κασπασών (κασπάσες-8, -9 και -3) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1 και 10 μΜ), με τον μηχανισμό ανάπτυξης αποπτωτικού φαινοτύπου να οδηγείται σε πλήρη εφαρμογή. Χαρακτηριστικό φαινόμενο αποτελεί η έντονη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα RT112 κύτταρα, γεγονός το οποίο φαίνεται πως έχει κυτταρο-ειδικό χαρακτήρα, καθώς, στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας, δεν παρατηρείται έντονη πρωτεόλυση της κασπάσης-9. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ισχυρή ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού κυτταρικού θανάτου, με την αποδιοργάνωση των μιτοχονδρίων, την ανάπτυξη ώριμου αποπτωσώματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία συνεισφέρει στην κατωρροϊκή ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3.

Η καρκινική κυτταρική σειρά Τ24 (υψηλής κακοήθειας) εμφανίζεται πιο ανθεκτική στην κυτταροτοξική επίδραση του 17-AAG, με την πρωτεολυτική ενεργοποίηση των κασπασών να πραγματοποιείται κάτω από τις υψηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα (1 και κυρίως 10 μΜ), ωστόσο με πιο ήπιο τρόπο. Είναι σαφές πως η κυτταρική σειρά Τ24 οδηγήθηκε σε επαγωγή τόσο του μονοπατιού υποδοχέων θανάτου, με την ενεργοποίηση και πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης κασπάσης-8 στις ενεργές υπομονάδες μοριακού βάρους 43 και 41 kDa, όσο και σε ανάπτυξη του ενδογενούς μονοπατιού θανάτου, με την πρωτεόλυση και επαγωγή της κασπάσης 9 (θραύσματα μοριακού βάρους 37 και 35 kDa). Επίσης, παρατηρήθηκε πρωτεολυτική

ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3, με την παραγωγή των ενεργών θραυσμάτων της πρωτεΐνης, σε μοριακό βάρος 19 και 17 kDa, κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του 17-AAG (1 και 10 μM), αναδεικνύοντας την ενορχηστρωμένη ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου.

Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφηκαν πιο πάνω, επιχειρήθηκε μελέτη της πρωτεϊνικής ακεραιότητας χαρακτηριστικών υποστρωμάτων της εκτελεστικής κασπάσης-3, όπως είναι οι λαμίνες A/C και το PARP (Εικόνα 37). Φαίνεται σαφώς πως και στις τρεις (3) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, κάτω από τις συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα όπου συντελείται ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3, ανιχνεύτηκε αντίστοιχος κατακερματισμός των πυρηνικών λαμινών και του PARP, με τη δοσο-εξαρτώμενη ανάπτυξη πρωτεολυτικών θραυσμάτων, τα οποία εντοπίζονται σε μοριακά βάρη 28 και 89 kDa, αντίστοιχα (Εικόνα 37). Τα αποτελέσματα λοιπόν καταδεικνύουν ξεκάθαρα την ικανότητα του 17-AAG να επάγει αποπτωτικό θάνατο, με ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3 και επακόλουθη πρωτεόλυση των υποστρωμάτων της, όπως είναι οι λαμίνες A/C και το PARP, πρωτεϊνικά μόρια που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του πυρήνα. Η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 από τον ημισυνθετικό παράγοντα 17-AAG, σε καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης, ανέδειξε τον κυτταροτοξικό χαρακτήρα του συγκεκριμένου μέλους των ανσαμυκινών βενζοκινόνης, με την μείωση της επιβίωσης των κυττάρων και την ανάπτυξη ισχυρού αποπτωτικού φαινοτύπου.

4.2.4 17-AAG και αναστολή της Hsp90

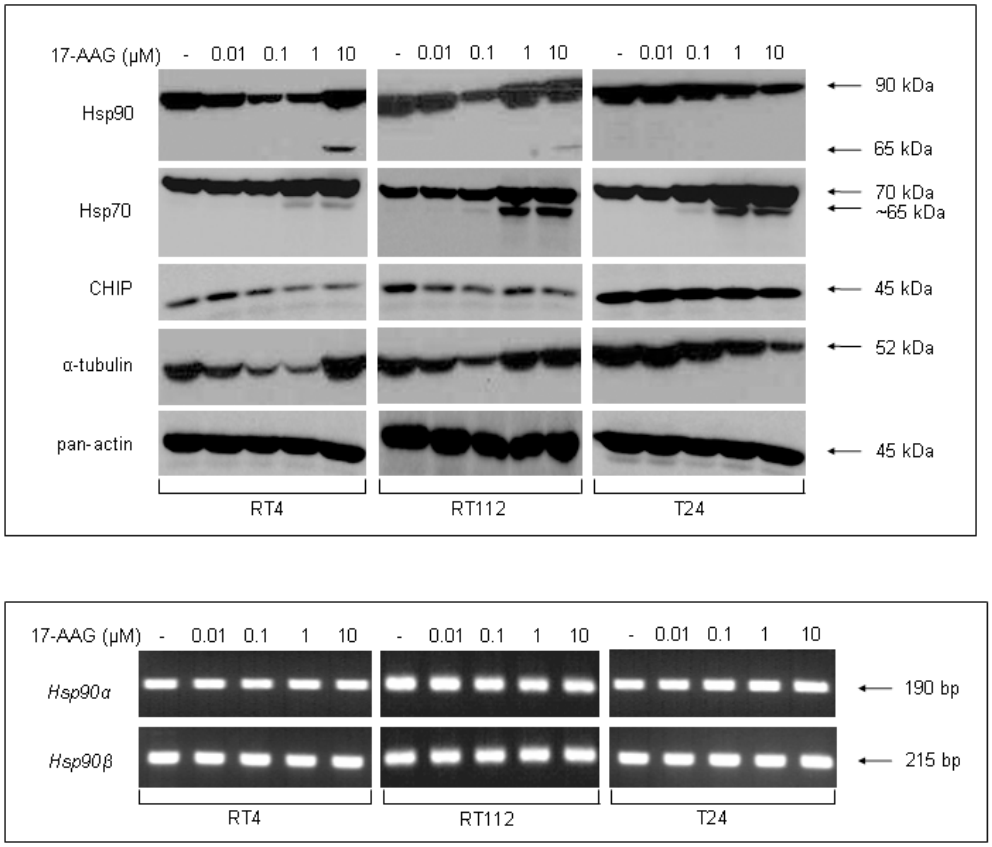
Στη συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που κατέδειξαν τον κυτταροτοξικό και κυτταροστατικό ρόλο του ημισυνθετικού αναλόγου της τζελνταναμυκίνης 17-AAG, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της συγκεκριμένης ανσαμυκίνης στη δομική ακεραιότητα του μοριακού της στόχου, της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Hsp90), σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4, RT112 και T24, με τη βοήθεια ανοσοστυπωμάτων Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4

παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 έως την συγκέντρωση του 1 μM 17-AAG. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), η οποία διακόπτει το ομαλό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων που παρουσιάζεται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ανσαμυκίνης. Επίσης, η ανίχνευση ενός προϊόντος κατακερματισμού της Hsp90 σε μοριακό βάρος ~65 kDa, κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμάκου (10 μM 17-AAG), αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα, το οποίο παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία στο πλαίσιο της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της μοριακής συνοδού από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης, καθώς όμοιο μοτίβο δράσης εμφανίζεται και κάτω από την επίδραση της τζελνταναμυκίνης, όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 4.1.5.

Παρόμοιο πρότυπο μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 παρατηρήθηκε και στα καρκινικά κύτταρα RT112, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG. Πρέπει να σημειωθεί ότι το μοτίβο της αυξομείωσης της Hsp90 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του 17-AAG, σε σχέση με τα κύτταρα RT4. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 επιτυγχάνεται στην ενδιάμεση συγκέντρωση του 0,1 μM 17-AAG, ενώ η επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της μοριακής συνοδού εμφανίζεται στις δύο (2) υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Η παραγωγή κατακερματισμένου θραύσματος της Hsp90 (~65 kDa) κάτω από την κυτταροτοξική επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του 17-AAG (10 μM) εντοπίζεται και στην κυτταρική σειρά RT112, όμοια με ότι συμβαίνει στα κύτταρα RT4.

Το πρότυπο της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 που παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές χαμηλής (RT4) και ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας, εκλείπει από την κυτταρική σειρά T24, όπου σε απόκριση

αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα, εμφανίζεται δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της μοριακής συνοδού, χωρίς την παραγωγή προϊόντων κατακερματισμού του πρόδρομου μορίου, ακόμα και κάτω από την επίδραση των υψηλών κυτταροτοξικών δόσεων. Η μείωση των επιπέδων της Hsp90 εμφανίζεται να ακολουθεί ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μετά την χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG.



Εικόνα 38: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG στον μοριακό του στόχο, την Hsp90 και άλλα μέλη του συμπλόκου μοριακών συνοδών. Επάνω, η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του 17-AAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μοριακών συνοδών Hsp90 και Hsp70, μέσω ανοσοστυπωμάτων Western. Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Hsp90α* και *Hsp90β* καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων άλλων μελών του συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών, όπως της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (Hsp70). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, η εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp70 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, με τρόπο

δοσο-εξαρτώμενο και στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές (RT4, RT112 και T24). Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η ανίχνευση ενός επιπλέον πρωτεϊνικού θραύσματος, σε μοριακό βάρος ελάχιστα μικρότερο από αυτό της Hsp70 (~65 kDa), το οποίο κάνει την εμφάνισή του και στις τρεις (3) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μM στα κύτταρα RT4, 0,1, 1 και 10 μM στα κύτταρα RT112 και T24). Το πρότυπο της παραγωγής της κατακερματισμένης ισομορφής της Hsp70 φαίνεται πως ακολουθεί μοτίβο τόσο δοσο-εξαρτώμενο, όσο και κυτταρο-ειδικό, ενώ βρίσκεται σε ποιοτική αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν πιο πάνω, όπου μελετήθηκε η επίδραση της τζελνταναμυκίνης στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (Κεφάλαιο 4.1.5).

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραματικών αποτελεσμάτων, επιχειρήθηκε η μελέτη της έκφρασης ενός επιπλέον μέλους του συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών της Hsp90, της λιγάσης ουβικουϊτίνης CHIP, η οποία ρυθμίζει το πρωτεϊνικό ισοζύγιο πολλών πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ίδιας της μοριακής συνοδού, καθοδηγώντας την αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος [308, 309]. Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λιγάσης CHIP παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG. Πρέπει να σημειωθεί πως τα συστατικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης CHIP ακολουθούν κυτταρο-ειδικό πρότυπο, το οποίο φαίνεται να συνδέεται με το βαθμό κακοήθειας της εκάστοτε κυτταρικής σειράς, με τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας να φέρουν υψηλότερα επίπεδα θεμελιώδους έκφρασης της συγκεκριμένης λιγάσης. Επίσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, τα κύτταρα RT4 εμφανίζουν το ισχυρότερο μοτίβο μείωσης της πρωτεΐνης CHIP, με τα πρωτεϊνικά επίπεδα να εμφανίζουν δραματική μείωση κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Η κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζεται πιο ανθεκτική στην καταστολή των επιπέδων της λιγάσης CHIP, με το πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης να είναι αρκετά ήπιο, ενώ τα

κύτταρα RT112 εμφανίζουν μειορύθμιση ενδιάμεσης έντασης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (βλέπε παράγραφο 4.1.5), στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε σαν πρωτεΐνη αναφοράς ένα μόριο του κυτταροσκελετού, η ακτίνη, ενώ η α-τουμπουλίνη παρουσιάζει όμοιο μοτίβο διαφοροποίησης πρωτεϊνικών επιπέδων με την μοριακή συνοδό Hsp90, σε απόκριση στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του 17-AAG, ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας των εκάστοτε υπό μελέτη κυττάρων.

Εκτός από την ανάλυση ανοσοστυπώματος Western, έγινε μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων δόσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG στα επίπεδα έκφρασης των δύο (2) γενετικών τόπων *Hsp90α* και *Hsp90β*, που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες ισομορφές της πρωτεΐνης, στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Η μελέτη αυτή επιχειρήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί αν η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα επέρχεται λόγω αλλαγής του μεταγραφικού προφίλ των γονιδίων και τελικά των επιπέδων των σχετικών mRNAs. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης παραμένουν αναλλοίωτα μετά την χορήγηση του 17-AAG, καταδεικνύοντας πως οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Hsp90 προκύπτει σε επίπεδο μετα-μεταφραστικό (όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση χορήγησης τζελνταναμυκίνης), αντανακλώντας τον κοινό μηχανισμό δράσης των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης.

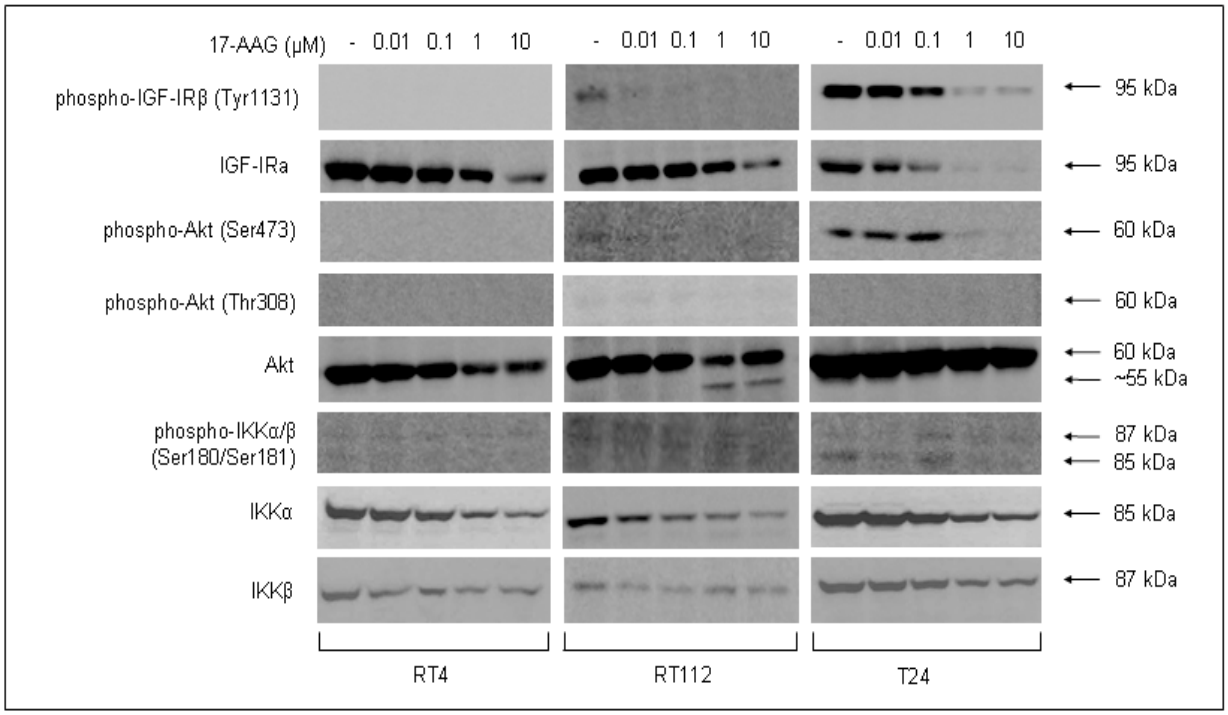
4.2.5 Η χορήγηση 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης

Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε δομική και λειτουργική αναστολή της μοριακής συνοδού Hsp90. Στη συνέχεια των πειραματικών δεδομένων που παρουσιάζονται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 στη

δομική σταθερότητα και τη λειτουργικότητα μιας πλειάδας πρωτεϊνών-«πελατών» της, οι οποίες συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 39, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε γραμμική μειορύθμιση και εξάλειψη των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I (IGF-IR), και στους τρεις (3) κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν, με ισχυρότερη ένταση ωστόσο, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων T24. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα RT4 εμφανίζουν ήπια μειορύθμιση των επιπέδων του υποδοχέα του IGF-I μέχρι και τη συγκέντρωση του 1 μM 17-AAG, με σημαντική καταστολή να παρουσιάζεται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης δόσης του παράγοντα (10 μM 17-AAG). Η κυτταρική σειρά RT112 εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο μείωσης των επιπέδων του IGF-IR με αυτή που παρουσιάζουν τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4. Τα υψηλής κακοήθειας καρκινικά κύτταρα T24 παρουσιάζουν σημαντική αναστολή των επιπέδων του IGF-IR ακόμα και κάτω από τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα (0,1 μM 17-AAG), ενώ υπό την επίδραση των υψηλών δόσεων της ανσαμυκίνης (1 και 10 μM), τα πρωτεϊνικά επίπεδά του εξαλείφονται. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (βλέπε κεφάλαιο 4.1.6), σημαντικό επιστημονικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν παρουσιάζουν βασική φωσφορυλίωση του υποδοχέα του IGF-I, ενώ αντίθετα, τα κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας) εμφανίζουν υψηλά επίπεδα συστατικά ενεργοποιημένου IGF-IR. Όπως παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη εργασία, τα καρκινικά κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 εμφανίζουν βασικά (αν και χαμηλά) επίπεδα φωσφορυλίωσης του υποδοχέα στο αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνης της θέσης 1131 (Tyr1131), υποδεικνύοντας ένα ρόλο για τη συστατική ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-IR στην κλινική διάγνωση, καθώς φαίνεται πως τα επίπεδα της συστατικής φωσφορυλίωσης συσχετίζονται με το βαθμό κακοήθειας των καρκινικών σειρών της ουροδόχου κύστης. Η φωσφορυλίωση του IGF-IR παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενη αναστολή σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-

AAG, με την επιμέρους συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της σηματοδοτικής ικανότητας του υποδοχέα να διαφέρει ανά κυτταρικό τύπο (0,01 μM για τη σειρά RT112, 1 μM για τα T24 κύτταρα).

Η πρωτεϊνική κινάση Akt διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη φυσιολογία των καρκινικών κυττάρων, καθώς συμμετέχει σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια της ογκογένεσης, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί την πιο σημαντική πρωτεΐνη-«πελάτη» της μοριακής συνοδού Hsp90 [312]. Η Akt κινάση εντοπίζεται κατωρροϊκά του υποδοχέα IGF-IR στον άξονα μεταγωγής σήματος που ξεκινά από τον υποδοχέα του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα και καταλήγει στον πυρήνα των κυττάρων, με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 39, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της κινάσης Akt και στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή ενός πρωτεϊνικού θραύσματος μικρότερου μοριακού βάρους από την ώριμη κινάση Akt (~55 kDa) στα καρκινικά κύτταρα RT112, στις δύο (2) υψηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Ο κατακερματισμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της κινάσης Akt που παρατηρείται κάτω από την επίδραση υψηλών δόσεων 17-AAG, φαίνεται πως αποτελεί κυτταρο-ειδικό φαινόμενο, καθώς τόσο στα καρκινικά κύτταρα RT4, όσο και στα T24, η μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Akt δε συνοδεύεται από ταυτόχρονη παραγωγή κατακερματισμένου θραύσματος. Πρέπει να σημειωθεί πως οι κυτταρικές σειρές χαμηλής (RT4) και ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας παρουσιάζουν όμοιο πρότυπο μειορύθμισης των επιπέδων της κινάσης Akt, με την μέγιστη αναστολή να επιτυγχάνεται κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Τα κύτταρα T24 εμφανίζουν επίσης δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο καταστολής των επιπέδων της πρωτεΐνης Akt, με σαφώς ηπιότερο τρόπο, καθώς ουσιαστική μείωση εμφανίζεται ως απόκριση των υψηλών συγκεντρώσεων 17-AAG.



Εικόνα 39: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι IGF-IR/Akt, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt σε δύο ειδικές θέσεις: στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 308 (Thr308) και στο κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473 (Ser473) της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 308 δεν ανιχνεύτηκαν σε καμία από τις τρεις (3) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, είτε κάτω από συνθήκες ελέγχου, είτε κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG (Εικόνα 39). Η φωσφορυλίωση στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473 ακολουθεί ένα πρότυπο, το οποίο φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένο με το βαθμό κακοήθειας των εκάστοτε υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών (grade-dependent και cell type-specific). Τα καρκινικά κύτταρα RT4 δεν εμφανίζουν συστατική φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο, τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα θεμελιώδους φωσφορυλίωσης, ενώ τα κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης T24 εμφανίζουν υψηλά επίπεδα συστατικής

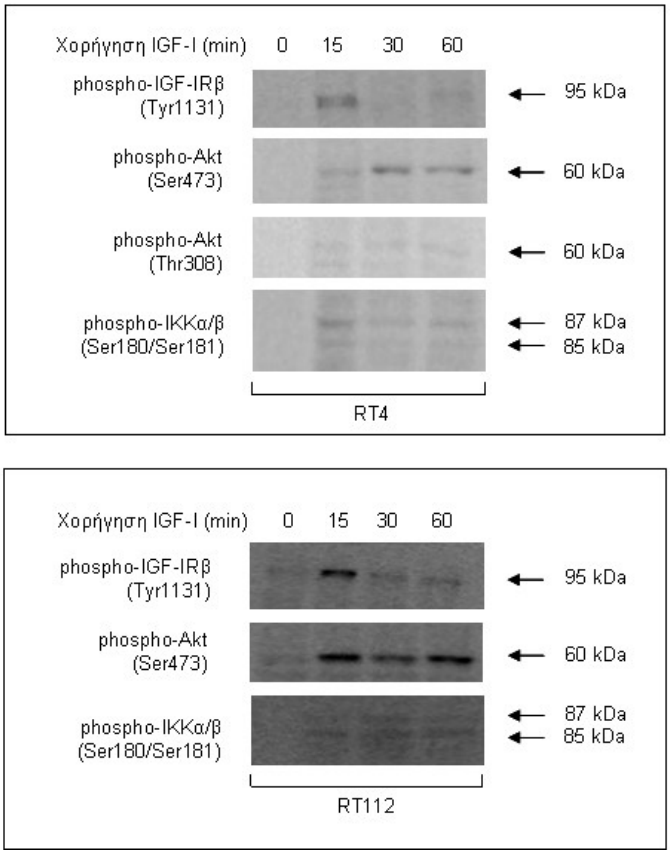
φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στο κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473. Πιο αναλυτικά, τα χαμηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στην καρκινική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 μειώνονται με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, με τα επίπεδα ενεργοποίησης να εξαλείφονται από την ενδιάμεση συγκέντρωση (0,1 μM 17-AAG). Τα κύτταρα T24 παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt, που όμως εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση κάτω από την ανασταλτική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα και εξαφανίζονται στις υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1 και 10 μM 17-AAG). Τα επίπεδα της θεμελιώδους ενεργοποίησης της κινάσης Akt βρίσκονται σε στενή σύνδεση με την ανωρροϊκή συστατική φωσφορυλίωση του IGF-IR, αποκαλύπτοντας τη διασύνδεση της αυξημένης ενεργότητας του σηματοδοτικού άξονα IGF-IR/Akt με την ανάπτυξη κακοήθειας και το βαθμό επιθετικότητας, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Η ανάσχεση της σηματοδοτικής ικανότητας της κινάσης Akt, λόγω επίδρασης του 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, οδήγησε στην μελέτη των πρωτεϊνικών μορίων που βρίσκονται κατωρροϊκά στο σηματοδοτικό άξονα IGF-IR/Akt, ώστε να διαπιστωθεί αν η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε ανάσχεση της ενεργότητας του μονοπατιού. Οι κινάσες IKK διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον άξονα σηματοδότησης IGF-IR/Akt, καθώς ευθύνονται για την μεταγωγή του σήματος προς τον τελικό στόχο, τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Πρέπει να σημειωθεί πως οι κινάσες IKK αποτελούν *bona fide* «πελάτες» της μοριακής συνοδού Hsp90, γεγονός το οποίο καταδεικνύεται από τη δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG και στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Εικόνα 39). Ειδικότερα, το φαινόμενο της αναστολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των κινασών IKKα και IKKβ φαίνεται πως επιτελείται πιο αποτελεσματικά στην κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, με τα ανιχνευόμενα επίπεδα των πρωτεϊνών σχεδόν να εξαλείφονται κάτω από την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης του παράγοντα (10 μM 17-AAG). Οι

καρκινικές σειρές RT4, RT112 και T24 εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης των επιπέδων, τόσο της κινάσης ΙΚΚα, όσο και της ΙΚΚβ. Χαρακτηριστικό στοιχείο αποτελεί η ανίχνευση υψηλότερων συστατικών πρωτεϊνικών επιπέδων κινάσης ΙΚΚα, συγκριτικά με αυτά της ΙΚΚβ, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Επιπλέον, οι τρεις (3) κυτταρικές σειρές εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των κινασών ΙΚΚα και ΙΚΚβ (με τα κύτταρα T24 να παρουσιάζουν ελάχιστα αυξημένα επίπεδα) στα κατάλοιπα σερίνης των θέσεων 180 (Ser180) και 181 (Ser181) αντίστοιχα. Κάτω από την επίδραση γραμμικά αυξανόμενων δόσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG και λόγω αναστολής της μοριακής συνοδού Hsp90, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη μείωση της φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων κινασών και στις τρεις (3) υπό μελέτη καρκινικές κυτταρικές σειρές, ταυτοποιώντας την ύπαρξη αναστολής κυτταρικής σηματοδότησης προς τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί πως το κυτταρο-ειδικό πρότυπο συστατικής φωσφορυλίωσης του υποδοχέα IGF-IR και της πρωτεϊνικής κινάσης Akt καθώς και η έλλειψη θεμελιώδους ενεργότητας του άξονα σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα χαμηλής (RT4) και ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας οδήγησε στην μελέτη της δυνατότητας των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών να επάγουν τον άξονα μεταγωγής σήματος IGF-IR/Akt. Πραγματοποιήθηκε χορήγηση αυξητικού παράγοντα IGF-I (30 ng/ml), για χρονικά διαστήματα δεκαπέντε (15), τριάντα (30) και εξήντα (60) λεπτών, σε RT4 και RT112 κύτταρα, τα οποία προηγουμένως είχαν υποστεί έκπλυση από μιτογόνους παράγοντες («νηστεία», starvation). Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 40, τόσο τα RT4, όσο και τα RT112 κύτταρα εμφάνισαν ενεργοποίηση του υποδοχέα IGF-IR, όσο και των κατωρροϊκών κινασών του μονοπατιού σηματοδότησης, με πρότυπο χρονο-εξαρτώμενο. Η πρόσδεση του IGF-I στον υποδοχέα του, οδήγησε σε ενεργοποίησή του και φωσφορυλίωση του IGF-IR στο αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνης της θέσης 1131 (Tyr1131), μετά από χρονικό διάστημα δεκαπέντε (15) λεπτών και για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές. Η κατωρροϊκή φωσφορυλίωση και κατ' επέκταση ενεργοποίηση της Akt κινάσης στη σερίνη της θέσης 473 (Ser473),

επάγεται στην μισή ώρα (30 min) χορήγησης IGF-I για τα RT4, ενώ στα RT112 φαίνεται να προκύπτει ταχύτερα, από το πρώτο τέταρτο (15 min) της προσθήκης του αυξητικού παράγοντα στο θρεπτικό υλικό. Και στις δύο (2) κυτταρικές σειρές εμφανίζεται χρονο-εξαρτώμενη κατωρροϊκή φωσφορυλίωση των ΙΚΚα/β κινασών, η οποία προκύπτει από τα δεκαπέντε (15) λεπτά.

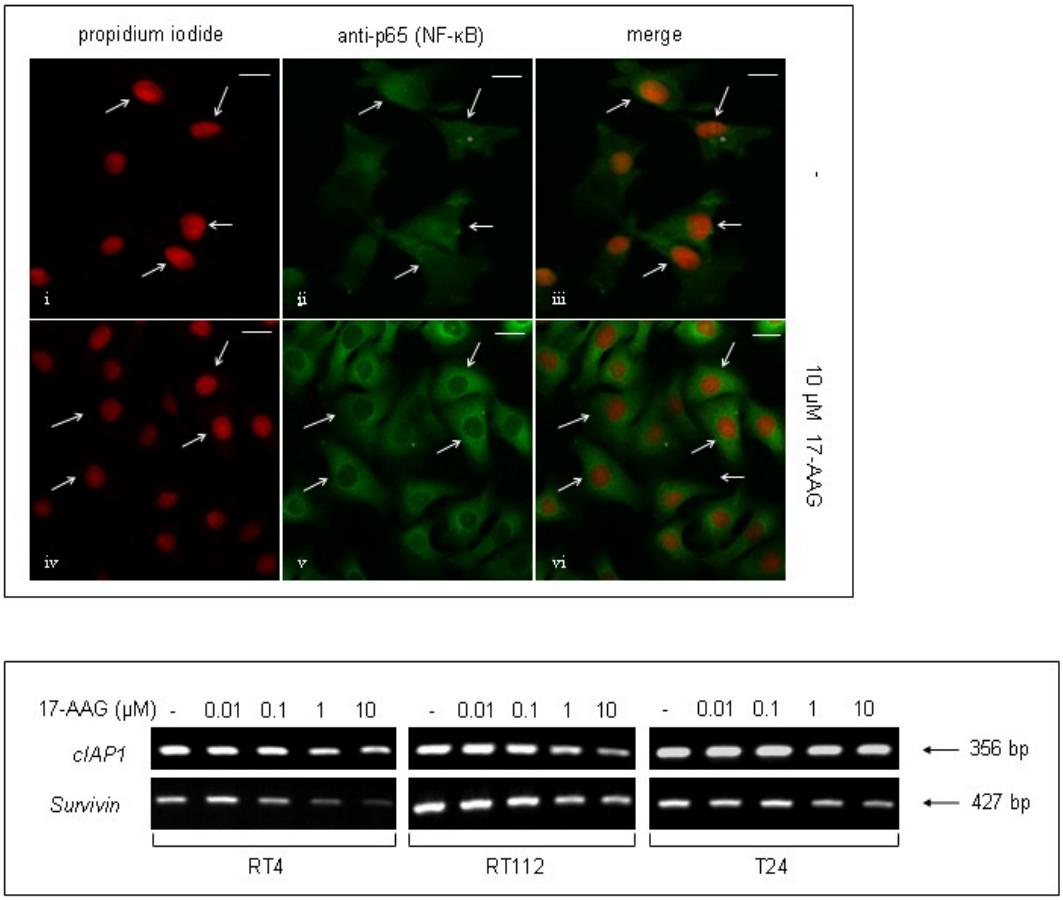


Εικόνα 40: Επίδραση του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I (IGF-I) στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού άξονα IGF-IR/Akt/IKK, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Χορηγήθηκε IGF-I (τελική συγκέντρωση 30 ng/ml) για χρονικά διαστήματα 15, 30 και 60 λεπτών, σε RT4 και RT112 κυτταρικές σειρές οι οποίες είχαν υποστεί προηγουμένως «νηστεία» (starvation).

Πρέπει να σημειωθεί πως τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας (RT112) εμφανίζουν χαρακτηριστικά εντονότερη επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού σε σχέση με τα RT4 κύτταρα, καθώς όλα τα επιμέρους πρωτεϊνικά μόρια εμφανίζουν χαρακτηριστικά υψηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης. Επίσης, σημαντικό εύρημα αποτελεί και η επαναφορά των επιπέδων ενεργότητας του υποδοχέα IGF-IR σε φυσιολογικά επίπεδα πέρα από τα

δεκαπέντε λεπτά (15 min) επώασης με τον αυξητικό παράγοντα και για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, παρά το γεγονός ότι παραμένει στο θρεπτικό υλικό IGF-I για τριάντα (30) και εξήντα (60) λεπτά. Όπως αποδεικνύουν τα πειράματα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, το σηματοδοτικό μονοπάτι IGF-I/Akt/IKK είναι λειτουργικό στα καρκινικά κύτταρα RT4 και RT112, με την χορήγηση IGF-I να οδηγεί σε επαγωγή σήματος, το οποίο με την πάροδο του χρόνου αναστρέφεται, καθώς επανέρχεται η ενεργότητα του υποδοχέα σε φυσιολογικά επίπεδα. Η έλλειψη συστατική ενεργότητας του σηματοδοτικού άξονα IGF-I/Akt/IKK σε κύτταρα ουροδόχου κύστης χαμηλής κακοήθειας, οφείλεται στην έλλειψη εξωτερικού ερεθίσματος και όχι σε μειωμένη δυνατότητα απόκρισης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος.

Η ανάσχεση της κυτταρικής σηματοδότησης λόγω αναστολής της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας της μοριακής συνοδού Hsp90, σε απόκριση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG, οδηγεί, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, στην αποσιώπηση της σηματοδότησης Akt. Η απενεργοποίηση του σηματοδοτικού άξονα IGF-IR/Akt/IKK οδήγησε στην μελέτη της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος αποτελεί το τελικό μόριο-«στόχο» του μονοπατιού. Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμασίες ανοσοκυτταροχημείας σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, όπου έγινε σήμανση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με ειδικό φθορίζον αντίσωμα και παρατήρηση κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται στην Εικόνα 41, η χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης 17-AAG (1 μM) οδηγεί σε καταστολή της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, λόγω μεταβολής της υποκυτταρικής θέσης εντοπισμού του (Εικόνα 41). Αντίθετα, κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης της σχετικής σηματοδότησης, ο NF-κB εντοπίζεται στον πυρήνα τον κυττάρων, όπου καθοδηγεί την μεταγραφική ενεργότητα γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες, μεταξύ άλλων, συνδέονται με την κυτταρική επιβίωση.



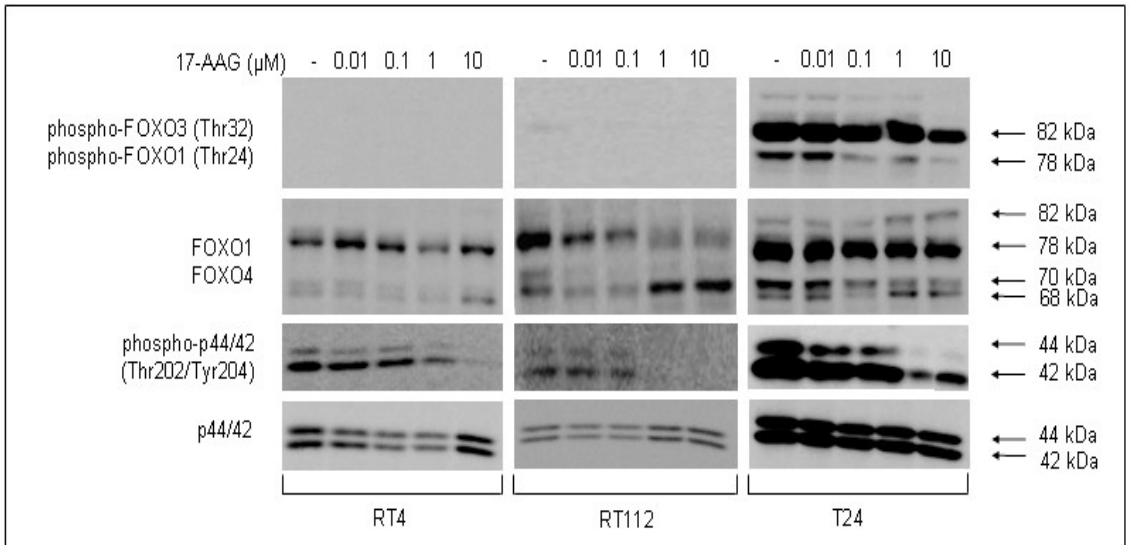
Εικόνα 41: Αναστολή ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Επάνω, ενδοκυτταρικός εντοπισμός του παράγοντα NF-κB σε καρκινικά κύτταρα T24. Οι εικόνες αφορούν ανοσοκυτταροχημεία και επακόλουθη παρατήρηση με συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία laser (bar: 10 μm). Κάτω, αναστολή του μεταγραφικού δυναμικού του παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση του 17-AAG. Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης των επαγόμενων από τον παράγοντα NF-κB γονιδίων *cIAP1* και *Survivin* σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Για την απόδειξη του ανωτέρω επιχειρήματος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του 17-AAG στην μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων-«στόχων» του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, όπως είναι τα γονίδια *cIAP1* και *Survivn*, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αναστέλλουν την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου (Εικόνα 41, κάτω). Εδώ παρατηρείται ότι, σε απόκριση της αναστολής της Hsp90 από αυξανόμενες συγκεντρώσεις 17-AAG, τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση και στις τρεις (3) καρκινικές κυτταρικές σειρές, αποδεικνύοντας τη λειτουργική καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Ειδικότερα, η μεταγραφική

ενεργότητα του γενετικού τόπου *cIAP1* παρουσιάζει ισχυρό πρότυπο καταστολής για τις κυτταρικές σειρές χαμηλής (RT4) και ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας, σε αντίθεση με τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, όπου το μοτίβο της μειορύθμισης είναι πιο ήπιο. Σε ότι αφορά στην μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου *Survivin*, τα κύτταρα RT4 εμφανίζουν το πιο ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτωμενης καταστολής, με τα ολικά επίπεδα έκφρασης να εξαλείφονται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Τα κύτταρα RT112 και T24 φαίνεται πως σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG εμφανίζουν ένα πιο ήπιο μοτίβο καταστολής των σχετικών επιπέδων μεταγραφικής ενεργότητας. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που παρατέθηκαν πιο πάνω, η αναστολή της Hsp90 λόγω επίδρασης 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδήγησε σε μειορύθμιση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών-«πελατών» της μοριακής συνοδού, οι οποίες συμμετέχουν στον άξονα σηματοδότησης IGF-IR/Akt/IKK. Η αναστολή των πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και η διακοπή της ομαλής ροής των εξωγενών πληροφοριών προς τον πυρήνα οδήγησε στην απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και των γονιδίων-«στόχων» του, ενορχηστρώνοντας την καταστολή πρωτεϊνικών μορίων και σηματοδοτικών πλεγμάτων που προάγουν την επιβίωση και την εξαλλαγή των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης.

Στο πλαίσιο μελέτης της κυτταρικής σηματοδότησης και σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που περιγράφηκαν πιο πάνω, επιχειρήθηκε ανάλυση της επίδρασης της λειτουργικής αναστολής της Hsp90 (και κατ' επέκταση της μειωμένης σηματοδότησης Akt) στην ομάδα μεταγραφικών παραγόντων FOXO, η δράση των οποίων συνδέεται στενά με την αναστολή ενεργοποίησης μονοπατιών κυτταρικού θανάτου [318]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1 (μοριακό βάρος 78 kDa) παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, με το φαινόμενο να εντοπίζεται ισχυρότερο στην καρκινική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112. Από την άλλη, η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του παράγοντα FOXO4 (μοριακό βάρος 68 kDa) παρουσιάζει όμοιο

πρότυπο αυξομείωσης με αυτό της Hsp90 και της α-τουμπουλίνης που παρατηρήθηκαν πιο πάνω και για τις κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Παρατηρείται μια χαρακτηριστική μεταστροφή των πρωτεϊνικών επιπέδων της ζώνης που συστατικά ανιχνεύεται έντονα σε μοριακό βάρος 70 kDa, καθώς παρατηρείται ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της, ενώ παράλληλα, τα επίπεδα της FOXO πρωτεΐνης που εντοπίζεται σε μοριακό βάρος 68 kDa αυξάνονται, με τα μέγιστα να παρατηρούνται κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του παράγοντα. Το συγκεκριμένο μοτίβο παρατηρείται σε όλες τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, κάτω από την ανασταλτική δράση 1 και 10 μM 17-AAG, και μάλιστα με χαρακτηριστική ένταση για τα κύτταρα RT112 και T24.



Εικόνα 42: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην κυτταρική σηματοδότηση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO (επάνω) και των MAP κινασών p44/42 (Erk1/2, κάτω) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων, επιχειρήθηκε η μελέτη της μεταβολής των επιπέδων φωσφορυλίωσης στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 32 (Thr32) του παράγοντα FOXO3 και στο κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 24 (Thr24) του παράγοντα FOXO1. Όπως καταδεικνύεται σαφώς στην Εικόνα 42, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν ανιχνεύεται συστατική φωσφορυλίωση σε καμία από τις δύο (2) ειδικές θέσεις φωσφορυλίωσης, η οποία παρουσιάζει κύτταρο-ειδικό μοτίβο, καθώς τα

κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας (RT112) εμφανίζουν πολύ χαμηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των παραγόντων FOXO, ενώ τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας (T24), παρουσιάζουν υψηλή βασική φωσφορυλίωση και για τα δύο (2) αμινοξικά κατάλοιπα. Η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, με την ένταση του φαινομένου να είναι εξαιρετικά υψηλή στα κύτταρα RT112, καθώς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης καθίστανται μη-ανιχνεύσιμα από τις χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου (0,01 μM). Η δοσο-εξαρτώμενη μείωση της συστατικής φωσφορυλίωσης των παραγόντων FOXO, κάτω από την επίδραση του παράγοντα 17-AAG, οδηγεί στην απελευθέρωση των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων στον πυρήνα, καθοδηγώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-«στόχων» του, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων κωδικοποιεί για πρωτεϊνικά μόρια που ενισχύουν την επαγωγή της απόπτωσης (προ-αποπτωτικά γονίδια), διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

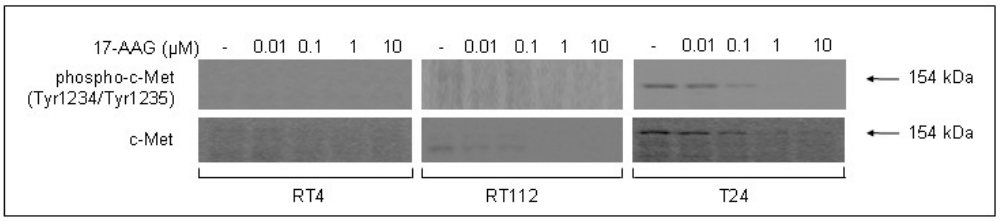
Στη συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρατίθενται πιο πάνω, επιχειρήθηκε η μελέτη της επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην σηματοδότηση MAPK. Το περίπλοκο δίκτυο μεταγωγής σήματος από MAP κινάσες είναι στενά συνυφασμένο με τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η κινάση Akt, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται συνεργιστική δράση των δύο (2) αξόνων κυτταρικής σηματοδότησης [121, 326]. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην Εικόνα 42 (κάτω), η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των MAP κινασών p44/42 (που είναι γνωστές και ως κινάσες Erk1/2) παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο με εκείνο της μοριακής συνοδού Hsp90, αλλά και της α-τουμπουλίνης, της κινάσης Cdk4 και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO4. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p44/42, ενώ τα καρκινικά κύτταρα RT4 εμφανίζουν αρχικά μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων p44/42 στις χαμηλές συγκεντρώσεις του 17-AAG, η οποία ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων στην υψηλή συγκέντρωση (10 μM 17-AAG). Παρόμοιο πρότυπο αυξομείωσης

παρουσιάζουν και τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας (RT112), με την εναλλαγή μειορύθμισης-αύξησης πρωτεϊνικών επιπέδων να προκύπτει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική επίδραση του 17-AAG στη σηματοδότηση των κινασών p44/42, επιχειρήθηκε η ανίχνευση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών σε κατάλοιπα θρεονίνης της θέσης 202 (Thr202) για την p44 και σε κατάλοιπα τυροσίνης της θέσης 204 (Tyr204) για την p42, καθώς και η μεταβολή της σηματοδότησης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, εντοπίζεται συστατική φωσφορυλίωση και στις τρεις (3) καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, οι οποίες, κάτω από την επίδραση γραμμικά αυξανόμενων δόσεων 17-AAG, εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αναστολής της φωσφορυλίωσής τους. Τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 εμφανίζουν την πιο ισχυρή μειορύθμιση, καθώς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης εξαφανίζονται κάτω από την επίδραση των υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (1 και 10 μM 17-AAG), ενώ τα κύτταρα RT4 και T24 παρουσιάζουν παρόμοιο, αλλά πιο ήπιο πρότυπο γραμμικής αναστολής της φωσφορυλίωσης των κινασών Erk. Η ανάσχεση της σηματοδότησης MAPK, λόγω της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της μοριακής συνοδού Hsp90, αναδεικνύει το ευρύ φάσμα επίδρασης της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης θερμικού σοκ, καθώς το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι συνδιαλεγόμενο με αρκετά άλλα, συμμετέχει σε πολυδύναμες κυτταρικές λειτουργίες [325]. Η αναστολή της σηματοδότησης p44/42 οδηγεί στην μειορύθμιση πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων-«στόχων» που εντοπίζονται κατωρροϊκά (εντός του πυρήνα) και συμμετέχουν στην μεταγραφή γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής.

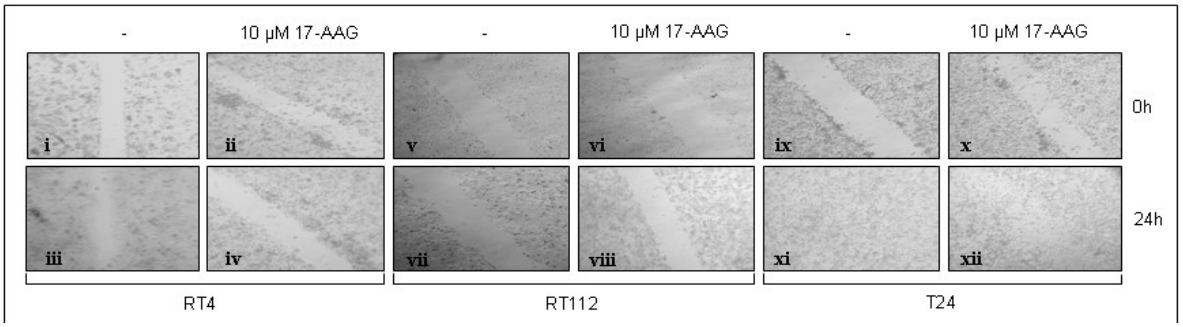
4.2.6 Η χορήγηση 17-AAG οδηγεί σε αναστολή της κινητικότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης

Η κυτταρική κινητικότητα αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό της μετάβασης καρκινικών κυττάρων από τον επιθηλιακό στον μεσεγχυματικό φαινότυπο (epithelial to mesenchymal transition, EMT), φαινόμενο που αποτελεί τη βάση της πρώιμης φάσης της διήθησης γειτονικών ιστών από τα καρκινικά κύτταρα ενός όγκου [327]. Ένα από τα μόρια-«κλειδιά» στην ανάπτυξη του φαινομένου EMT, της κινητικότητας των εξαλλαγμένων κυττάρων και της έναρξης της κυτταρικής σηματοδότησης που οδηγεί στη διήθηση παρακείμενων ιστών αποτελεί ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor receptor, HGF-R), που είναι γνωστός και ως c-Met [327, 328]. Στο πλαίσιο της μελέτης της αναστολής σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στη ογκογένεση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην κυτταρική σηματοδότηση c-Met, με ανάλυση ανοσοστυπώματος Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43, τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν εμφανίζουν συστατικά επίπεδα πρωτεΐνης c-Met, ενώ στα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 εντοπίζονται χαμηλά πρωτεϊνικά επίπεδα του συγκεκριμένου υποδοχέα. Σε αντίθεση με τα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, τα καρκινικά κύτταρα T24 παρουσιάζουν σημαντικά βασικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης c-Met, τα οποία ακολουθούν ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, με τα επίπεδα του υποδοχέα να καθίστανται μη-ανιχνεύσιμα στις υψηλές δόσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 και 10 μM 17-AAG). Στα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, που ούτως ή άλλως εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα βασικής έκφρασης του υποδοχέα c-Met, παρουσιάζεται δραστική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του c-Met υποδοχέα, με ισχυρή μειορύθμιση να παρατηρείται κάτω από την επίδραση της ηπιότερης συγκέντρωσης του παράγοντα (0,01 μM 17-AAG).

A



B



Εικόνα 43: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην κινητικότητα καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Α) Αναστολή έκφρασης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF-R ή c-Met). Β) Δοκιμασία «επούλωσης ανοιχτής πληγής» (scratch wound assay) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης κάτω από την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η μελέτη της συστατικής ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού c-Met στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, με την ανίχνευση φωσφορυλιωμένων μορίων του υποδοχέα σε αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης που εντοπίζονται στις θέσεις 1234 και 1235 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Tyr1234/Tyr1235). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43Α, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του υποδοχέα στις καρκινικές σειρές χαμηλής κακοήθειας είναι είτε μη ανιχνεύσιμα (RT4), είτε περιορίζονται σε ίχνη (RT112). Τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης T24 εμφανίζουν συστατικά επίπεδα ενεργοποιημένου υποδοχέα c-Met, με τη φωσφορυλίωση να ακολουθεί πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με ολική αναστολή της ενεργότητας να παρατηρείται κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG. Η κυτταρο-ειδική ενεργότητα του υποδοχέα c-Met συνδέεται με το βαθμό κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, με αυξημένα επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης να αντιστοιχούν σε επιθετικά

κύτταρα, υψηλής εξαλλαγής και μεταναστευτικού δυναμικού. Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μόριο θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό βιολογικό δείκτη του επιπέδου κακοήθειας όγκων της ουροδόχου κύστης, με σημαντική προγνωστική αξία. Επίσης, ο συνδυασμός του εντοπισμού παρόμοιων πρωτεϊνών που εμφανίζουν βαθμο-ειδικό πρότυπο ενεργοποίησης και αναλύθηκαν πιο πάνω, όπως η ενεργοποιημένη κινάση Akt, η φωσφορυλιωμένη pRb, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας του IGF-I κ.λπ., θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία στα χέρια των κλινικών ιατρών, για την πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

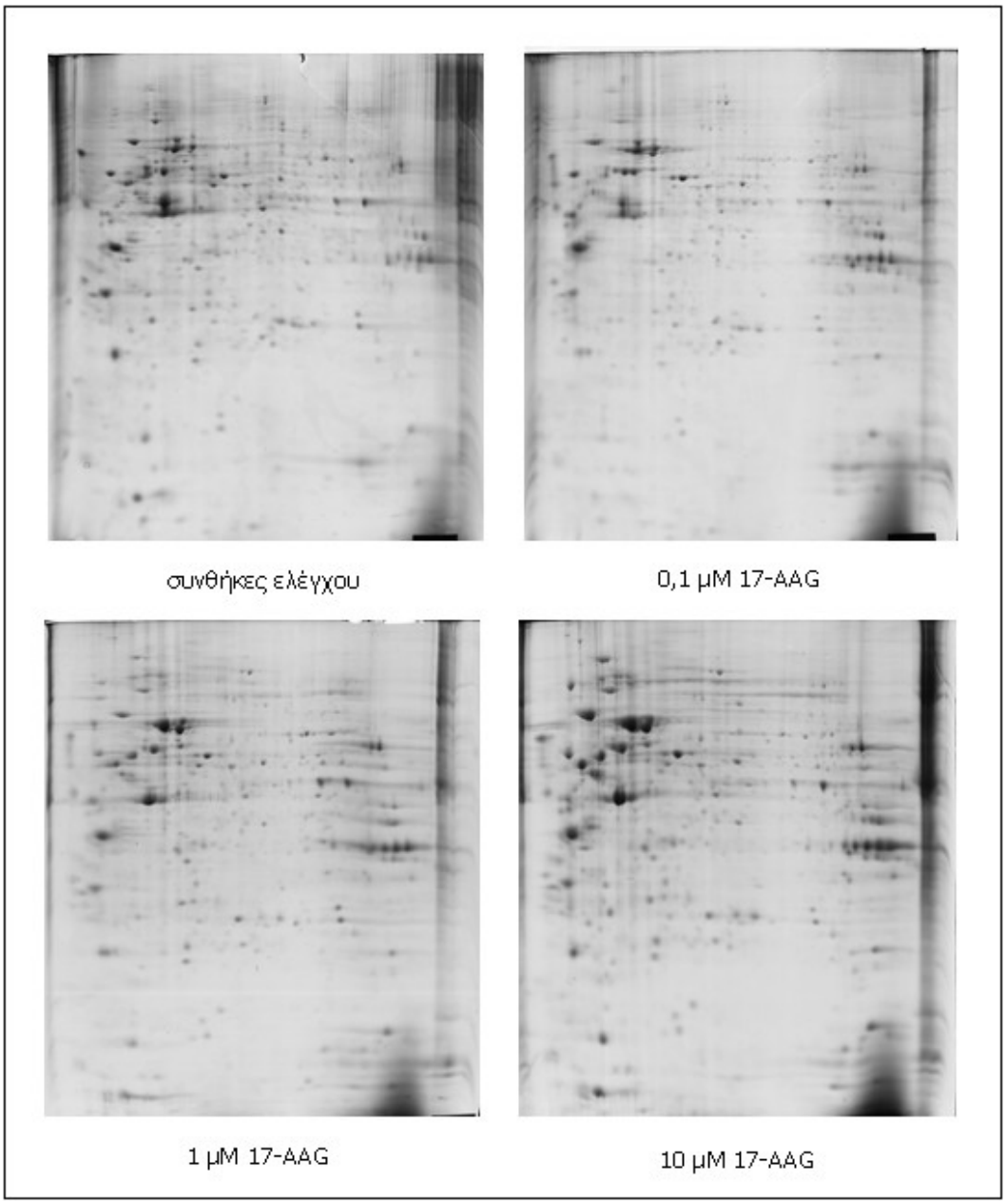
Σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, επιχειρήθηκε η περαιτέρω διερεύνηση της επίπτωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης με τη βοήθεια της δοκιμασίας «επούλωσης ανοιχτής πληγής». Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 43Β, τα κύτταρα χαμηλής (RT4) ή ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας δε φέρουν υψηλή ικανότητα μετακίνησης, ούτε αρκετά ισχυρό μιτωτικό δυναμικό ώστε να «επουλώσουν» την ασυνέχεια που τεχνητά προκλήθηκε σε *in vitro* καλλιέργειές τους σε μονόστιβο ταπήτιο, τόσο κάτω από συνθήκες αναφοράς, όσο και κάτω από την επίδραση υψηλής συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG) [Εικόνα 43Β, κύτταρα RT4 (πλαίσια i-iv), κύτταρα RT112 (πλαίσια v-viii)]. Τα καρκινικά κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας) επιδεικνύουν ισχυρή κινητικότητα και υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, ώστε να καταφέρνουν να επουλώσουν την ασυνέχεια στην καλλιέργειά τους, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 43Β, πλαίσια ix και xi). Επιπλέον, αν και η χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG) δεν αναστέλλει πλήρως το μεταναστευτικό δυναμικό και την κινητικότητα των κυττάρων αυτών, είναι προφανές ότι ο μηχανισμός «επούλωσης πληγής» που αναπτύσσουν τα συγκεκριμένα εξαλλαγμένα κύτταρα έχει κατασταλεί σε σημαντικό βαθμό (Εικόνα 43Β, πλαίσια x και xii).

Συνοψίζοντας όλα τα πειραματικά δεδομένα και αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, η επίδραση του χημειοθεραπευτικού αναλόγου της τζελνταναμυκίνης, 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης οδήγησε σε πολλαπλή ανάσχεση της κυτταρικής σηματοδότησης, ενορχηστρώνοντας την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την καταστολή μηχανισμών που είναι σημαντικοί για την κυτταρική επιβίωση, όπως η κινητικότητα, ο πολλαπλασιασμός και η μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων που ελέγχουν την επιβίωση [291, 296]. Τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής αντικατοπτρίζουν τον ενισχυμένο αντι-νεοπλαστικό χαρακτήρα του ημισυνθετικού αναλόγου 17-AAG, συγκριτικά με αυτόν της τζελνταναμυκίνης, καθώς ενώ τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν παρόμοιο, ποιοτικό πρότυπο δράσης, εντοπίζονται ποσοτικές διαφορές που αφορούν στην ένταση της αναστολής της μοριακής συνοδού και την επακόλουθη ανάσχεση των παραμέτρων της καρκινικής εξαλλαγής

4.2.7 Αναστολή της Hsp90 από το 17-AAG – Μεταβολές σε επίπεδο πρωτεώματος

Στο πλαίσιο της μελέτης της αναστολής της Hsp90 από το αντιβιοτικό ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης 17-AAG, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταβολής του συνολικού πρωτεωμικού προφίλ των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα. Για την ανίχνευση των μεταβολών σε επίπεδο πρωτεώματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας (T24), κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG (0,1, 1 και 10 μM) για 24 ώρες, καθώς και κάτω από συνθήκες ελέγχου, με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης δύο (2) διαστάσεων, ενώ ακολούθησε χρώση και κατόπιν ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων με την εφαρμογή φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS). Τα πηκτώματα που αναλύθηκαν κάτω από την επίδραση της εκάστοτε συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα συγκρίθηκαν με το

δισδιάστατο πήκτωμα που προέκυψε κάτω από συνθήκες ελέγχου και αναλύθηκαν ποσοτικά με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού.



Εικόνα 44: Αντιπροσωπευτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, με χρήση ταινιών ισοηλεκτρικής εστίασης ευρείας περιοχής, μη-γραμμικής κλίσης (3-10 NL). Επάνω σειρά: αριστερά, πήκτωμα που προέρχεται από την ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων T24 κάτω από συνθήκες ελέγχου. Δίπλα, πήκτωμα ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων κυττάρων T24, κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG. Κάτω σειρά: δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων κάτω από την ανασταλτική επίδραση 1 μM (αριστερά) και 10 μM (δεξιά) 17-AAG.

Η διαδικασία της πρωτεωμικής ανάλυσης ανέδειξε τη διαφορική έκφραση πλειάδας πρωτεϊνικών μορίων, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, οι οποίες είτε μειορυθμίζονται, είτε αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την ανασταλτική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 44, η χρώση των δισδιάστατων πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου κατέδειξε την μεταβολή της έντασης πολλαπλών κηλίδων (spots) σε απόκριση της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Πρέπει να σημειωθεί πως τα συγκεκριμένα σημεία των πηκτωμάτων αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία έχουν διαχωριστεί με βάση τόσο το ισοηλεκτρικό τους σημείο, όσο και το μοριακό τους βάρος. Καταδεικνύεται σαφώς πως γραμμικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG οδηγούν σε μεταβολή των επιπέδων έκφρασης πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων, που αποτελούν ή όχι, πελάτες της μοριακής συνοδού Hsp90.

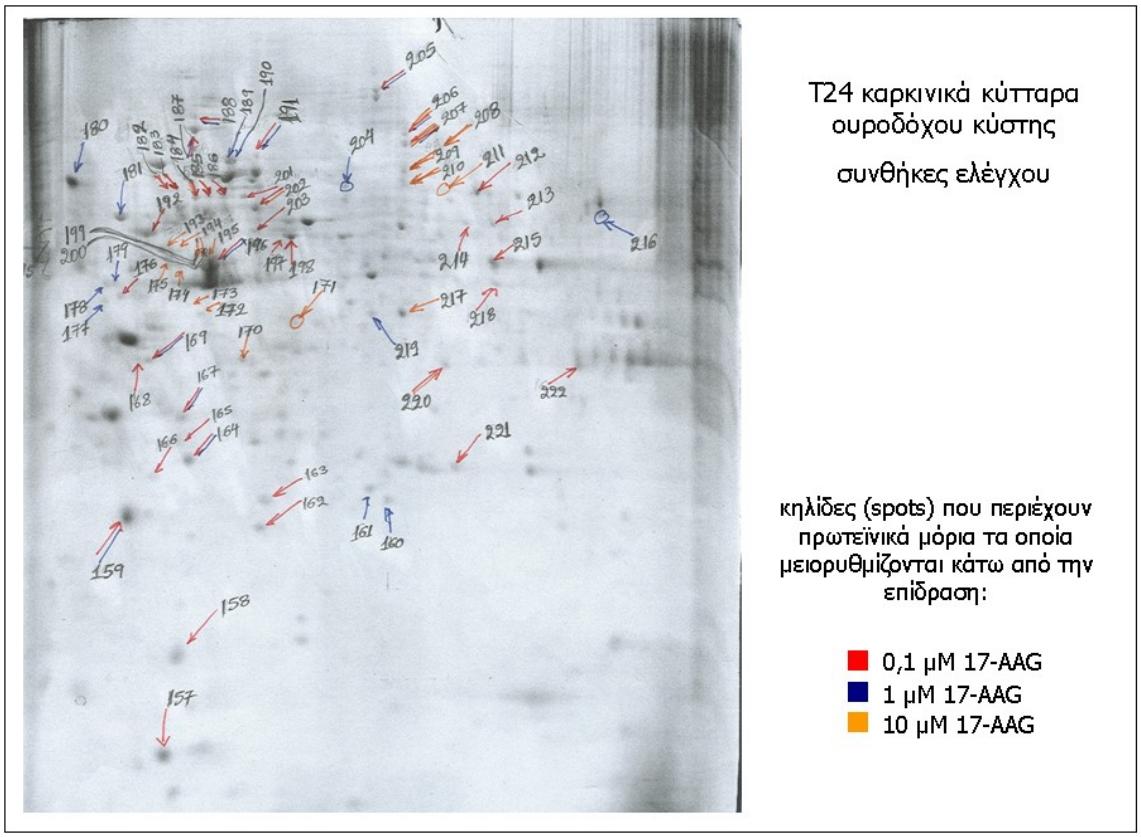
Το πρότυπο της δοσο-εξαρτώμενης μεταβολής διαφέρει ανά πρωτεΐνη, καθώς κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG, κάποια πρωτεϊνικά μόρια οδηγούνται σε ισχυρή αναστολή των επιπέδων έκφρασής τους (Εικόνα 44), ενώ ένας σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών επάγει τα επιμέρους επίπεδά του σε απόκριση της δράσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 44, η αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε μεταβολή των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων μελών του πρωτεώματος των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης T24.

Με την ανάλυση του πρωτεϊνικού φορτίου των κυττάρων σε πηκτώματα ακρυλαμιδίου, έγινε εντοπισμός των κηλίδων που παρουσιάζουν διαφοροποίηση στην ένταση της χρώσης, σε σύγκριση με το πήκτωμα των καρκινικών κυττάρων των συνθηκών ελέγχου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών αυτών με βάση το πρότυπο έκφρασης που ακολούθησαν σε απόκριση προς τον φαρμακευτικό παράγοντα, οδηγώντας σε δύο (2) μεγάλες υπο-κατηγορίες: α) πρωτεϊνικά μόρια που οδηγούνται σε μειορύθμιση και β) πρωτεΐνες που επάγουν τα επίπεδα έκφρασής τους λόγω της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG.

4.2.7.1 Πρωτεϊνικά μόρια που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24

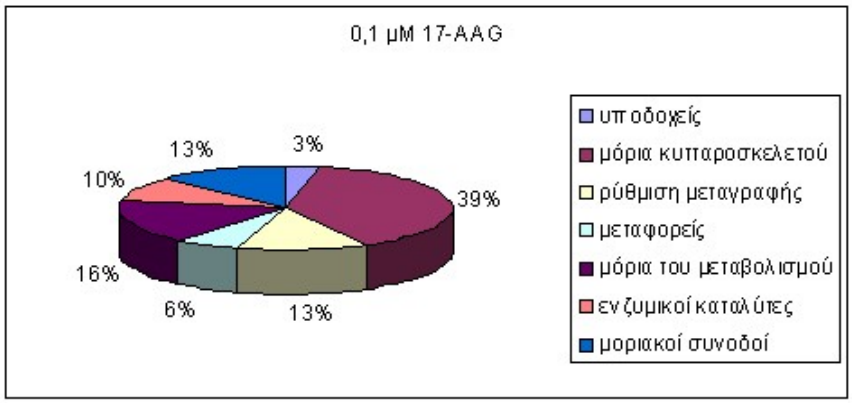
Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 45, εντοπίστηκε μια πλειάδα πρωτεϊνικών μορίων τα οποία αναστέλλουν τα επίπεδα έκφρασής τους λόγω της επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG, με την εκάστοτε επιμέρους συγκέντρωση του φαρμάκου να οδηγεί στην μειορύθμιση ενός σημαντικού αριθμού πρωτεϊνών. Οι χαρακτηριστικές κηλίδες που έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί από το πήκτωμα της Εικόνας 45, αφορούν πρωτεΐνες που παρουσίασαν ισχυρή αναστολή των επιπέδων έκφρασής τους, σε σύγκριση με τα δισδιάστατα πηκτώματα που αναλύθηκαν για κύτταρα κάτω από την ανασταλτική επίδραση 0,1, 1 και 10 μM 17-AAG. Πιο συγκεκριμένα, οι κηλίδες που έχουν σημειωθεί με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια που έδειξαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG, ενώ αντίστοιχα αυτές με μπλε και κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα, αντιπροσωπεύουν πρωτεΐνες που έδειξαν ισχυρή μειορύθμιση για τις συγκεντρώσεις 1 και 10 μM του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, αντίστοιχα (Εικόνα 45).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται σε απόκριση γραμμικά αυξανόμενων δόσεων του 17-AAG. Στον Πίνακα 11, απεικονίζονται πρωτεϊνικά μόρια τα οποία εμφάνισαν την εντονότερη μειορύθμιση κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG. Είναι χαρακτηριστικό πως η αναστολή της Hsp90 λόγω επίδρασης 17-AAG οδήγησε στην μειορύθμιση πολλαπλών, ετερόλογων πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός το οποίο ενισχύει το διάγραμμα της Εικόνας 46, στο οποίο απεικονίζεται η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να αναστέλλουν τα επίπεδα έκφρασής τους κάτω από την επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα, με βάση την μοριακή λειτουργία τους σε κυτταρικό επίπεδο.



Εικόνα 45: Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση ολικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων T24 σε συνθήκες ελέγχου. Έχουν επισημανθεί οι κηλίδες (spots) οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια τα οποία οδηγούνται σε μειορύθμιση, σε απόκριση των συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (κόκκινο, μπλε και κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα για 0,1, 1 και 10 μM 17-AAG αντίστοιχα).

Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 11 και την Εικόνα 46, μια ποικιλία πρωτεϊνικών μορίων υπόκεινται σε ισχυρή μείωση των επιπέδων τους στο κυτταρικό πρωτέωμα, λόγω της δράσης 0,1 μM 17-AAG σε T24 καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες που μειορυθμίζονται είναι μόρια που συμμετέχουν στο δίκτυο του κυτταροσκελετού, όπως η κερατίνη (keratin II type 8, K2C8), η βινκουλίνη (vinculin, VINC) και β-τουμπουλίνες (tubulin beta-chains 2A και 2B, TBB2A και TBB2B). Επίσης, φαίνεται πως μια κατηγορία μορίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό (transitional endoplasmic reticulum ATPase, TERA), καθώς και στην μεταγραφή (mitochondrial elongation factor Tu, EFTU) οδηγούνται σε καταστολή των ενδοκυτταρικών επιπέδων τους, κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG.



Εικόνα 46: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 187	285	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Keratin, type II cytoskeletal 8	Spot 198	242	53671.00	K2C8_HUMAN	5.40
Vinculin	Spot 205	217	124292.00	VINC_HUMAN	5.40
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 188	206	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Alpha-enolase	Spot 215	200	47481.00	ENOA_HUMAN	7.70
Keratin, type II cytoskeletal 8	Spot 197	198	53671.00	K2C8_HUMAN	5.40
Stress-induced-phosphoprotein 1	Spot 212	198	63227.00	STIP1_HUMAN	6.40
Triosephosphate isomerase	Spot 221	197	26938.00	TPIS_HUMAN	6.50
T-complex protein 1 subunit epsilon	Spot 202	173	60089.00	TCPE_HUMAN	5.30
Elongation factor Tu, mitochondrial	Spot 218	162	49852.00	EFTU_HUMAN	7.90
Stress-70 protein, mitochondrial	Spot 191	161	73920.00	GRP75_HUMAN	5.80
Keratin, type II cytoskeletal 7	Spot 203	161	51443.00	K2C7_HUMAN	5.40
Annexin A2	Spot 222	156	38808.00	ANXA2_HUMAN	8.50
60 kDa heat shock protein,	Spot 185	145	61187.00	CH60_HUMAN	5.60
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Spot 184	137	51230.00	HNRPK_HUMAN	5.30
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Spot 201	135	51230.00	HNRPK_HUMAN	5.30
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Spot 186	128	51230.00	HNRPK_HUMAN	5.30
Glutathione S-transferase P	Spot 163	111	23569.00	GSTP1_HUMAN	5.30
Lamin-B1	Spot 183	111	66653.00	LMNB1_HUMAN	5.00
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	Spot 213	107	56226.00	IMDH2_HUMAN	6.50
Chloride intracellular channel protein 1	Spot 167	106	27248.00	CLIC1_HUMAN	4.90
Protein DJ-1	Spot 160	103	20050.00	PARK7_HUMAN	6.40
Translationally-controlled tumor protein	Spot 159	96	19697.00	TCTP_HUMAN	4.70
Elongation factor 1-delta	Spot 169	93	31217.00	EF1D_HUMAN	4.80
40S ribosomal protein SA	Spot 176	88	32947.00	RSSA_HUMAN	4.60
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Spot 166	84	23250.00	GDIR1_HUMAN	4.90
Putative annexin A2-like protein	Spot 222	80	38806.00	AXA2L_HUMAN	6.58

Πίνακας 11: Πρωτεϊνικά μόρια που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε καρκινικά κύτταρα T24. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

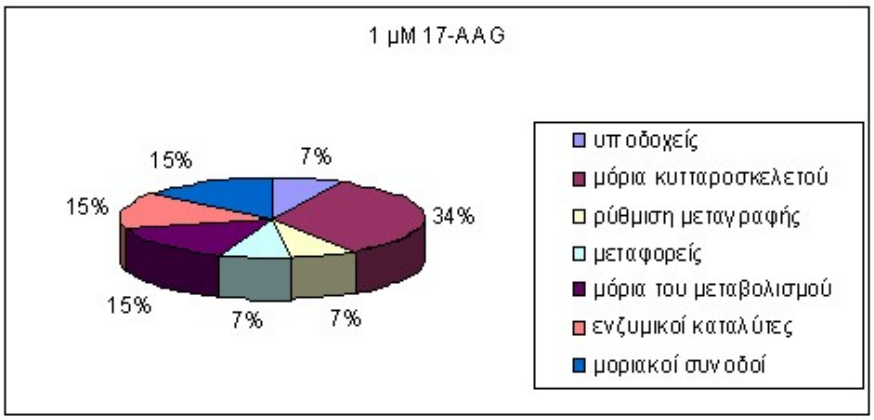
Σε ότι αφορά στην κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται μετά από χορήγηση 0,1 μM 17-AAG για 24 ώρες, φαίνεται πως το σύνολο των πρωτεϊνών καλύπτει μια ετερογενή ομάδα μορίων, με τα μέλη του κυτταροσκελετού να κατέχουν κυρίαρχη θέση (~39% του συνόλου των πρωτεϊνών που μεταβάλλονται), ενώ οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό, τη ρύθμιση της μεταγραφής και οι μοριακοί συνοδοί επίσης καλύπτουν σημαντικό ποσοστό, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 13-16% για την κάθε κατηγορία (Εικόνα 46).

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Protein disulfide-isomerase	Spot 181	314	57480.00	PDIA1_HUMAN	4.60
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 187	285	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Calreticulin	Spot 180	237	48283.00	CALR_HUMAN	4.10
Vinculin	Spot 205	217	124292.00	VINC_HUMAN	5.40
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 189	209	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 190	208	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Spot 216	208	58470.00	KPYM_HUMAN	9.00
Ezrin	Spot 206	207	69484.00	EZRI_HUMAN	5.90
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 188	206	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Tubulin beta chain	Spot 192	189	50095.00	TBB5_HUMAN	4.60
Vimentin	Spot 179	171	53676.00	VIME_HUMAN	4.90
T-complex protein 1 subunit alpha	Spot 204	167	60819.00	TCPA_HUMAN	5.70
Stress-70 protein, mitochondrial	Spot 191	161	73920.00	GRP75_HUMAN	5.80
Tubulin beta-2C chain	Spot 192	158	50255.00	TBB2C_HUMAN	4.65
Tubulin beta-2B chain	Spot 192	147	50377.00	TBB2B_HUMAN	4.64
Tubulin beta-2A chain	Spot 192	147	50274.00	TBB2A_HUMAN	4.64
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Spot 184	137	51230.00	HNRPK_HUMAN	5.30
Actin, cytoplasmic 1	Spot 196	135	42052.00	ACTB_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 2	Spot 196	135	42108.00	ACTG_HUMAN	5.20
Tubulin beta-4 chain	Spot 192	130	50010.00	TBB4_HUMAN	4.64
Lamin-B1	Spot 183	111	66653.00	LMNB1_HUMAN	5.00
Protein DJ-1	Spot 160	103	20050.00	PARK7_HUMAN	6.40
Elongation factor 1-delta	Spot 169	93	31217.00	EF1D_HUMAN	4.80
Ezrin	Spot 207	91	69484.00	EZRI_HUMAN	5.90
Reticulocalbin-1	Spot 178	85	38866.00	RCN1_HUMAN	4.70

Πίνακας 12: Πρωτεϊνικά μόρια που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε καρκινικά κύτταρα T24. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

Με παρόμοιο τρόπο παρατίθενται τα αποτελέσματα για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, με τον Πίνακα 12 και την Εικόνα 47 να

καταδεικνύουν χαρακτηριστικά πρωτεϊνικά μόρια τα οποία δείχθηκε πως ελαττώνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG, καθώς και τις επιμέρους κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες αυτά συμμετέχουν. Σημαντικό ποσοστό των πρωτεϊνών που μεταβάλλονται καλύπτουν τα μόρια του κυτταροσκελετού (~34% επί του συνόλου των πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται), με μόρια όπως η καλρετικουλίνη (calreticulin, CALR), η εζρίνη (ezrin, EZRI) και η βινκουλίνη (vinculin, VINC) να κατέχουν εξέχουσα θέση. Επίσης, μόρια που συμμετέχουν στον κυτταρικό μεταβολισμό, όπως ATPάσες του ενδοπλασματικού δικτύου (transitional endoplasmic reticulum ATPase, TERA), ενζυμικοί καταλύτες (pyruvate kinase isozymes M1/M2, PKM1 και PKM2) καθώς και μοριακοί συνοδοί (mitochondrial stress-70 protein, GRP75) καλύπτουν σημαντικό ποσοστό επί των μορίων που καταστέλλουν τα ενδοκυτταρικά τους επίπεδα, σε απόκριση 1 μM 17-AAG (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG, σε T24 καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Τέλος, παρόμοια αποτελέσματα παρατίθενται για πρωτεϊνικά μόρια τα οποία δείχθηκε ότι ελάττωσαν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG), καθώς και οι επιμέρους κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες αυτές συμμετέχουν (Πίνακας 13 και Εικόνα 48). Το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων (~60%) που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG καλύπτει πρωτεϊνικά μόρια τα οποία συμμετέχουν στον κυτταροσκελετό, όπως είναι η εζρίνη (ezrin, EZRI), η μοεζίνη (moesin, MOES), η ραντιξίνη (radixin, RADI) και οι

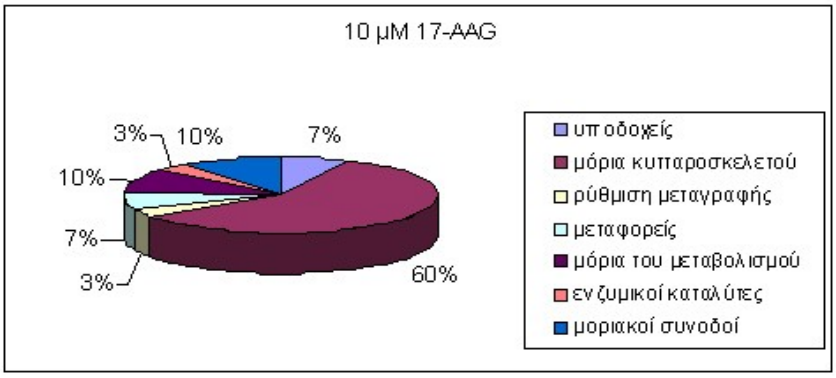
ακτίνες. Επίσης, άλλα μόρια του πρωτεώματος τα επίπεδα των οποίων καταστέλλονται κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα αποτελούν ορισμένες μοριακές συνοδοί (T-complex protein 1 subunit gamma, TCPG), πρωτεΐνες του μεταβολισμού (L-lactate dehydrogenase B chain, LDHB), κ.λπ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα δομικών πρωτεϊνών, που είναι στενά συνυφασμένες με τη δομική και λειτουργική ενεργότητα του πυρήνα των κυττάρων και μειορυθμίζονται χαρακτηριστικά κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG είναι οι λαμίνες A/C (lamin-A/C, LMNA και LMNC), γεγονός το οποίο πιθανότατα αντανακλά την πρωτεολυτική επεξεργασία των μορίων αυτών κατά την ανάπτυξη του αποπτωτικού φαινοτύπου (βλέπε Κεφάλαιο 4.2.3).

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Spot 193	224	56525.00	ATPB_HUMAN	5.10
Ezrin	Spot 206	207	69484.00	EZRI_HUMAN	5.90
Moesin	Spot 208	162	67892.00	MOES_HUMAN	6.00
T-complex protein 1 subunit gamma	Spot 209	161	61066.00	TCPG_HUMAN	6.10
F-actin-capping protein subunit alpha-1	Spot 170	135	33073.00	CAZA1_HUMAN	5.40
Actin, cytoplasmic 1	Spot 196	135	42052.00	ACTB_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 2	Spot 196	135	42108	ACTG_HUMAN	5.20
T-complex protein 1 subunit gamma	Spot 210	128	61066.00	TCPG_HUMAN	6.10
Actin, cytoplasmic 1	Spot 195	116	42052.00	ACTB_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 2	Spot 195	116	42108	ACTG_HUMAN	5.20
Dynactin subunit 2	Spot 194	111	44318.00	DCTN2_HUMAN	5.00
Actin, cytoplasmic 2	Spot 200	101	42108.00	ACTG_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 1	Spot 200	101	42052	ACTB_HUMAN	5.18
Ezrin	Spot 207	91	69484.00	EZRI_HUMAN	5.90
Actin, cytoplasmic 1	Spot 199	90	42052.00	ACTB_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 2	Spot 199	90	42108	ACTG_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 2	Spot 174	81	42108.00	ACTG_HUMAN	5.20
Actin, cytoplasmic 1	Spot 174	81	42052	ACTB_HUMAN	5.18
L-lactate dehydrogenase B chain	Spot 171	80	36900.00	LDHB_HUMAN	5.70

Πίνακας 13: Πρωτεϊνικά μόρια που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε καρκινικά κύτταρα T24. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

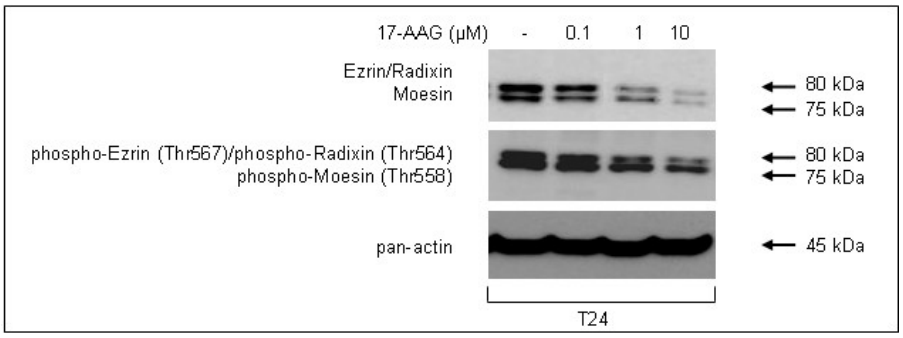
Συμπερασματικά, φαίνεται πως η ανασταλτική επίδραση του 17-AAG στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της μοριακής συνοδού Hsp90 οδήγησε στην αναστολή της έκφρασης πλειάδας πρωτεϊνικών μορίων, τα

οποία συμμετέχουν σε όλες τις εκφάνσεις της κυτταρικής φυσιολογίας, όπως είναι η μεταγραφή, ο μεταβολισμός, η διαμεμβρανική επικοινωνία (υποδοχείς και μεταφορείς), η μεταγωγή σήματος, ο πολλαπλασιασμός και η κυτταρική κίνηση (κυτταροσκελετός). Είναι λοιπόν ξεκάθαρο ότι η αναστολή της Hsp90 σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, λόγω επίδρασης της 17-AAG, ενορχηστρώνει την ανάσχεση πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός το οποίο συνεισφέρει στην καταστολή του καρκινικού φαινοτύπου και την μειορύθμιση των νεοπλασματικών σηματοδοτικών μονοπατιών.



Εικόνα 48: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Πολλά από τα πρωτεϊνικά μόρια τα οποία δείχθηκε ότι μειορυθμίζονται σε απόκριση της 17-AAG συμμετέχουν στις φαινοτυπικές εκφάνσεις του καρκινικού φαινοτύπου. Τέτοια μόρια αποτελούν μέλη του κυτταροσκελετού, όπως η εζρίνη (ezrin), η μοεζίνη (moesin), η βιμεντίνη (vimentin), οι ακτίνες (actin) και οι τουμπουλίνες (tubulin), οι οποίες συμμετέχουν στην κυτταρική κίνηση, τη διήθηση παρακείμενων ιστών και την ανάπτυξη μεταστατικού δυναμικού, τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου και την ανάπτυξη φυλλοποδίων (Εικόνα 49) [329-333]. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, καθώς και οι ενεργές, φωσφορυλιωμένες μορφές τους μελετήθηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western, σε T24 καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG.



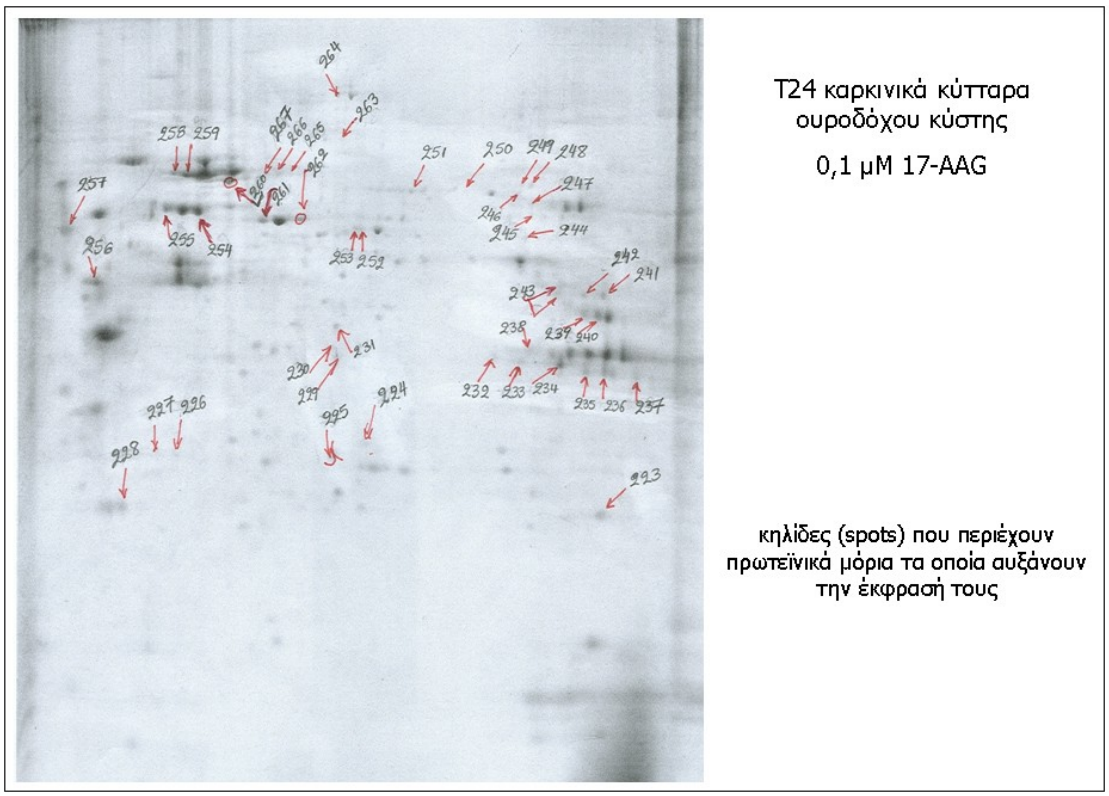
Εικόνα 49: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-AAG σε μόρια του κυτταροσκελετού καρκινικών κυττάρων T24 της ουροδόχου κύστης. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των μορίων εζρίνη, ραντιξίνη και μοεζίνη, καθώς και των ενεργών, φωσφορυλιωμένων μορφών τους.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 49, πραγματοποιήθηκε ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της εζρίνης, της ραντιξίνης και της μοεζίνης, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG. Η μείωση των συστατικών μορφών των συγκεκριμένων πρωτεϊνών συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσής τους στα κατάλοιπα θρεονίνης των θέσεων 567, 564 και 558 (Thr567, Thr564 και Thr558), αναδεικνύοντας την ανασταλτική επίδραση του 17-AAG στη ρύθμιση δραστηριοτήτων του κυτταροσκελετού. Φαίνεται ξεκάθαρα πως η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 προκαλεί απορρύθμιση του ελέγχου του κυτταρικού σκελετού, καθώς ελαττώνεται σημαντικά η δυναμική του λειτουργικότητα, οδηγώντας σε μείωση της έντασης χαρακτηριστικών που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως είναι η κυτταρική κίνηση, το υψηλό μιτωτικό δυναμικό και η δημιουργία κυτταροπλασματικών προεκβολών.

4.2.7.2 Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24

Εκτός από την μελέτη των πρωτεϊνικών μορίων που μειορυθμίστηκαν λόγω αναστολής της Hsp90, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που δείχθηκε πως αυξάνουν τα επίπεδά τους κάτω από την επίδραση του συγκεκριμένου παράγοντα. Όπως καταδεικνύεται σαφώς στην Εικόνα 50, εντοπίστηκε πλειάδα πρωτεϊνικών μορίων, τα επίπεδα έκφρασης

των οποίων επάγονται κάτω από την επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης του 17-AAG (0,1 μM 17-AAG). Οι χαρακτηριστικές κηλίδες που έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί από το πήκτωμα της Εικόνας 50, αφορούν πρωτεΐνες που σε σύγκριση με το δισδιάστατο πήκτωμα που προέκυψε κάτω από συνθήκες ελέγχου, κατέδειξαν σημαντική επαγωγή των επιπέδων έκφρασής τους και αύξηση του επιμέρους ποσοστού τους στο πρωτέωμα.



Εικόνα 50: Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης για την ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων T24 κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG για 24 ώρες. Έχουν επισημανθεί οι κηλίδες (spots) οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια των οποίων η έκφραση αυξάνεται σε ανταπόκριση προς το φαρμακευτικό παράγοντα.

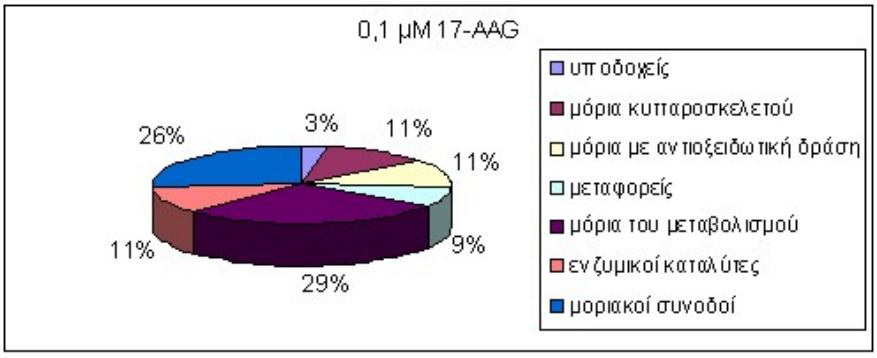
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που δείχθηκε να επάγονται κάτω από την επίδραση 0,1 μM του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Στον Πίνακα 14, απεικονίζονται πρωτεϊνικά μόρια τα οποία εμφάνισαν την υψηλότερη επαγωγή κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG, ενώ στο διάγραμμα της Εικόνας 51 καταδεικνύεται η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασής τους κάτω από την επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης του

φαρμακευτικού παράγοντα, με βάση την μοριακή λειτουργία τους σε κυτταρικό επίπεδο. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται πως παρουσιάζει το γεγονός ότι η ανασταλτική επίδραση της βενζοκινόνης ανσαμυκίνης οδήγησε στην επαγωγή πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν σε μηχανισμούς κυτταρικής προστασίας, όπως είναι η αντι-οξειδωτική δράση (υπεροξειρεδοξίνες, Peroxiredoxin-1, PRDX1), η επαγωγή άλλων μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock protein 70, HSP71 και heat shock cognate 71, HSP7C), κ.λπ.

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 259	231	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 260	227	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 258	214	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Protein disulfide-isomerase A3	Spot 261	165	57146.00	PDIA3_HUMAN	5.90
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Spot 254	163	61187.00	CH60_HUMAN	5.60
Annexin A2	Spot 234	162	38808.00	ANXA2_HUMAN	8.50
Annexin A2	Spot 233	151	38808.00	ANXA2_HUMAN	8.50
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Spot 255	150	61187.00	CH60_HUMAN	5.60
Vimentin	Spot 256	145	53676.00	VIME_HUMAN	4.90
Mitochondrial inner membrane protein	Spot 263	144	84026.00	IMMT_HUMAN	6.10
Fructose-bisphosphate aldolase A	Spot 239	141	39851.00	ALDOA_HUMAN	9.20
Peroxiredoxin-1	Spot 224	121	22324.00	PRDX1_HUMAN	9.20
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Spot 244	120	61701.00	DHE3_HUMAN	8.50
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Spot 249	118	64720.00	HNRPL_HUMAN	9.20
Alpha-enolase	Spot 231	113	47481.00	ENOA_HUMAN	7.70
L-lactate dehydrogenase A chain	Spot 236	113	36950.00	LDHA_HUMAN	9.30
Fructose-bisphosphate aldolase A	Spot 240	105	39851.00	ALDOA_HUMAN	9.20
Phosphoglycerate kinase 1	Spot 241	105	44985.00	PGK1_HUMAN	9.20
Peroxiredoxin-1	Spot 223	103	22324.00	PRDX1_HUMAN	9.20
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Spot 248	103	64720.00	HNRPL_HUMAN	9.20
Protein disulfide-isomerase A6	Spot 229	102	48490.00	PDIA6_HUMAN	4.80
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Spot 237	101	37464.00	ROA2_HUMAN	9.30
Putative annexin A2-like protein	Spot 234	92	38806.00	AXA2L_HUMAN	6.58
Heat shock protein beta-1	Spot 225	88	22826.00	HSPB1_HUMAN	6.00
Calreticulin	Spot 257	84	48283.00	CALR_HUMAN	4.10
Vinculin	Spot 264	81	124292.00	VINC_HUMAN	5.40
Protein disulfide-isomerase A3	Spot 262	79	57146.00	PDIA3_HUMAN	5.90
Putative annexin A2-like protein	Spot 233	77	38806.00	AXA2L_HUMAN	6.58
Translationally-controlled tumor protein	Spot 228	73	19697.00	TCTP_HUMAN	4.70

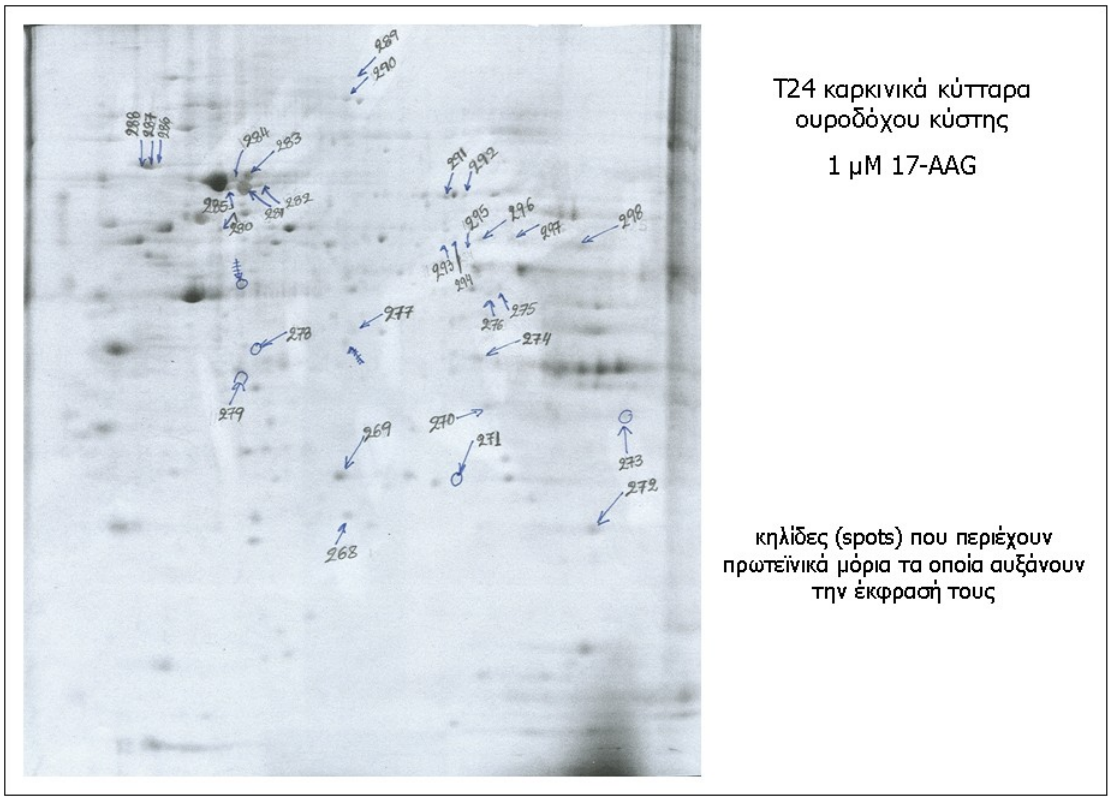
Πίνακας 14: Πρωτεϊνικά μόρια που αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε καρκινικά κύτταρα T24. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

Σε ότι αφορά τις ευρύτερες κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται τα πρωτεϊνικά μόρια που μεταβάλλουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG, χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι μοριακοί συνοδοί και τα μόρια που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια αντιπροσωπεύουν πάνω από το 50% των μορίων που αυξάνουν τα επίπεδά τους στο κυτταρικό πρωτέωμα. Η ενεργοποίηση συγκεκριμένων κλάδων του κυτταρικού μεταβολισμού, καθώς και η αντιρροπιστική αύξηση των επιπέδων κάποιων πρωτεϊνών θερμικού σοκ, σε απόκριση της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90, αντικατοπτρίζουν την προσπάθεια που καταβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα να ανταπεξέλθουν στην κυτταροτοξική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα.

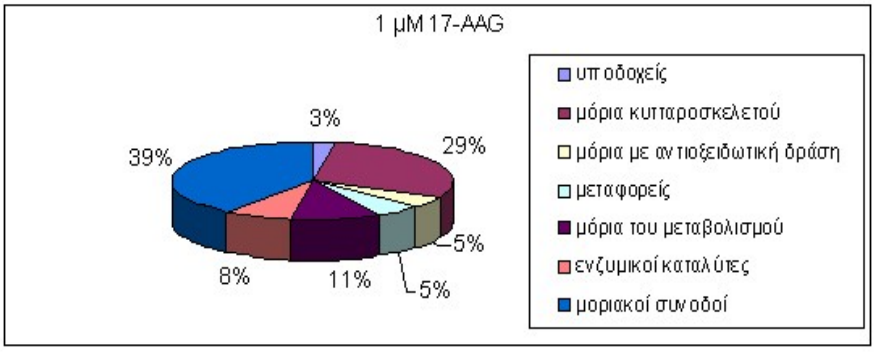


Εικόνα 51: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Παρομοίως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και για τα πρωτεϊνικά μόρια που παρουσίασαν αύξηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων σε απόκριση 1 μM 17-AAG. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 52, οι κηλίδες που αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια που επάγουν τα επίπεδά τους κάτω από την επίδραση 1 μM του χημειοθεραπευτικού παράγοντα έχουν σημανθεί με μπλε χρώμα, ενώ με την ταυτοποίησή τους, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός τους σε ότι αφορά την κυτταρική τους λειτουργία (Εικόνα 53), καθώς και την ένταση της μεταβολής του προφίλ έκφρασης (Πίνακας 15).



Εικόνα 52: Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, για την ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων T24 κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG για 24 ώρες. Έχουν επισημανθεί οι κηλίδες (spots) οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αυξάνουν την έκφρασή τους, σε απόκριση του φαρμακευτικού παράγοντα.



Εικόνα 53: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων που αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Οι μοριακές συνοδοί φαίνεται πως καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό των μορίων που αυξάνουν τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα στα κύτταρα, καλύπτοντας ένα επιμέρους ποσοστό το οποίο φτάνει ~40% των συνολικών πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση επάγεται σε απόκριση 1 μM 17-AAG. Από

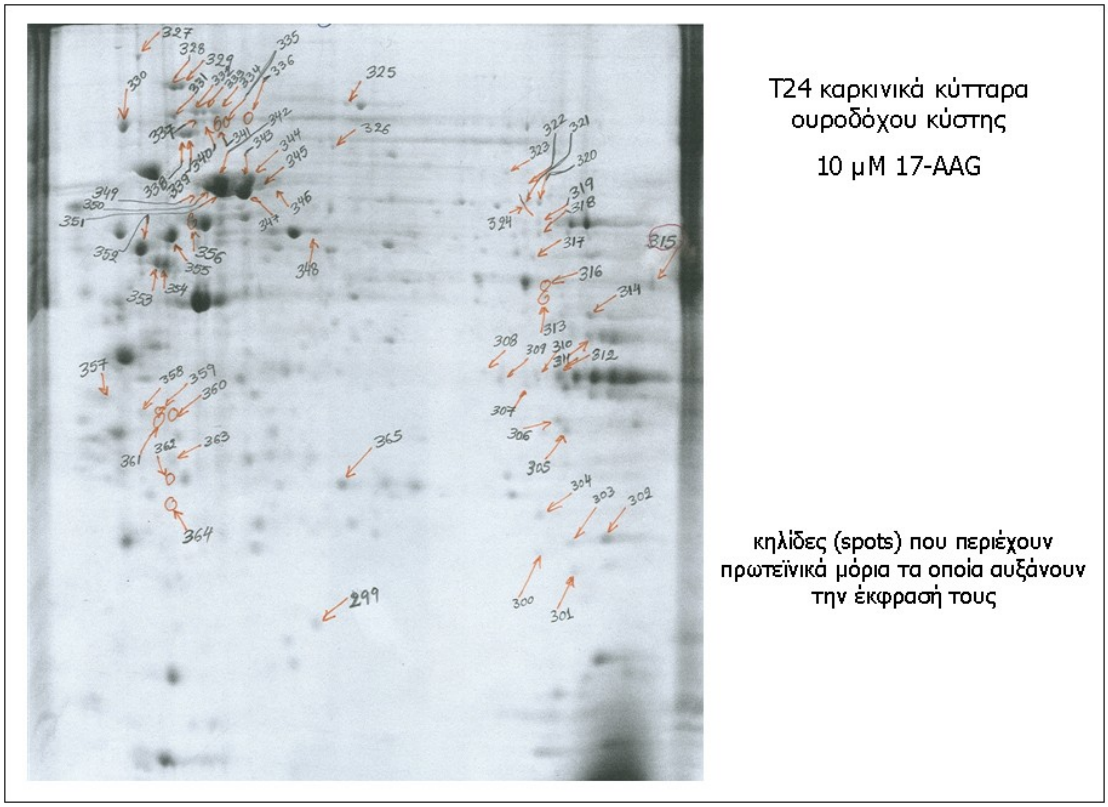
την άλλη, ένα μεγάλο ποσοστό μορίων που αυξάνει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα (30%) ανήκει στο δίκτυο του κυτταροσκελετού. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η ενεργοποίηση των μηχανισμών κυτταρικής προστασίας (~5% του συνόλου των πρωτεϊνών), με την επαγωγή πρωτεϊνικών μορίων που έχουν αντι-οξειδωτική κυρίως ή και άλλη προστατευτική δράση (Peroxiredoxin-1, PRDX1).

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 281	273	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
78 kDa glucose-regulated protein	Spot 287	261	72402.00	GRP78_HUMAN	4.90
78 kDa glucose-regulated protein	Spot 288	256	72402.00	GRP78_HUMAN	4.90
Stress-70 protein, mitochondrial	Spot 283	250	73920.00	GRP75_HUMAN	5.80
78 kDa glucose-regulated protein	Spot 286	247	72402.00	GRP78_HUMAN	4.90
Fascin	Spot 297	201	55123.00	FSCN1_HUMAN	7.00
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 282	194	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Spot 276	191	46915.00	IDHC_HUMAN	6.60
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 285	186	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	Spot 295	172	56226.00	IMDH2_HUMAN	6.50
Fascin	Spot 293	169	55123.00	FSCN1_HUMAN	7.00
Vimentin	Spot 280	165	53676.00	VIME_HUMAN	4.90
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 284	165	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	Spot 298	153	56414.00	GLYM_HUMAN	9.50
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Spot 273	148	30868.00	VDAC1_HUMAN	9.20
Heat shock protein beta-1	Spot 269	132	22826.00	HSPB1_HUMAN	6.00
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Spot 298	125	59828.00	ATPA_HUMAN	9.61
Lamin-A/C	Spot 292	124	74380.00	LMNA_HUMAN	6.60
Fascin	Spot 296	117	55123.00	FSCN1_HUMAN	7.00
Peroxiredoxin-1	Spot 272	95	22324.00	PRDX1_HUMAN	9.20
Collagen alpha-2(VI) chain	Spot 289	89	109709.00	CO6A2_HUMAN	5.80
Tubulin alpha-1B chain	Spot 280	86	50804.00	TBA1B_HUMAN	4.81
Vinculin	Spot 290	80	124292.00	VINC_HUMAN	5.40

Πίνακας 15: Πρωτεϊνικά μόρια που αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 1 μM 17-AAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε T24 καρκινικά κύτταρα. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που οδηγούνται σε αύξηση των επιπέδων έκφρασής τους σε απόκριση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (10 μM 17-AAG). Όπως φαίνεται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου της Εικόνας 54, ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών των καρκινικών κυττάρων T24 παρουσίασε

αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του, σε απόκριση της επίδρασης των 10 μM 17-AAG. Οι κηλίδες αυτές, οι οποίες έχουν σημανθεί με κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα, αναλύθηκαν περαιτέρω και πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

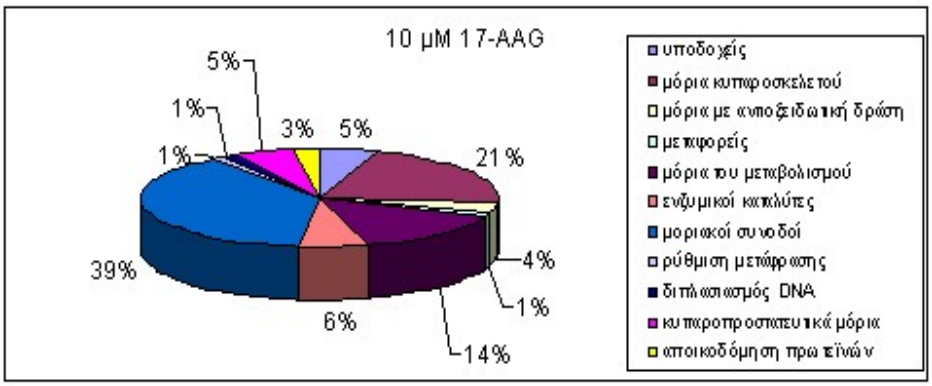


Εικόνα 54: Πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, για την ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων T24 κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG για 24 ώρες. Έχουν επισημανθεί οι κηλίδες (spots) οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αυξάνουν την έκφρασή τους, σε απόκριση του φαρμακευτικού παράγοντα.

Η λίστα των πρωτεϊνικών μορίων που εμφάνισαν ανιχνεύσιμη και ικανοποιητική επαγωγή των επιπέδων τους σε απόκριση της μεγάλης συγκέντρωσης της βενζοκινόνης παρουσιάζεται στον Πίνακα 16, ενώ ακολούθησε και κατηγοριοποίηση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών με βάση την κυτταρική τους λειτουργία (Εικόνα 55). Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 16, μια πλειάδα πρωτεϊνικών μορίων οδηγούνται σε επαγωγή των ενδοκυτταρικών τους επιπέδων, λόγω της επίδρασης της υψηλότερης συγκέντρωσης 17-AAG (10 μM). Μεγάλο ποσοστό (~40%) των συνολικών πρωτεϊνικών μορίων που

παρουσιάζουν αύξηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων αποτελούν οι μοριακές συνοδοί, όπως είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock protein 70, HSP71 και heat shock cognate 71, HSP7C).

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο δίκτυο του κυτταρικού σκελετού καταλαμβάνουν εξέχουσα θέση μεταξύ των μορίων που επάγονται κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, αφού αντιπροσωπεύουν πάνω από 20% των συνολικών πρωτεϊνών, με τις επιμέρους αλυσίδες της β-τουμπουλίνης (tubulin beta-chains 2A και 2B, TBB2A και TBB2B) να παρουσιάζουν την μέγιστη επαγωγή, γεγονός το οποίο ενισχύει το πρότυπο αυξομείωσης των επιπέδων της τουμπουλίνης που μελετήθηκε με ανάλυση ανοσοστυπώματος Western στο Κεφάλαιο 4.2.4.



Εικόνα 55: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνικών μορίων, η έκφραση των οποίων αυξάνεται κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, με βάση την ενδοκυτταρική τους λειτουργία.

Άλλες κατηγορίες μορίων που αυξάνουν τα επίπεδά τους λόγω υψηλών συγκεντρώσεων 17-AAG, όπως καταδεικνύει η Εικόνα 55 και ο Πίνακας 16, αποτελούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό μεταβολισμό (protein disulfide-isomerase A3, PDIA3), μόρια που έχουν κυτταροπροστατευτική (hypoxia up-regulated protein 1, HYOU1) και αντιοξειδωτική δράση (υπεροξειρεδοξίνες, Peroxiredoxin-1, PRDX1), καθώς και μόρια που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών (proteasome subunit alpha type-3, PSA3).

Πρωτεΐνη	Κηλίδα	Mascot Score	Μοριακό Βάρος	Σύμβολο Γονιδίου	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 340	272	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Hypoxia up-regulated protein 1	Spot 328	253	111494.00	HYOU1_HUMAN	5.00
Hypoxia up-regulated protein 1	Spot 329	250	111494.00	HYOU1_HUMAN	5.00
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 347	244	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 339	243	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Vimentin	Spot 355	236	53676.00	VIME_HUMAN	4.90
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 342	210	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Spot 338	205	89950.00	TERA_HUMAN	5.00
Tubulin beta chain	Spot 352	202	50095.00	TBB5_HUMAN	4.60
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Spot 353	196	56525.00	ATPB_HUMAN	5.10
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	Spot 305	192	35511.00	GBLP_HUMAN	8.90
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 345	192	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Tubulin beta chain	Spot 327	189	50095.00	TBB5_HUMAN	4.60
Tubulin beta-2C chain	Spot 352	187	50255	TBB2C_HUMAN	4.65
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 349	177	71082.00	HSP7C_HUMAN	5.20
Tubulin beta-2C chain	Spot 327	176	50255	TBB2C_HUMAN	4.65
Tubulin beta-4 chain	Spot 352	176	50010	TBB4_HUMAN	4.64
Endoplasmin	Spot 330	175	92696.00	ENPL_HUMAN	4.60
Stress-70 protein, mitochondrial	Spot 344	174	73920.00	GRP75_HUMAN	5.80
Tubulin beta-2A chain	Spot 352	171	50274	TBB2A_HUMAN	4.64
Vinculin	Spot 325	168	124292.00	VINC_HUMAN	5.40
Protein disulfide-isomerase A3	Spot 348	162	57146.00	PDIA3_HUMAN	5.90
Stress-70 protein, mitochondrial	Spot 343	161	73920.00	GRP75_HUMAN	5.80
Tubulin beta-2B chain	Spot 352	157	50377	TBB2B_HUMAN	4.64
Fructose-bisphosphate aldolase A	Spot 311	151	39851.00	ALDOA_HUMAN	9.20
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 351	150	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Spot 320	149	64720.00	HNRPL_HUMAN	9.20
Phosphoglycerate kinase 1	Spot 314	148	44985.00	PGK1_HUMAN	9.20
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Spot 317	148	61701.00	DHE3_HUMAN	8.50
Tubulin beta-2B chain	Spot 327	148	50377	TBB2B_HUMAN	4.64
Tubulin beta-2A chain	Spot 327	148	50274	TBB2A_HUMAN	4.64
Heat shock protein 105 kDa	Spot 333	147	97716.00	HS105_HUMAN	5.10
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 350	147	70294.00	HSP71_HUMAN	5.40
Aldose reductase	Spot 309	146	36230.00	ALDR_HUMAN	6.60
Tubulin beta-4 chain	Spot 327	145	50010	TBB4_HUMAN	4.64
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Spot 356	139	61187.00	CH60_HUMAN	5.60
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 351	135	71082	HSP7C_HUMAN	5.24
Heat shock protein 105 kDa	Spot 334	132	97716.00	HS105_HUMAN	5.10
Heat shock cognate 71 kDa protein	Spot 350	130	71082	HSP7C_HUMAN	5.24
UPF0027 protein C22orf28	Spot 318	125	55688.00	CV028_HUMAN	6.90
Protein disulfide-isomerase A6	Spot 354	118	48490.00	PDIA6_HUMAN	4.80
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Spot 306	116	32060.00	VDAC2_HUMAN	8.70
Endoplasmin	Spot 335	113	92696.00	ENPL_HUMAN	4.60
Alpha-actinin-1	Spot 341	113	103563.00	ACTN1_HUMAN	5.10
Alpha-actinin-1	Spot 335	112	103563	ACTN1_HUMAN	5.13
GTP-binding nuclear protein Ran	Spot 304	108	24579.00	RAN_HUMAN	7.80
Proliferating cell nuclear antigen	Spot 357	108	29092.00	PCNA_HUMAN	4.40
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Spot 300	106	24878.00	SODM_HUMAN	9.10
Heat shock protein beta-1 V=2	Spot 365	106	22826.00	HSPB1_HUMAN	6.00
Tubulin alpha-1C chain	Spot 355	105	50548	TBA1C_HUMAN	4.83
Mitochondrial inner membrane protein	Spot 326	103	84026.00	IMMT_HUMAN	6.10
Annexin A2	Spot 307	101	38808.00	ANXA2_HUMAN	8.50

Annexin A2	Spot 312	97	38808.00	ANXA2_HUMAN	8.50
Nucleoside diphosphate kinase A	Spot 299	96	17309.00	NDKA_HUMAN	5.80
Alpha-actinin-4	Spot 341	96	105245	ACTN4_HUMAN	5.16
Endoplasmin	Spot 341	95	92696	ENPL_HUMAN	4.61
Heat shock 70 kDa protein 1	Spot 349	93	70294	HSP71_HUMAN	5.36
Annexin A5	Spot 358	92	35971.00	ANXA5_HUMAN	4.80
Alpha-actinin-4	Spot 335	91	105245	ACTN4_HUMAN	5.16
Peroxiredoxin-1	Spot 302	90	22324.00	PRDX1_HUMAN	9.20
Heat shock 70 kDa protein 1L	Spot 345	87	70730	HS71L_HUMAN	5.67
Plastin-2	Spot 350	84	70815	PLSL_HUMAN	5.07
Proteasome subunit alpha type-3	Spot 363	83	28643.00	PSA3_HUMAN	5.10
DnaJ homolog subfamily A member 1	Spot 316	81	45581.00	DNJA1_HUMAN	6.70

Πίνακας 16: Πρωτεϊνικά μόρια που αυξάνουν την έκφρασή τους κάτω από την επίδραση 10 μM 17-AAG, σε καρκινικά κύτταρα T24. Απεικονίζονται πρωτεΐνες που φέρουν υψηλή τιμή σημαντικότητας (mascot score>80). Επίσης, αναγράφονται ο αριθμός της κηλίδας, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, το ισοηλεκτρικό της σημείο και το σύμβολο του αντίστοιχου γονιδίου.

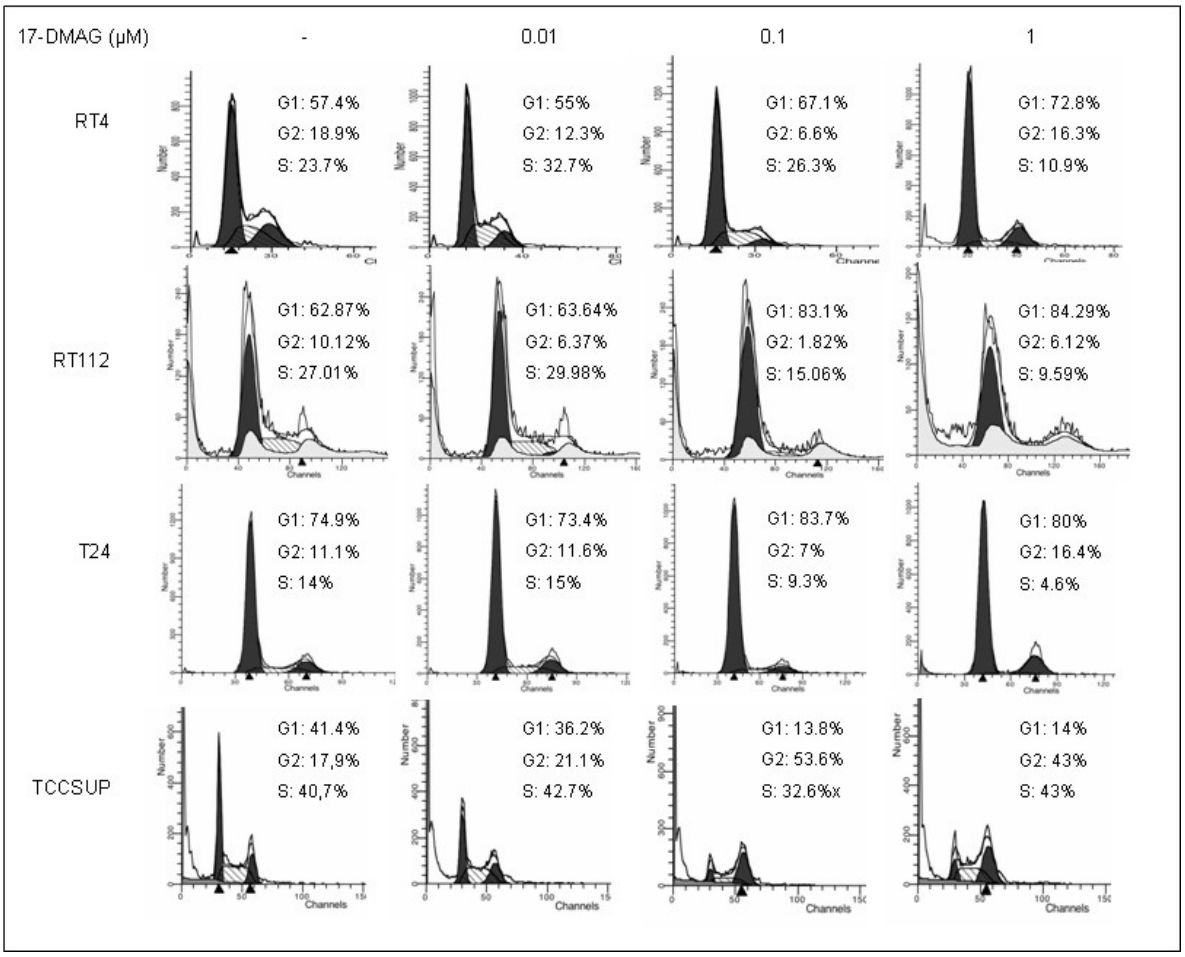
Όπως καταδεικνύουν τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται εδώ, η αναστολή της Hsp90 λόγω χορήγησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-AAG οδηγεί σε αναστολή όλων των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, επάγοντας μονοπάτια κυτταρικού θανάτου, μειορυθμίζοντας την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, αναστέλλοντας το μιτωτικό δυναμικό και την λειτουργικότητα του δικτύου του κυτταροσκελετού, και οδηγώντας σε ανάσχεση της κυτταρικής κινητικότητας. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αναδεικνύουν τον ενδεχόμενο κεντρικό ρόλο των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης σε μια σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου τη ουροδόχου κύστης, καθώς τα πειραματικά δεδομένα αντανακλούν τον πολυανυσματικό, αντι-νεοπλασματικό χαρακτήρα του 17-AAG.

4.3 Επίδραση του ημισυνθετικού αναλόγου 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

4.3.1 Αναστολή του κυτταρικού κύκλου

Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που περιγράφηκαν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης ενός επιπλέον μέλους της ομάδας των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, του 17-DMAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής μελετήθηκε εκτενώς η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του υδατοδιαλυτού, ημισυνθετικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα στην πορεία του κυτταρικού κύκλου RT4, RT112, T24 και TCCSUP καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (δοκιμασία FACS). Όπως παρουσιάζεται στα πειραματικά αποτελέσματα της Εικόνας 56, η επίδραση συγκεντρώσεων 17-DMAG σε κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (για χρονικό διάστημα 24 ωρών) οδηγεί στην ανάσχεση της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικά σημεία ελέγχου, ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας, το γενετικό υπόβαθρο και το πρωτεωμικό φορτίο της εκάστοτε υπό μελέτη σειράς. Ειδικότερα, τα καρκινικά κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρουσιάζουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S, με το ποσοστό κυττάρων που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο κλάσμα του κύκλου να αυξάνεται από το 57,4% στο 72,8% κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG. Το ποσοστό των κυττάρων που προσμετράται στο κλάσμα της φάσης G2 του κύκλου δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη μεταβολή (18,9% σε συνθήκες ελέγχου, 16,3% κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG), ενώ χαρακτηριστικό γεγονός αποτελεί η δοσο-εξαρτώμενη μείωση των κυττάρων που καταμετρώνται στην φάση S του κύκλου, με το επιμέρους ποσοστό να μειώνεται στο 10,9 % (από 23,7% σε συνθήκες ελέγχου) κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Τα πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν μια ήπια ανάσχεση στο κλάσμα S του κύκλου (S block) στη χαμηλή δόση, η οποία

υποχωρεί για να εμφανιστεί σαφής G1 αναστολή του κύκλου (G1 block) με ταυτόχρονη ανάσχεση του κλάσματος G2 (G2 block).



Εικόνα 56: Αποτελέσματα μεταβολής των επιμέρους κλασμάτων του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG.

Σε ό,τι αφορά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων RT112 (ενδιάμεσης κακοήθειας) κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, είναι σαφές πως εμφανίζεται δοσο-εξαρτώμενη ανάσχεση της μετάβασης από τη G1 φάση του κύκλου στη φάση S, με το ποσοστό κυττάρων που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο κλάσμα να παρουσιάζει αύξηση, από 62,7% σε φυσιολογικές συνθήκες, στο 84,29%, κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S φαίνεται πως συνοδεύεται από παράλληλη μείωση των

κυττάρων που προσμετρώνται στη φάση S του κύκλου, καθώς το επιμέρους ποσοστό του κλάσματος προσμετράται στο 9,59% για την υψηλή συγκέντρωση του 17-DMAG (1 μM). Τέλος, σε ότι αφορά τη φάση G2 του κύκλου, παρουσιάζεται μια δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση του ποσοστού των RT112 κυττάρων που αδυνατούν να μεταβούν από το σημείο ελέγχου G2/M, μέχρι και την υψηλότερη συγκέντρωση του 1 μM 17-DMAG, με το ποσοστό των κυττάρων που δεν δύναται να μεταβούν από το σημείο ελέγχου G2/M να υπολογίζεται στο 6,12%. Τα πειραματικά αποτελέσματα και στην περίπτωση των RT112 κυττάρων αναδεικνύουν την ανάσχεση του κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S (G1 block) κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG.

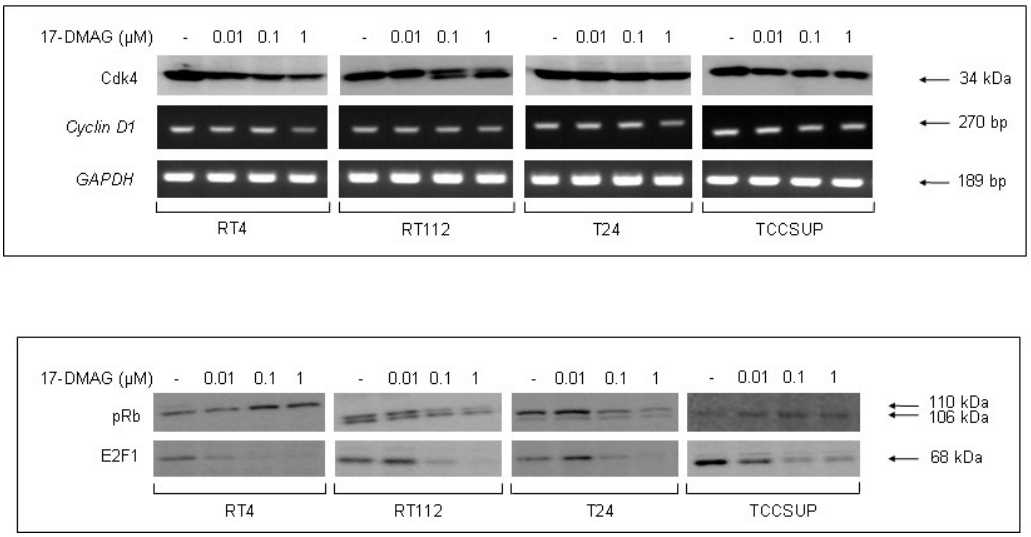
Στα καρκινικά κύτταρα χαμηλής διαφοροποίησης T24, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG φαίνεται πως οδηγεί σε σχετικά ήπια ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου στο κλάσμα G1 με το επιμέρους ποσοστό να αυξάνεται από 74,9% σε συνθήκες ελέγχου, στο 83,7% για την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG), ενώ το συγκεκριμένο ποσοστό προσεγγίζει το 80%, κάτω από την υψηλότερη συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού (1 μM 17-DMAG). Το ποσοστό των κυττάρων που αντιστοιχεί στη φάση G2 του κύκλου εμφανίζει ένα αξιοσημείωτο πρότυπο μεταβολής, με το επιμέρους κλάσμα να εμφανίζει δοσο-εξαρτώμενη μείωση (7%) κάτω από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), η οποία αντιστρέφεται για την υψηλότερη δόση (1 μM), με το ποσοστό να προσεγγίζει το 16,4% των συνολικά καταμετρημένων κυττάρων. Μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης παρατηρείται για τα κύτταρα T24, τα οποία καταμετρώνται στη φάση διπλασιασμού του γενετικού υλικού S, με το επιμέρους ποσοστό να ελαττώνεται γραμμικά ως την υψηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα (1 μM 17-DMAG), όπου προσεγγίζει το 4,6% του συνόλου των καταμετρημένων κυττάρων (από 14% σε συνθήκες ελέγχου).

Τέλος, στην καρκινική σειρά υψηλής κακοήθειας TCCSUP, παρατηρείται αναστολή του κυτταρικού κύκλου κυρίως στο σημείο ελέγχου της μετάβασης από τη φάση G2 στη φάση M (G2/M), με ταυτόχρονη συσσώρευση των

καρκινικών κυττάρων στο κλάσμα G2, οδηγώντας σε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του επιμέρους ποσοστού των κυττάρων από 17,9% κάτω από συνθήκες ελέγχου σε 53,6% για την ενδιάμεση συγκέντρωση χορήγησης του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG). Το ποσοστό κυττάρων που προσμετράται στη G2 φάση ελαττώνεται στο 43% για την υψηλότερη συγκέντρωση του 17-DMAG (1 μM), παρουσιάζοντας ήπια αναστροφή της δοσο-εξαρτώμενης αύξησης του ποσοστού που παρατηρείται για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα. Σε ότι αφορά τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου στο σημείο μετάβασης G1/S, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη μείωση του ποσοστού των κυττάρων που εγκλωβίζονται στη φάση G1, με το ποσοστό που καταμετράται για την υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου (1 μM 17-DMAG) να προσεγγίζει το 14%. Σε ότι αφορά τα TCCSUP κύτταρα που αντιστοιχούν στη S φάση του κυτταρικού κύκλου, δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή του επιμέρους ποσοστού των κυττάρων σε απόκριση αυξανόμενων δόσεων του φαρμάκου, με εξαίρεση την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), όπου παρατηρείται ελάττωση του ποσοστού στο 32,6% (με το επιμέρους ποσοστό να ξεπερνά το 40% για τις υπόλοιπες δόσεις).

Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου λόγω επίδρασης αυξανόμενων δόσεων 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μελετήθηκε περαιτέρω, καθώς επιχειρήθηκε ανίχνευση των επιμέρους επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γενετικών τόπων που ελέγχουν τη διάβαση των κυττάρων από τα σημεία ελέγχου του κύκλου. Πραγματοποιήθηκε εκτενής μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα κυκλινών/κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin/cyclin dependent kinase). Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 57, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 4 (Cdk4) με δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης και για τις τέσσερις (4) κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Φαίνεται ξεκάθαρα πως στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας (RT4), το μοτίβο μείωσης της Cdk4 είναι εντονότερο από τις κυτταρικές σειρές υψηλού βαθμού κακοήθειας, καθώς τα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεϊνικής κινάσης εμφανίζουν ισχυρή

μείωση, η οποία φτάνει στα κατώτερα επιμέρους επίπεδα έκφρασης για την υψηλότερη δόση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Στην καρκινική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 εμφανίζεται παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης με αυτό που παρατηρείται στα κύτταρα RT4, με ισχυρή αναστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της Cdk4 στην υψηλή συγκέντρωση του παράγοντα (1 μM). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί η κυτταρο-ειδική ανάπτυξη ενός προϊόντος κατακερματισμού της ώριμης Cdk4 πρωτεΐνης, παράλληλα με την δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση που παρατηρείται σε ανταπόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα, η οποία δεν είναι εμφανής σε καμία από τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Το πρωτεϊνικό θραύσμα της Cdk4 εντοπίζεται σε μοριακό βάρος το οποίο ελάχιστα αποκλίνει από αυτό της πρόδρομης ισομορφής της πρωτεΐνης (~2 kDa), εμφανίζεται με τη χορήγηση ενδιάμεσης συγκέντρωσης 17-DMAG (0,1 μM) και ακολουθεί πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αύξησης των επιπέδων της. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP εμφανίζουν ήπια μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Cdk4 κινάσης, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του 17-DMAG, με χαρακτηριστική ελάττωση των πρωτεϊνικών επιπέδων να προκύπτει κάτω από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης παρατηρείται και στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της κυκλίνης D1 (*Cyclin D1*), με όλες τις κυτταρικές σειρές να παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γενετικού τόπου, με την μέγιστη μείωση της έκφρασης να καταγράφεται σε απόκριση των υψηλών συγκεντρώσεων του παράγοντα (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει άμεση συνάρτηση ανάμεσα στην μειορύθμιση της *Cyclin D1* και της Cdk4 κινάσης με την παρατηρούμενη ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στο σημείο ελέγχου G1/S, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-DMAG.



Εικόνα 57: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG στην έκφραση πρωτεϊνών-«κλειδιά» σε ό,τι αφορά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επάνω, επίδραση του 17-DMAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης Cdk4 και στην μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου της κυκλίνης D1 (*Cyclin D1*). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1.

Σε συνέχεια της μελέτης μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης επιχειρήθηκε η ανίχνευση της επίδρασης του 17-DMAG στα επίπεδα της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, που θεωρούνται μόρια-«κλειδιά» στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 57 (κάτω), παρατηρείται μια διαφοροποίηση της ανταπόκρισης των καρκινικών κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του 17-DMAG, η οποία φαίνεται να συνδέεται με το βαθμό κακοήθειας, το γενετικό υπόβαθρο και το πρωτεωμικό φορτίο των σειρών ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρατηρείται μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Ειδικότερα, ανιχνεύεται επαγωγή των επιπέδων της πρωτεΐνης Rb κάτω από την επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης του 17-DMAG (0,01 μM), ενώ τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης διατηρούνται και στην υψηλότερη δόση (1 μM 17-DMAG) του

παράγοντα. Επίσης, η έλλειψη συστατικά ενεργοποιημένης Rb στα RT4 αποτελεί στοιχείο του πρωτεώματος των κυττάρων αυτών, το οποίο διαχωρίζει τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά από τις υπόλοιπες που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής (βλέπε Κεφάλαια 4.1.1 και 4.2.1). Τα επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb φαίνεται πως συνδέονται με την ανάπτυξη επιθετικότερου φαινοτύπου και ακολουθούν κυτταρο-ειδικό πρότυπο, καθώς βρίσκονται σε άμεση συσχέτιση με τον επιμέρους βαθμό κακοήθειας των υπό μελέτη κυττάρων (υψηλός βαθμός κακοήθειας → αυξημένα επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης). Τα κύτταρα RT112 εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rb, όσο και της συστατικά φωσφορυλιωμένης μορφής της, με το μοτίβο να εμφανίζει μέγιστη αναστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης στην υψηλή συγκέντρωση του 1 μM 17-DMAG. Στα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 εμφανίζεται μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων συστατικής και φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, κάτω από την επίδραση αυξημένων δόσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG, ο οποίος παρουσιάζει υψηλή ανασταλτική δράση ήδη από την ενδιάμεση συγκέντρωση (0,1 μM). Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η υψηλή συστατική φωσφορυλίωση της pRb των κυττάρων χαμηλής διαφοροποίησης T24, τόσο σε σχέση με τα κύτταρα RT4, όσο και με τα χαμηλά επίπεδά της που εμφανίζονται στα RT112 (Εικόνα 57). Η κυτταρο-ειδική διαβάθμιση της βασικής ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μορίου καταδεικνύει την πιθανή εμπλοκή του στην προαγωγή της ογκογένεσης στην ουροδόχο κύστη [334, 335]. Σε ό,τι αφορά στα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP, αυτά εμφανίζουν ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Rb, το οποίο μοιάζει με αυτό που παρατηρείται για την κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Είναι εμφανές ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, αν και αποτελείται από επιθετικά καρκινικά κύτταρα, δεν εμφανίζει επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb, γεγονός το οποίο ενδεχομένως καταδεικνύει την αδυναμία ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από το συγκεκριμένο μόριο, κάτω από το πρίσμα του συγκεκριμένου γενετικού υποβάθρου και πρωτεωμικού φορτίου.

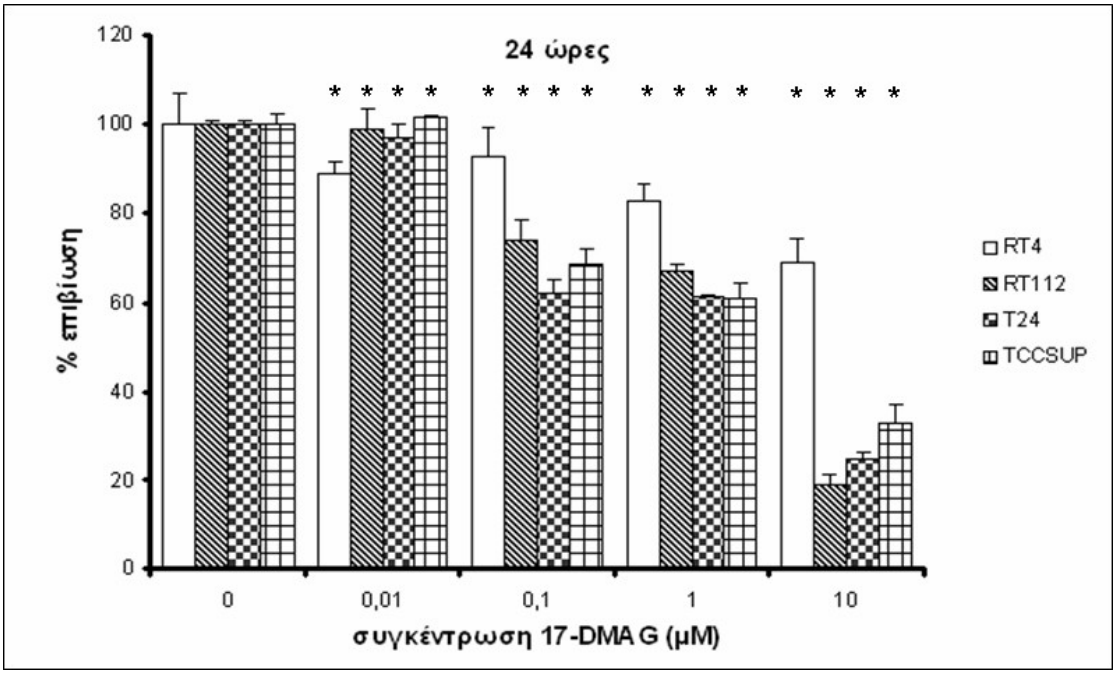
Σε ότι αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, παρατηρήθηκε χαρακτηριστικό μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης και στις τέσσερις (4) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, με τη συγκέντρωση των 0,1 μM 17-DMAG να αναδεικνύεται ως το κρίσιμο «κατώφλι» (threshold) για την πλήρη εξάλειψη της έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου, παρά την κυτταρο-ειδική συστατική διαφοροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων που ανιχνεύονται (Εικόνα 57). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 εμφανίζουν ισχυρή αναστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του E2F1 από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), με τα επιμέρους επίπεδα να εξαλείφονται κάτω από την επίδραση των υψηλότερων δόσεων της ανσαμυκίνης (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρουσιάζουν υψηλή ανάσχεση των επιμέρους επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα, η οποία προκύπτει από την ενδιάμεση συγκέντρωση (0,01 μM), οδηγώντας σε δοσο-εξαρτώμενη εξάλειψη του E2F1 στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP, αν και εμφανίζουν αυξημένα συστατικά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα, παρουσιάζουν ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης, σε απόκριση αυξανόμενων δόσεων 17-DMAG, με την ανάσχεση να ανιχνεύεται σε δόσεις του παράγοντα υψηλότερες του 0,1 μM.

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται πιο πάνω, αποδεικνύεται ξεκάθαρα η αρνητική επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ημισυνθετικής ανσαμυκίνης 17-DMAG στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου, καθώς οδηγεί σε άμεση ελάττωση του ρυθμού διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, ανεξάρτητα από τον βαθμό κακοήθειας των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, αποκαλύπτοντας το σημαντικό κυτταροστατικό δυναμικό που εμφανίζει ο συγκεκριμένος χημειοθεραπευτικός παράγοντας.

4.3.2 Το 17-DMAG εκδηλώνει τοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

Στο πλαίσιο διερεύνησης πιθανής βιολογικής επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες μέτρησης μεταβολικής ενεργότητας μιτοχονδρίων (MTT) σε κύτταρα RT4, RT112, T24 και TCCSUP. Οι τέσσερις (4) κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 17-DMAG επί 24 και 48 ώρες, οπότε πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές μετρήσεις. Όλες οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της επιβίωσής τους κάτω από την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα, όπως φαίνεται στις Εικόνες 58 και 59. Όπως καταδεικνύεται στις μετρήσεις των 24 ωρών, τα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 (ενδιάμεσης), T24 και TCCSUP (υψηλής κακοήθειας) εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG. Ειδικότερα, τα κύτταρα RT4 παρουσιάζουν ένα ήπιο μοτίβο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της επιβίωσης, με τα ποσοστά των ζωντανών κυττάρων, κάτω από την επίδραση των ενδιάμεσων συγκεντρώσεων του παράγοντα (0,01, 0,1 και 1 μM 17-DMAG), να κυμαίνονται πάνω από το 85%. Στην υψηλότερη συγκέντρωση της ημισυνθετικής ανσαμυκίνης (10 μM 17-DMAG) παρατηρείται η μεγαλύτερη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων χαμηλής κακοήθειας, η οποία ωστόσο δεν ξεπερνά το 70%. Τα κύτταρα RT112, T24 και TCCSUP εμφανίζουν καλύτερη απόκριση στην κυτταροτοξική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με τα επιμέρους ποσοστά επιβίωσης να παρουσιάζουν σημαντική αναστολή, από τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, καθώς τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται μεταξύ 65-70% (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Η βιωσιμότητα των κυττάρων ενδιάμεσης (RT112) και υψηλής (T24 και TCCSUP) κακοήθειας μειώνεται σημαντικά κάτω από την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης του 17-DMAG (10 μM), με τα επιμέρους ποσοστά επιβίωσης να μην ξεπερνούν το 25%, γεγονός το οποίο αναδεικνύει την εξαιρετικά υψηλή

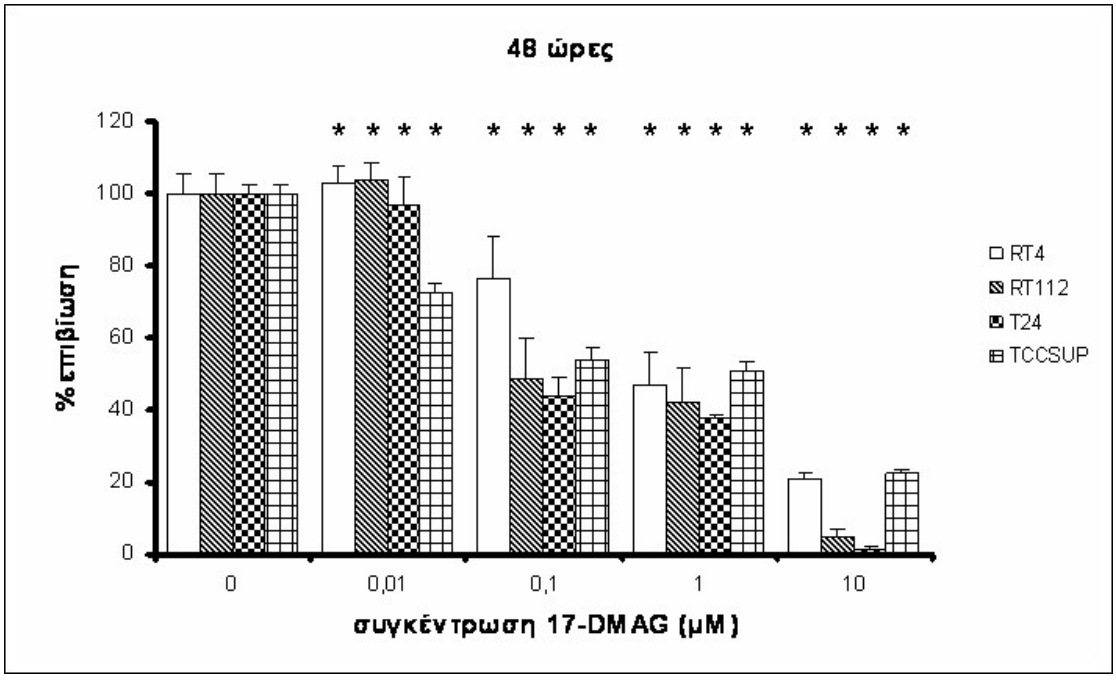
στόχευση των κυττάρων υψηλής κακοήθειας από το χημειοθεραπευτικό παράγοντα.



Εικόνα 58: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-DMAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 24 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, p<0,05).

Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών (Εικόνα 59), φαίνεται ξεκάθαρα η σημαντική μείωση της κυτταρικής επιβίωσης για όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, καθώς πέρα από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του φαρμακευτικού παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), τα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης επιδεικνύουν ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της βιωσιμότητάς τους. Ειδικότερα, τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρουσιάζονται πιο ανθεκτικά στην κυτταροτοξική επίδραση του 17-DMAG, με το επιμέρους ποσοστό επιβίωσης να υπολογίζεται κοντά στο 70% για την ενδιάμεση δόση του 0,1 μM, με επακόλουθη ισχυρή αναστολή στις υψηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα, αναδεικνύοντας την αυξημένη κυτταροτοξική επίδραση της ανσαμυκίνης, όπου η επιμέρους επιβίωση δεν ξεπερνά το 20% κάτω από την επίδραση της υψηλότερης δόσης (10 μM 17-DMAG). Τα καρκινικά κύτταρα RT112 και T24 εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της επιβίωσής τους σε απόκριση αυξανόμενων

συγκεντρώσεων του 17-DMAG σε διάστημα 48 ωρών, επιδεικνύοντας μεγαλύτερη ευαισθησία στην κυτταροτοξική δράση του παράγοντα σε σχέση με την κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας, με τα επιμέρους ποσοστά επιβίωσης να μειώνονται δραματικά από την ενδιάμεση συγκέντρωση (0,1 μM 17-DMAG), σχεδόν οδηγώντας σε εξαφάνιση των ζωντανών κυττάρων στην υψηλή δόση (ποσοστό επιβίωσης κάτω από 10%). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP εμφανίζουν ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη ανταπόκριση στην κυτταροτοξική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με πρότυπο μείωσης όμοιο με αυτό των κυττάρων RT4, επιδεικνύοντας ωστόσο σημαντική ελάττωση της επιβίωσης στις χαμηλές συγκεντρώσεις του 17-DMAG (0,01 και 0,1 μM), σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά της καρκινικής σειράς χαμηλής κακοήθειας, ενώ το ποσοστό των κυττάρων που καταμετρώνται για την υψηλότερη δόση (10 μM) προσεγγίζει το 25%.



Εικόνα 59: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του παράγοντα 17-DMAG στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, σε διάστημα 48 ωρών (*: δείκτης αξιοπιστίας στατιστικά σημαντικής διαφοράς, $p<0,05$).

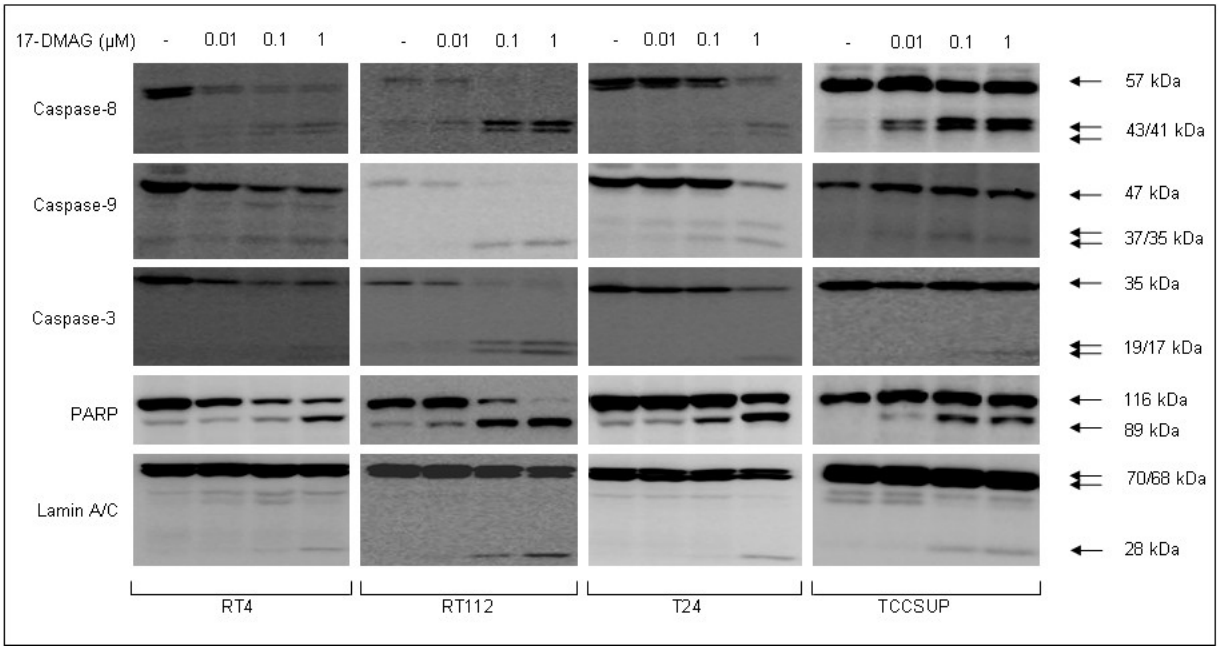
Τα πειραματικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω καταδεικνύουν την ισχυρή ανασταλτική επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην επιβίωση καρκινικών κυτταρικών σειρών

ουροδόχου κύστης, σε χρονικά διαστήματα επώασης 24 και 48 ωρών, αντικατοπτρίζοντας τον ισχυρό κυτταροτοξικό χαρακτήρα του φαρμακευτικού παράγοντα και αναδεικνύοντας την εξειδικευμένη, αντι-νεοπλασματική του δράση. Η μελέτη των μονοπατιών κυτταρικής απόκρισης στην εν λόγω ημισυνθετική ανσαμυκίνη βενζοκινόνης που περιγράφονται παρακάτω, καθώς και των αποκρίσεων που ήδη αναφέρθηκαν (Εικόνες 56 και 57), πραγματοποιήθηκε για τις συγκεντρώσεις του 17-DMAG εκτός αυτής των 10 μΜ, λόγω ισχυρής μείωσης των επιπέδων επιβίωσης που επιδεικνύουν οι κυτταρικές σειρές για την υψηλότερη δόση του παράγοντα.

4.3.3 Το 17-DMAG ενεργοποιεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο – Ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου

Η ελάττωση της επιβίωσης καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης σε ανταπόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG οδήγησε στην μελέτη της ενεργοποίησης μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και πιο συγκεκριμένα, την επαγωγή αποπτωτικού φαινοτύπου. Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που αναλύθηκαν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών, το οποίο ενορχηστρώνει την ανάπτυξη της απόπτωσης. Τα επιμέρους πρωτεϊνικά επίπεδα της συστατικής έκφρασης αλλά και της επαγόμενης πρωτεολυτικής ενεργοποίησης μελών του καταρράκτη των κασπασών, για όλες τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης, παρουσιάζονται στην Εικόνα 60. Σε όλες τις καρκινικές σειρές, με διαφορετικό όμως πρότυπο ενεργοποίησης ανά κυτταρικό τύπο, καταδεικνύεται σαφώς μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρόδρομων μορφών με επακόλουθη εμφάνιση ενεργών κασπασών, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG. Πιο αναλυτικά, στα καρκινικά κύτταρα RT4, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρόδρομης μορφής της εναρκτήριας κασπάσης-8 εμφανίζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση, με παράλληλη ενεργοποίηση μέσω πρωτεόλυσης, από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μΜ 17-DMAG). Η πρόδρομη μορφή του

μορίου (πρωτεϊνική ζώνη σε μοριακό βάρος 57 kDa) εξαλείφεται στην υψηλότερη συγκέντρωση του 17-DMAG, με ενεργά, πρωτεολυτικά θραύσματα (43 και 41 kDa) να ανιχνεύονται στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, καταδεικνύοντας τα υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης της εναρκτήριας κασπάσης. Παρόμοιο πρότυπο πρωτεολυτικής ενεργοποίησης παρουσιάζει και η κασπάση-9, με το συνολικό πρότυπο απόκρισης στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του παράγοντα να εμφανίζει ηπιότερα επίπεδα πρωτεόλυσης, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενεργοποίησης της κασπάσης-8. Παρ' όλα αυτά, η πρόδρομη μορφή (47 kDa) της κασπάσης-9 επιδεικνύει δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση, με πρωτεολυτικά θραύσματα (37 και 35 kDa) να ανιχνεύονται με μεγαλύτερη ένταση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του 17-DMAG (0,1 και 1 μM).



Εικόνα 60: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και των ομοειδών τους υποστρωμάτων, καθώς και στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Η φαρμακο-επαγόμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-8 όσο και της κασπάσης-9 αντικατοπτρίζουν την επαγωγή και των δύο (2) μονοπατιών αποπτωτικού θανάτου (μονοπάτι υποδοχέων θανάτου και ενδογενές, μιτοχονδριακό μονοπάτι). Η εκτελεστική κασπάση-3, παρουσιάζει πρότυπο

ήπιας δοσο-εξαρτώμενης ενεργοποίησης, με την πρόδρομη μορφή του μορίου (35 kDa) να μειορυθμίζεται σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, ενώ η ανάπτυξη ενεργών μορφών (19 και 17 kDa) ανιχνεύεται στην υψηλότερη δόση (1 μM 17-DMAG). Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η μελέτη της δραστηριοποίησης της κασπάσης-3, με την ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων που αποτελούν υποστρώματα της πρωτεολυτικής δράσης της εκτελεστικής κασπάσης, όπως είναι οι λαμίνες και το PARP. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 60, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4, η φαρμακο-επαγόμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 ενορχηστρώνει την πρωτεόλυση τόσο των λαμινών A/C, όσο και του πυρηνικού αντιγόνου PARP, με την παραγωγή κατακερματισμένων θραυσμάτων (τα οποία ανιχνεύονται σε μοριακό βάρος 28 και 89 kDa αντίστοιχα), κάτω από την επίδραση τη υψηλότερη συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG).

Τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των μορίων που συμμετέχουν στον καταρράκτη των κασπασών, με τα επίπεδα επαγωγής να είναι πιο ισχυρά από αυτά που εμφανίζει η κυτταρική σειρά RT4, καθώς η ενεργοποίηση του μονοπατιού φαίνεται να επάγεται από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου (0,01 μM 17-DMAG). Ειδικότερα εμφανίζεται ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης ενεργοποίησης της κασπάσης-8 με την παραγωγή ενεργών πρωτεολυτικών θραυσμάτων (43 και 41 kDa) να ενισχύεται σημαντικά πέρα από την κρίσιμη συγκέντρωση του 0,1 μM 17-DMAG. Παράλληλα, παρατηρείται έντονη μειορύθμιση της πρόδρομης μορφής του μορίου (57 kDa), τα επίπεδα του οποίου εξαλείφονται κάτω από την επίδραση της ενδιάμεσης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Παρόμοιο μοτίβο ισχυρής, δοσο-εξαρτώμενης ενεργοποίησης εμφανίζει και η κασπάση-9, με την πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης να μειορυθμίζεται παράλληλα με την παραγωγή ενεργών προϊόντων πρωτεόλυσής της, από την ενδιάμεση συγκέντρωση του φαρμάκου (0,1 μM 17-DMAG). Η εκτελεστική κασπάση-3, κάτω από την επίδραση της έντονης ανωρροϊκής επαγωγής των κασπασών-9 και -8 παρουσιάζει επίσης, ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης

πρωτεόλυσης, με ολική εξάλειψη των επιπέδων της πρόδρομης πρωτεΐνης, από τη συγκέντρωση του 0,1 μM 17-DMAG. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 60, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112, η φαρμακο-επαγόμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 ενορχηστρώνει την πρωτεόλυση των λαμινών A/C και του PARP, με την παραγωγή κατακερματισμένων θραυσμάτων κάτω από την επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων του 17-DMAG.

Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας (T24 και TCCSUP) εμφανίζουν διαφοροποιημένη απόκριση της κυτταροτοξικής επίδρασης του 17-DMAG, καθώς τα TCCSUP εμφανίζουν ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών, το οποίο προκύπτει από τις ηπιότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), ενώ τα κύτταρα T24 από την άλλη, δεν εμφανίζουν πρωτεολυτική ενεργοποίηση των κασπασών, παρά μόνο κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμάκου (1 μM 17-DMAG). Τόσο η κασπάση-8 όσο και η κασπάση-9, ακολουθούν ένα διαφορικό πρότυπο ενεργοποίησης για τις δύο (2) κυτταρικές σειρές υψηλής κακοήθειας, με τα TCCSUP να εμφανίζουν υψηλή ενεργοποίηση από την μικρότερη συγκέντρωση 17-DMAG (παραγωγή θραυσμάτων 43/41 και 37/35 kDa αντίστοιχα), ενώ τα κύτταρα T24 εμφανίζονται σχετικά ανθεκτικά στην επαγωγή αποπτωτικού θανάτου, με την ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών να προκύπτει κάτω από την επίδραση της υψηλότερης δόσης του παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Παρόμοιο πρότυπο ενεργοποίησης παρατηρείται και για την εκτελεστική κασπάση-3, με τα κύτταρα TCCSUP να παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης από τις ηπιότερες συγκεντρώσεις του χημειοθεραπευτικού, αντίθετα με τα κύτταρα T24. Σε ό,τι αφορά στη δομική ακεραιότητα των υποστρωμάτων της εκτελεστικής κασπάσης-3, το πρότυπο της μειορύθμισης και της επαγωγής του κατακερματισμού των δομικών στοιχείων του πυρήνα των κυττάρων αποδεικνύεται πως ακολουθεί αυτό της ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών. Ειδικότερα, τα TCCSUP εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πρωτεολυτικής διάσπασης των λαμινών A/C και του PARP από την ενδιάμεση συγκέντρωση του 17-DMAG (0,01 μM), με τα προϊόντα κατακερματισμού τους να ανιχνεύονται σε μοριακό βάρος 28 και 89 kDa αντίστοιχα. Στην κυτταρική

σειρά T24, πρωτεολυτική διάσπαση των υποστρωμάτων της εκτελεστικής κασπάσης-3 ανιχνεύεται μόνο κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG, για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Η διαφορική ενεργοποίηση του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, αναδεικνύει τη σημασία των διαφορών του γενετικού περιεχομένου και του πρωτεωμικού υποβάθρου του εκάστοτε κυτταρικού τύπου στην ανάπτυξη των μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Φαίνεται πως ο βαθμός κακοήθειας και οι επιμέρους γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που φέρουν τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, οδηγούν σε διαφορική ανταπόκριση στον κυτταροτοξικό φαρμακευτικό παράγοντα. Η ανάπτυξη επιπλέον μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία, ενδεχομένως να λειτουργούν συνεργιστικά στην επαγόμενη από απόπτωση μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης.

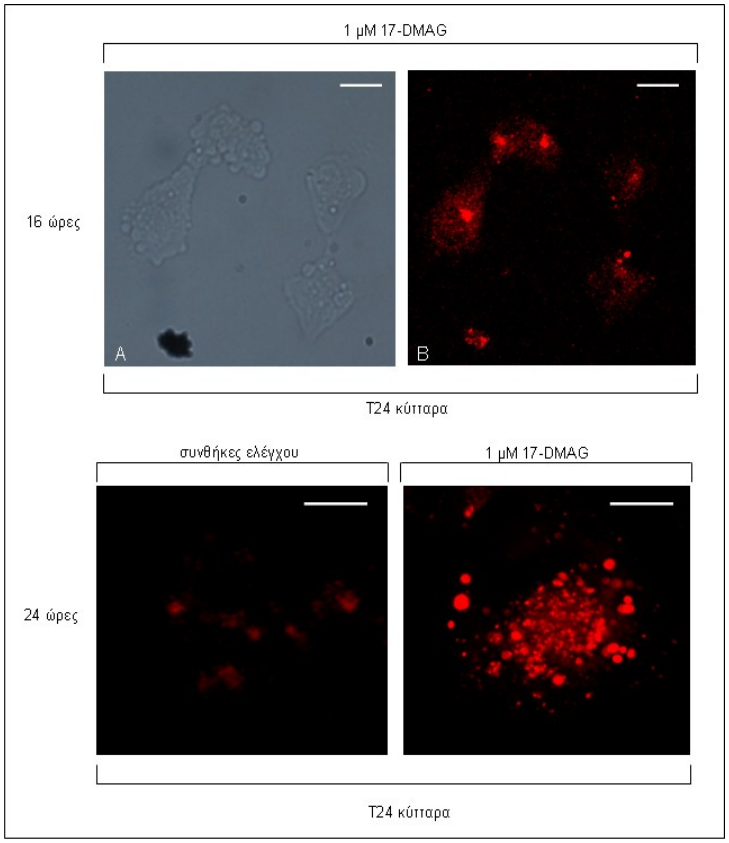
Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται στο σημείο αυτό καταδεικνύουν σαφώς την ικανότητα του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG να ενεργοποιεί τα επιμέρους μόρια που συμμετέχουν στον καταρράκτη των κασπασών, με επακόλουθη επαγωγή της εκτελεστικής κασπάσης-3 και την ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου, με διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης, ωστόσο, για την κάθε κυτταρική σειρά. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 οδηγεί στην πρωτεόλυση των πυρηνικών υποστρωμάτων της, όπως είναι οι λαμίνες και το PARP, πρωτεϊνικά μόρια που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του πυρήνα. Ο κατακερματισμός των πρωτεϊνών αυτών, κάτω από την επίδραση 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, αποτελεί πρόσθετη απόδειξη για την επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, μέσα από προγραμματισμένη ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και πρωτεόλυση των υποστρωμάτων του μεγάλου ρεπερτορίου τους.

4.3.4 Η χορήγηση 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης ενεργοποιεί εναλλακτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου – Αυτοφαγία

Η μείωση της βιωσιμότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG αναδεικνύει τον ισχυρό αντι-νεοπλασματικό χαρακτήρα της συγκεκριμένης ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης. Όπως αποδείχθηκε πειραματικά στο προηγούμενο κεφάλαιο, η φαρμακο-επαγόμενη ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών λόγω της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG οδηγεί στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ενεργοποίησης εναλλακτικών μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου λόγω της επίδρασης του 17-DMAG, όπως η αυτοφαγία, με την ανίχνευση της λυσοσωμικής ενεργοποίησης με τη βοήθεια της συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser. Η παρατήρηση της φαινοτυπικής ενεργοποίησης των λυσοσωμάτων σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας ειδικής φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται μη αντιστρεπτά με ενεργοποιημένα λυσοσώματα (Lysotracker Red). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 61, η επίδραση υψηλής συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG) σε καρκινικά κύτταρα T24 για χρονικό διάστημα 24 ωρών οδήγησε σε έντονη χρώση των κυττάρων, αποκαλύπτοντας την ενεργοποίηση των λυσοσωμάτων και την επικείμενη ανάπτυξη αυτοφαγικού θανάτου. Η διαδικασία της ενεργοποίησης των λυσοσωμάτων λόγω επίδρασης του 17-DMAG, αποτελεί ένα πρόσθετο φαινόμενο προγραμματισμένου θανάτου, το οποίο ενδεχομένως πρόκειται για αυτοφαγία μεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς (chaperone mediated autophagy, CMA) [336-339], το οποίο συνεπικουρεί την ανάπτυξη της κυτταροτοξικής δράσης του φαρμακευτικού παράγοντα. Η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 πιθανόν οδηγεί στην επιλεκτική λυσοσωμική αποικοδόμηση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων του κυτταροπλάσματος, οι

οποίες βρίσκονται σε στενή σύνδεση με το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών. Οι πρωτεΐνες αυτές, οι οποίες φέρουν μια αλληλουχία αμινοξέων με υψηλή ομολογία για πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsc70, οδηγούνται στο λυσόσωμα, αναγνωρίζονται από την μεμβρανική πρωτεΐνη συνδεδεμένη με λυσοσώματα 2A (LAMP2A, Lysosomal-associated membrane protein 2A) και εισέρχονται εντός του οργανιδίου, όπου ακολουθεί η αποικοδόμησή τους με τη βοήθεια των λυσοσωμικών ενζύμων [340].



Εικόνα 61: Ανάπτυξη αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24, κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG. Επάνω, κύτταρα T24 κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG (16 ώρες), A) Μικροσκοπία διαφορικής συμβολής (Differential interference microscopy, DIC) και B) Συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία laser. Κάτω αριστερά: κύτταρα T24 σε συνθήκες ελέγχου και κάτω δεξιά: κύτταρα T24 κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG (24 ώρες). Η χρώση ενεργών λυσοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με Lysotracker Red (Sigma-Aldrich) και η παρατήρηση έγινε κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

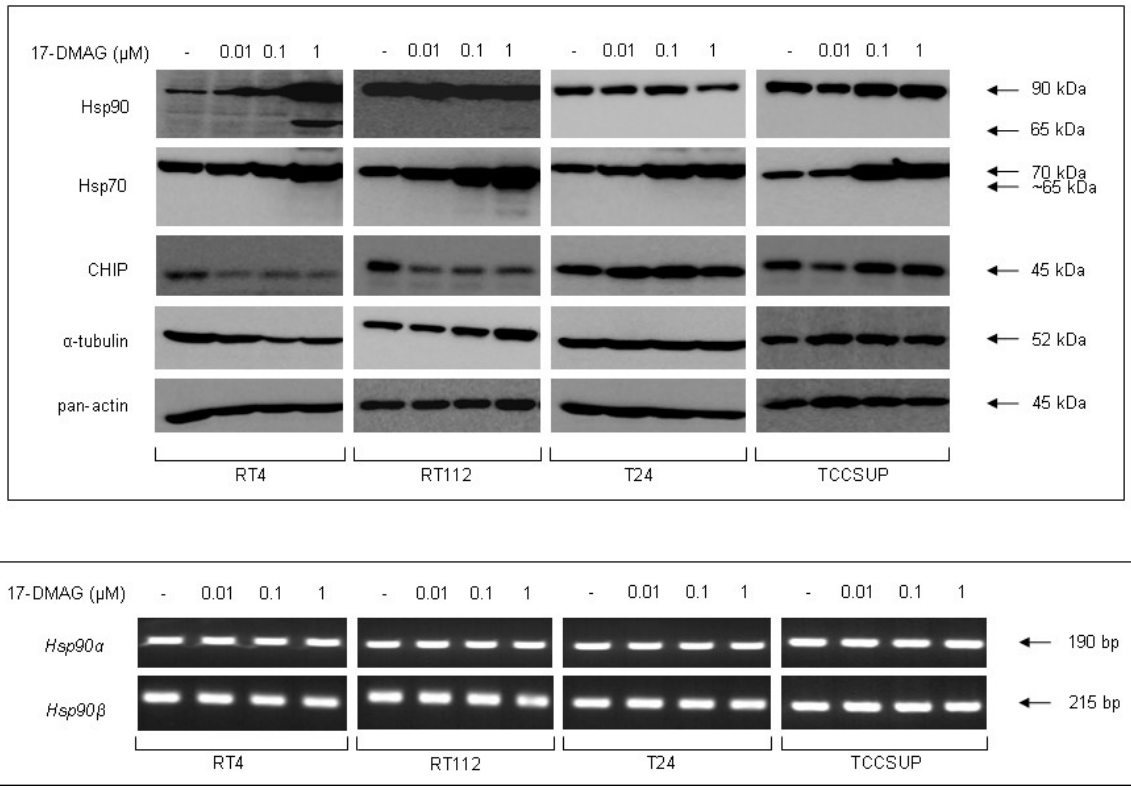
Ο επιλεκτικός λυσοσωμικός κατακερματισμός πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, λόγω αναστολής της Hsp90, καταδεικνύεται με την

ισχυρή χρώση των κυττάρων T24, κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 61 (επάνω), η ανάπτυξη χαρακτηριστικών για την απόπτωση, ακανόνιστων κυτταροπλασματικών φυσαλιδόμορφων προεκβολών (membrane blebbing) στα κύτταρα συνοδεύεται από ταυτόχρονη, ισχυρή ενεργοποίηση των λυσοσωμάτων, αναδεικνύοντας τον ενδεχόμενο συνεργιστικό ρόλο των δύο (2) επιμέρους μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στην μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης T24, λόγω επίδρασης 17-DMAG. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, καταδεικνύεται ο πολυανυσματικός κυτταροτοξικός χαρακτήρας του ημισυνθετικού αναλόγου 17-DMAG σε καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης.

4.3.5 17-DMAG και αναστολή της Hsp90

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται πιο πάνω, η ειδική ικανότητα πρόσδεσης του 17-DMAG στην Hsp90 και η ακόλουθη αναστολή της λειτουργικότητάς της, οδηγούν στην ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη μονοπατιών προγραμματισμένου θανάτου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που αναλύθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του 17-DMAG στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της Hsp90 και του συμπλόκου των συνοδών πρωτεϊνών, στις τέσσερις (4) κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστης, με τη βοήθεια ανάλυσης ανοσοστυπώματος Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 62, τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90, με την μέγιστη αύξηση να παρατηρείται για τις δύο (2) υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,1 και 1 μM) του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Επιπλέον, κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του υδατοδιαλυτού φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG σε κύτταρα χαμηλής κακοήθειας, ανιχνεύεται η παραγωγή ενός προϊόντος πρωτεολυτικής πέψης της Hsp90 σε μοριακό βάρος ~65 kDa, φαινόμενο το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό επιστημονικό εύρημα, το οποίο

παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Φαίνεται λοιπόν πως η επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης (τζελνταναμυκίνη, 17-AAG και 17-DMAG) σε κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, οδηγούν στην ανάπτυξη ενός χαρακτηριστικού φαρμακο-εξαρτώμενου (drug-dependent) μοτίβου μεταβολής της πρωτεΐνης Hsp90 και την παραγωγή ενός πρωτεολυτικού θραύσματος, το οποίο έχει μοριακό βάρος ~65 kDa και παρουσιάζεται για πρώτη φορά.



Εικόνα 62: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG στον μοριακό του στόχο – την Hsp90 και άλλα μέλη του συμπλόκου μοριακών συνοδών. Επάνω, η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μοριακών συνοδών Hsp90 και Hsp70 μέσω ανοσοστυπωμάτων Western. Κάτω, επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Hsp90α* και *Hsp90β* καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.

Τα καρκινικά κύτταρα (ενδιάμεσης κακοήθειας) RT112, σε ανταπόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG, δεν παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο αυξομείωσης με αυτό των κυττάρων RT4, ούτε με την παρατηρούμενη απόκριση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες τζελνταναμυκίνη και 17-AAG, που αναλύθηκαν παραπάνω. Όπως

φαίνεται στην Εικόνα 62, τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης Hsp90 δεν εμφανίζουν σημαντική μεταβολή κάτω από την επίδραση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του 17-DMAG. Η παραγωγή πρωτεολυτικού θραύσματος της Hsp90 (~65 kDa) παρατηρείται και σε αυτή την κυτταρική σειρά, όμοια με τα κύτταρα RT4, στη υψηλή συγκέντρωση 1 μM 17-DMAG.

Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 εμφανίζουν μια ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90, η οποία παρατηρείται κυρίως κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (1 μM DMAG). Η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 που παρατηρείται στην κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας TCCSUP εμφανίζει ένα ιδιαίτερο μοτίβο, καθώς σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, παρουσιάζεται αρχικά μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της μοριακής συνοδού για τη χαμηλότερη συγκέντρωση (0,01 μM 17-DMAG), η οποία ακολουθείται από δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της Hsp90 για τις υψηλότερες δόσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,1 και 1 μM), χωρίς να ανιχνεύεται η παραγωγή προϊόντων πρωτεολυτικής διάσπασης του μορίου.

Σε μια απόπειρα εξήγησης του προτύπου αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 σε απόκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων του 17-DMAG, επιχειρήθηκε η μελέτη της έκφρασης της λιγάσης ουβικουϊτίνης CHIP, η οποία ρυθμίζει τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90, καθώς και αυτά της ίδιας της μοριακής συνοδού, καθοδηγώντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω πρωτεασώματος [307-309, 341]. Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στη διατριβή αυτή, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της CHIP παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, καθώς επίσης και διαφορετικά βασικά επίπεδα έκφρασης ανά κυτταρική σειρά. Στην Εικόνα 62, φαίνεται σαφώς η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της CHIP για όλες τις κυτταρικές σειρές, με διαφορετική ωστόσο ένταση της μειορύθμισης, καθώς στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 αυτή εμφανίζεται από τη χαμηλή δόση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), με το φαινόμενο να αποκτά την μεγαλύτερη έντασή του για την υψηλή συγκέντρωση του 1 μM. Στα κύτταρα

ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρατηρείται παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης των επιπέδων της πρωτεΐνης CHIP με αυτό των κυττάρων RT4, με την αναστολή των επιπέδων της να προκύπτει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμακευτικού παράγοντα. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP διατηρούν αναλλοίωτα τα επίπεδα της λιγάσης ουβικουϊτίνης CHIP κάτω από την επίδραση των χαμηλών και ενδιάμεσων συγκεντρώσεων του 17-DMAG, ενώ κανείς θα μπορούσε να κάνει λόγο και για ήπια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων για τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις του παράγοντα (0,01 και 0,1 μM).

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, όπως προηγουμένως, έτσι και στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κυτταροπλασματική ακτίνη, αφού η α-τουμπουλίνη παρουσιάζει ιδιαίτερο μοτίβο διαφοροποίησης των πρωτεϊνικών της επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του 17-DMAG. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 παρατηρείται μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της α-τουμπουλίνης σε απόκριση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (έως και 0,1 μM 17-DMAG), η οποία αντιστρέφεται στην υψηλότερη δόση, με τα πρωτεϊνικά επίπεδα να επιδεικνύουν επαγωγή (1 μM). Τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρουσιάζουν ένα μοτίβο ήπιας, δοσο-εξαρτώμενης αύξησης των επιπέδων της κυτταροπλασματικής α-τουμπουλίνης, ενώ τα κύτταρα T24 επιδεικνύουν αμετάβλητα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, σε απόκριση ακόμα και των υψηλότερων συγκεντρώσεων του παράγοντα. Τέλος, τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP εμφανίζουν ένα πρότυπο ήπιας επαγωγής της τουμπουλίνης στις χαμηλές δόσεις της ανσαμυκίνης (0,01 και 0,1 μM 17-DMAG). Το πρότυπο αυτό διακόπτεται από την επακόλουθη ελαφρά μειορύθμιση, η οποία παρατηρείται στην υψηλή συγκέντρωση του 17-DMAG (1 μM).

Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που αναλύθηκαν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για τις δύο (2) ισομορφές της πρωτεΐνης Hsp90 (*Hsp90α* και *Hsp90β*), κάτω από την επίδραση αυξανόμενων

συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 62, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των δύο (2) γονιδίων *Hsp90α* και *Hsp90β* παραμένουν αμετάβλητα και για τις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό καταδεικνύει πως η παρατηρούμενη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 σε απόκριση στο φαρμακευτικό παράγοντα δεν επέρχεται λόγω διαφοροποίησης των επιπέδων του mRNA και του μεταγραφικού προφίλ των γονιδίων από τα οποία κωδικοποιείται η συγκεκριμένη μοριακή συνοδός, αλλά ότι οποιαδήποτε τροποποίηση στα ανιχνευόμενα πρωτεϊνικά επίπεδα της Hsp90, προκύπτει σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο.

4.3.6 Η χορήγηση 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε πολλαπλή αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης

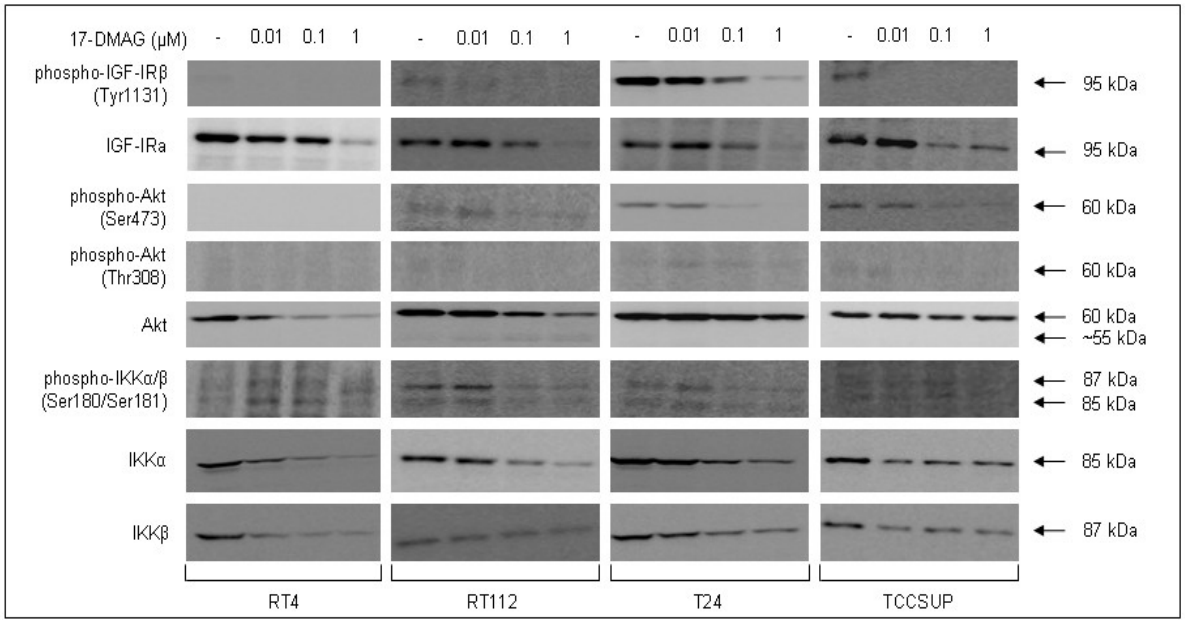
Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών που αναλύθηκαν παραπάνω, διερευνήθηκε η επίδραση της αναστολής της μοριακής συνοδού Hsp90 λόγω 17-DMAG στην κυτταρική σηματοδότηση. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του υδατοδιαλυτού ημισυνθετικού παράγοντα στον άξονα σηματοδότησης IFG-IR/Akt/NF-κB σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 63, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στην κυτταρική σειρά RT4 οδηγεί σε μειορύθμιση των επιπέδων του υποδοχέα του προσομοιάζοντα στην ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I (IGF-IR). Καταδεικνύεται επίσης, η δραστική δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του συγκεκριμένου υποδοχέα, κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της επίδρασης της τζελνταναμυκίνης και του 17-AAG, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, δεν παρουσιάζεται βασική (συστατική,

constitutive) φωσφορυλίωση του υποδοχέα του IGF-I στο κατάλοιπο τυροσίνης της αμινοξικής θέσης 1131 (Tyr1131).

Η κυτταρική σειρά RT112 (ενδιάμεσης κακοήθειας) εμφανίζει γραμμική μειορύθμιση των επιπέδων του υποδοχέα, με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του IGF-IR να μην ανιχνεύονται στο πρωτέωμα, κάτω από την επίδραση της υψηλής δόσης του φαρμακευτικού παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 63, η κυτταρική σειρά RT112 εμφανίζει ανιχνεύσιμα επίπεδα συστατικής ενεργότητας του υποδοχέα IGF-I, με τη φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνης της θέσης 1131 (Tyr1131) να αναστέλλεται πλήρως, κάτω από την επίδραση της χαμηλότερης συγκέντρωσης του 17-DMAG (0,01 μM). Παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης παρουσιάζουν και οι κυτταρικές σειρές T24 και TCCSUP, με τα επίπεδα της πρωτεΐνης IGF-IR να εμφανίζουν έντονη αναστολή από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG). Τα υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης του υποδοχέα στην κυτταρική σειρά T24 ακολουθούν παρόμοιο μοτίβο μειορύθμισης, αναδεικνύοντας την ανασταλτική επίδραση του 17-DMAG στην μεταγωγή σήματος IGF-IR από την κυτταρική μεμβράνη προς τον πυρήνα. Τα κύτταρα TCCSUP (βαθμού κακοήθειας IV), αν και εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα συστατικής ενεργοποίησης του υποδοχέα, υφίστανται ολική εξάλειψη των επιπέδων φωσφορυλίωσης από την χαμηλότερη δόση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM), αντικατοπτρίζοντας την ισχυρή ανασταλτική επίδραση του 17-DMAG σε κύτταρα υψηλής κακοήθειας.

Ένα πολύ σημαντικό μόριο που εντοπίζεται κατωρροϊκά του υποδοχέα IGF-I και μεσολαβεί στην μεταγωγή σήματος μέσω πολλαπλών μονοπατιών είναι η κινάση Akt, η οποία αποτελεί σημαντική πρωτεΐνη-«πελάτη» της μοριακής συνοδού Hsp90 [313, 342]. Σε απόκριση της χορήγησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, παρατηρείται δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της κινάσης Akt και στις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4, η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων του φαρμακευτικού παράγοντα οδηγεί στην ανάπτυξη ενός μοτίβου μειορύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Akt, με

την ένταση του φαινομένου να αυξάνει προοδευτικά, πέρα από την κρίσιμη, χαμηλή συγκέντρωση της ανσαμυκίνης (0,01 μM 17-DMAG). Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η κυτταρική σειρά RT4 δεν εμφανίζει συστατική φωσφορυλίωση της κινάσης Akt στα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης των αμινοξικών θέσεων 473 και 308 αντίστοιχα (Ser473 και Thr308), με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται βασικά επίπεδα ενεργοποιημένης πρωτεΐνης. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, δεν παρατηρείται μεταβολή στην φωσφορυλίωση της κινάσης Akt σε κανένα από τα δύο αμινοξικά κατάλοιπα των θέσεων 308 και 473.



Εικόνα 63: Επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι IGF-IR/Akt, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης της πρωτεΐνης Akt παρουσιάζουν και τα κύτταρα RT112, ωστόσο το πρότυπο της μείωσης των επιπέδων της κινάσης εμφανίζεται ηπιότερο σε σχέση με αυτό της σειράς χαμηλής κακοήθειας, καθώς απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα, ώστε να επιτευχθεί σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Akt (Εικόνα 63). Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή ενός πρωτεολυτικού προϊόντος μικρότερου μοριακού βάρους της Akt (~55 kDa)

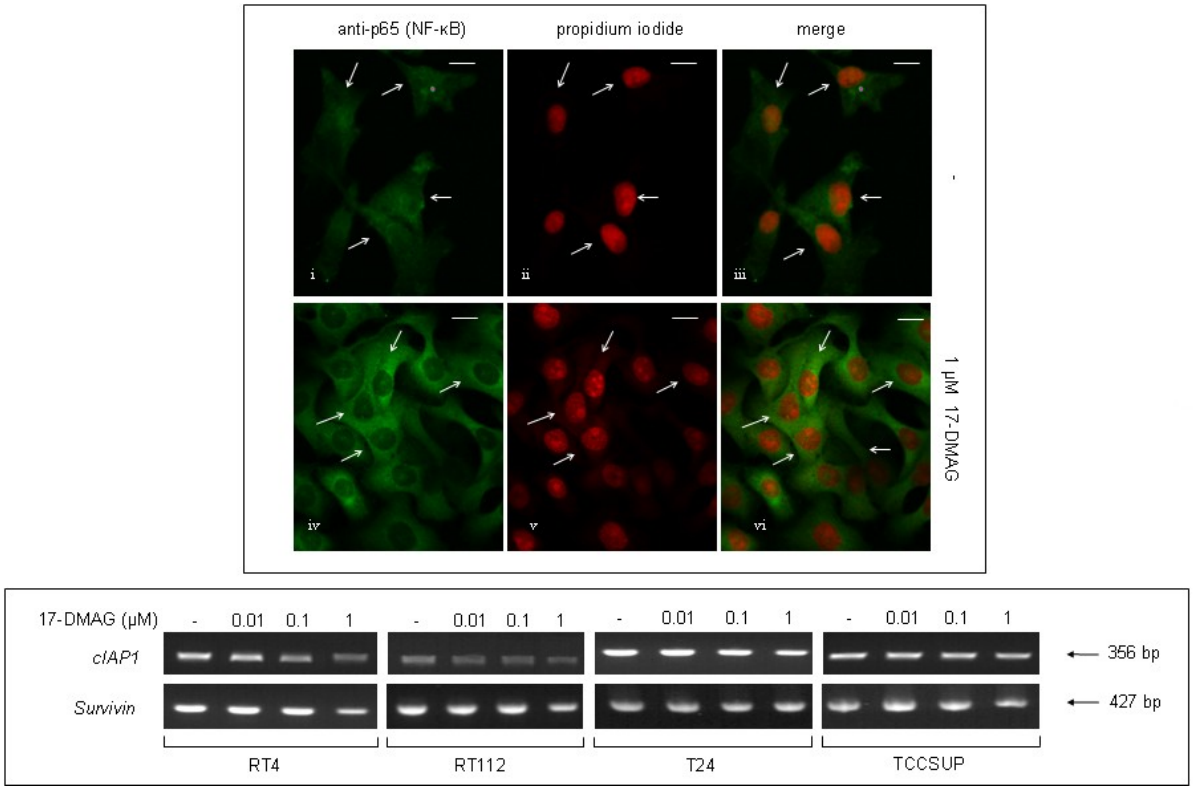
στα καρκινικά κύτταρα RT112, κυρίως σε απόκριση των δύο (2) υψηλότερων συγκεντρώσεων 17-DMAG (0,1 και 1 μM). Στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, η μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κινάσης Akt δεν συνοδεύτηκε από ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντος πρωτεόλυσης, αναδεικνύοντας το κυτταρο-ειδικό πρότυπο απόκρισης της Akt μειορύθμισης, κάτω από την επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90. Τα καρκινικά κύτταρα RT112 εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στο κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473 (Ser473), τα οποία εξαλείφονται κάτω από την επίδραση της χαμηλότερης δόσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), ενώ δεν ανιχνεύεται φωσφορυλίωση του καταλοίπου θρεονίνης στη θέση 308 (Thr308). Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι σε καμία από τις τέσσερις (4) κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στη θέση 308 (Thr308), σε συνθήκες απουσίας φαρμάκου.

Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP εμφανίζουν δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης Akt σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, με την μειορύθμιση όμως να μην είναι τόσο έντονη, όσο αυτή που παρουσιάζουν οι κυτταρικές σειρές χαμηλής κακοήθειας. Τόσο τα κύτταρα T24, όσο και τα TCCSUP, παρουσιάζουν μια ήπια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της κινάσης Akt, με σημαντική μείωση της πρωτεΐνης κάτω από την επίδραση της υψηλής δόσης του 17-DMAG (1 μM) στα κύτταρα T24, ενώ και στα TCCSUP το φαινόμενο περιορίζεται στην υψηλότερη συγκέντρωση (1 μM 17-DMAG). Χαρακτηριστικό γεγονός αποτελεί η ανίχνευση επιπέδων συστατικής φωσφορυλίωσης Akt στο κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473 (Ser473), για τα καρκινικά κύτταρα T24 και τα TCCSUP. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης Akt στις δύο (2) κυτταρικές σειρές υψηλού βαθμού κακοήθειας παρουσιάζει ένα δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης, μέχρι και την υψηλότερη συγκέντρωση (1 μM 17-DMAG) του παράγοντα, όπου τα επιμέρους επίπεδα φωσφορυλίωσης πρακτικά εξαλείφονται. Η ήπια 17-DMAG επαγόμενη φωσφορυλίωση της Akt κινάσης (0,01 και 0,1 μM) στο κατάλοιπο θρεονίνης

της θέσης 308 (Thr308) στα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, παρά την ακόλουθη δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση αυτής, αντιπροσωπεύει ενδεχομένως μια αντισταθμιστική (counterbalancing) και αμυντική απόκριση των κυττάρων στην ισχυρά κυτταροτοξική ενεργότητα του φαρμάκου.

Η ανάσχεση της σηματοδοτικής ικανότητας της κινάσης Akt, λόγω επίδρασης του 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης ελέγχθηκε περαιτέρω με την ανίχνευση της πιθανής μεταβολής πρωτεϊνικών κινασών που εντοπίζονται κατωρροϊκά στο ίδιο μονοπάτι. Τέτοιες είναι οι γνωστές ως κινάσες ΙΚΚ (ΙκΒ kinases), οι οποίες βρέθηκαν να παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG και για τις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Εικόνα 63). Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4 εμφανίζει ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων τόσο της ΙΚΚα, όσο και της ΙΚΚβ, η οποία προκύπτει από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG). Παρόμοιο μοτίβο μειορύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων των κινασών ΙΚΚα/β εμφανίζεται στην κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Ειδικότερα, η κινάση ΙΚΚα εμφανίζει σημαντική δοσο-εξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων πέρα από την ενδιάμεση συγκέντρωση του φαρμακευτικού παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG), ενώ αντίστοιχα η κινάση ΙΚΚβ παρουσιάζει ήπιο πρότυπο μειορύθμισης. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, αν και αναπτύσσουν παρόμοιο μοτίβο μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων των κινασών ΙΚΚ, αυτή επιτελείται κάτω από υψηλότερες συγκεντρώσεις 17-DMAG, καθώς τα επίπεδα τόσο της ΙΚΚα, όσο και της ΙΚΚβ παρουσιάζουν εμφανή ελάττωση στις δύο (2) υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Τέλος, η κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας TCCSUP εμφανίζει δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των κινασών ΙΚΚ, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, με το μοτίβο της μείωσης να εμφανίζεται εντονότερο από αυτό των κυττάρων T24.

Όπως καταδεικνύει η Εικόνα 63, όλες οι κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν εμφανίζουν επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των κινασών ΙΚΚα και ΙΚΚβ στα κατάλοιπα σερίνης των θέσεων 180 και 181 αντίστοιχα (Ser180 και Ser181), με τα κύτταρα RT112 και T24 να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα βασικής ενεργότητας. Κάτω από την επίδραση του 17-DMAG και λόγω αναστολής της Hsp90, παρατηρείται ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων κινασών και στις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές, με αποτέλεσμα να παρατηρείται εξάλειψη των επιπέδων φωσφορυλίωσης των κινασών ΙΚΚ, η οποία συντελείται από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG).



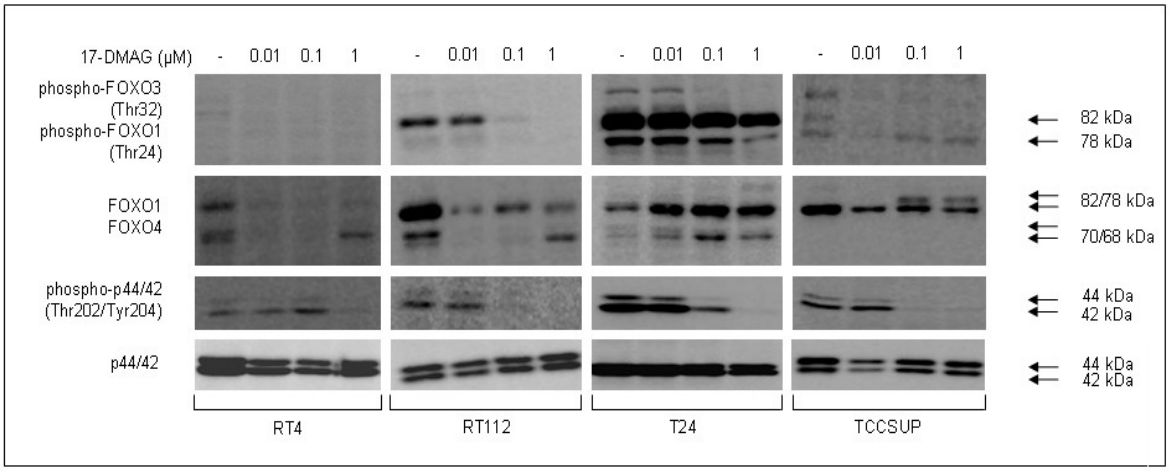
Εικόνα 64: Αναστολή ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα 17-DMAG, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Επάνω, εντοπισμός του παράγοντα NF-κB σε καρκινικά κύτταρα T24. Στις εικόνες παρουσιάζεται πείραμα ανοσοκυτταροχημείας μετά από παρατήρηση σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm). Κάτω, αναστολή του μεταγραφικού δυναμικού του παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση 17-DMAG. Δοσο-εξαρτώμενη αναστολή της έκφρασης των γονιδίων *cIAP1* και *Survivin* σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Η πολλαπλή επίδραση της επαγόμενης από 17-DMAG αναστολής της Hsp90 σε διάφορα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF-IR/Akt/IKK και η δραματική μείωση της μεταγωγής σήματος από την πλασματική μεμβράνη προς τον πυρήνα, οδήγησε στην μελέτη της φαρμακο-επαγόμενης μεταβολής της μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα NF-κB, τον τελικό «στόχο» του συγκεκριμένου άξονα σηματοδότησης. Όπως καταδεικνύει η Εικόνα 64, η απενεργοποίηση του μεταγραφικού δυναμικού του NF-κB συντελείται λόγω διαφοροποίησης της υποκυτταρικής θέσης εντοπισμού του. Όταν το μονοπάτι είναι ενεργό, ο NF-κB εντοπίζεται στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων T24, όπου καθοδηγεί την μεταγραφική ενεργότητα γενετικών τόπων που συνδέονται με την κυτταρική επιβίωση (και όχι μόνο).

Κάτω από την επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG παρατηρείται αλλαγή στο πρότυπο κυτταρικού εντοπισμού του μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος περιορίζεται πλέον στο κυτταρόπλασμα, αδυνατώντας να διατηρήσει τον ρυθμιστικό ρόλο του στην μεταγραφή γονιδίων-«στόχων» (Εικόνα 64, λευκά βέλη). Για τη λειτουργική επιβεβαίωση του παραπάνω πειραματικού αποτελέσματος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στην έκφραση γονιδίων-«στόχων» του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, όπως είναι τα γονίδια *cIAP1* και *Survivin*, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συνδέονται με την κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 64, κάτω). Είναι σαφές πως σε απόκριση της αναστολής της Hsp90 από αυξανόμενες συγκεντρώσεις 17-DMAG, τα γονίδια *cIAP1* και *Survivin* παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μείωση της μεταγραφικής τους ενεργότητας, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, αντικατοπτρίζοντας την αναστολή της λειτουργικότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG. Ειδικότερα, η μεταγραφική ενεργότητα του *cIAP1* εμφανίζει ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη αναστολή για όλες τις σειρές που μελετήθηκαν, με τα RT112 και TCCSUP να παρουσιάζουν ισχυρή καταστολή των επιπέδων έκφρασης κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του παράγοντα (1 μM 17-DMAG). Παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης παρατηρείται και στο γονίδιο *Survivin*, με όλες τις κυτταρικές σειρές να εμφανίζουν έντονη

αναστολή στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα. Τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται εδώ αναδεικνύουν την ισχυρή ανασταλτική δράση του 17-DMAG στην κυτταρική σηματοδότηση, με την μειορύθμιση μιας ποικιλίας πρωτεϊνικών μορίων που αποτελούν «πελάτες» της Hsp90.

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραματικών διαδικασιών, μελετήθηκε η επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της ενεργότητας Akt στην ομάδα μεταγραφικών παραγόντων FOXO (Forkhead box O transcription factors), η δράση των οποίων είναι στενά συνδεδεμένη με την αναστολή της ανάπτυξης κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 65: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην κυτταρική σηματοδότηση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO (επάνω) και των MAP κινασών p44/42 (Erk1/2, κάτω) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 65, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1 (μοριακό βάρος 78 kDa) παρουσιάζουν μια δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG, με το φαινόμενο να εντοπίζεται ισχυρότερο στην καρκινική σειρά RT4. Παρόμοια μείωση εμφανίζουν και τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του παράγοντα FOXO1 να παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη αναστολή, η οποία οδηγεί σε ισχυρή καταστολή των επιπέδων της πρωτεΐνης στην υψηλότερη δόση 17-DMAG (1 μM), με εξαίρεση μια μικρή επαγωγή η οποία καταγράφεται στην ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM 17-

DMAG). Παρόμοιο πρότυπο αναστολής του FOXO1 εμφανίζουν και τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP, με την ταυτόχρονη ανίχνευση μιας τροποποιημένης μορφής της πρωτεΐνης, η οποία εντοπίζεται σε μοριακό βάρος 82 kDa, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα (0,1 και 1 μM 17-DMAG). Αντίθετα από τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, τα κύτταρα T24 εμφανίζουν ένα διαφορετικό πρότυπο απόκρισης στο φαρμακευτικό παράγοντα, με τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1 να παρουσιάζουν ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή μέχρι την υψηλότερη συγκέντρωση του 1 μM 17-DMAG.

Η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του παράγοντα FOXO4 (μοριακό βάρος 68 kDa) παρουσιάζει όμοιο πρότυπο στις κυτταρικές σειρές χαμηλής κακοήθειας (RT4 και RT112). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα FOXO4 παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση στις χαμηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα (0,01 και 0,1 μM), η οποία ακολουθείται από ισχυρή επαγωγή κάτω από την κυτταροτοξική επίδραση της υψηλότερης δόσης του 17-DMAG (1 μM). Τα κύτταρα T24 εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης επαγωγής των επιπέδων του παράγοντα FOXO4 με αυτό που παρατηρήθηκε στο FOXO1, ενώ χαρακτηριστικό γεγονός αποτελεί η έλλειψη ανίχνευσης πρωτεϊνικών επιπέδων του FOXO4 στα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της μεταβολής της φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων FOXO στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 32 (Thr32) του παράγοντα FOXO3 και στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της θέσης 24 (Thr24) του παράγοντα FOXO1, σε ανταπόκριση προς το 17-DMAG. Όπως φαίνεται σαφώς στην Εικόνα 65, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν ανιχνεύεται συστατική φωσφορυλίωση σε καμία από τις δύο (2) θέσεις φωσφορυλίωσης, ενώ το πρότυπο φαίνεται πως έχει κύτταρο-ειδικό μοτίβο, καθώς τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 παρουσιάζουν επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των FOXO παραγόντων, τα οποία ελαττώνονται σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα, με τη φωσφορυλίωση να αναστέλλεται πλήρως στις υψηλότερες δόσεις του 17-

DMAG (0,1 και 1 μM). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24, εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης και για τους δύο (2) μεταγραφικούς παράγοντες FOXO, τα οποία σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, παρουσιάζουν ένα ήπιο δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο μειορύθμισης, με τα μέγιστα ποσοστά μείωσης να ανιχνεύονται στη δόση 17-DMAG του 1 μM. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP δεν φέρουν σημαντικά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης των παραγόντων FOXO, ενώ εμφανίζουν διαφοροποιημένο πρότυπο απόκρισης. Η φωσφορυλίωση του FOXO3 εμφανίζει δοσο-εξαρτώμενη αναστολή, με τα επίπεδα να εξαλείφονται από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG). Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του FOXO1 (στην κυτταρική σειρά TCCSUP) εμφανίζουν μειορύθμιση για τη χαμηλότερη συγκέντρωση του παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG), η οποία ακολουθείται από δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή για τις υψηλότερες δόσεις (0,1 και 1 μM). Η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της φωσφορυλίωσης των παραγόντων FOXO και η επικείμενη απελευθέρωσή τους στον πυρήνα, ώστε να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή προ-αποπτωτικών γονιδίων (π.χ. TRAIL), διευκολύνει την ανάπτυξη του αποπτωτικού φαινοτύπου και ενισχύει τον κυτταροτοξικό ρόλο του 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Στη συνέχεια των αποτελεσμάτων που παρατίθενται πιο πάνω, επιχειρήθηκε η μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG στην σηματοδότηση πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAP κινάσες). Το περίπλοκο δίκτυο μεταγωγής σήματος από τις MAP κινάσες είναι στενά συνυφασμένο με τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η κινάση Akt, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των δικτύων αυτών. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην Εικόνα 65 (κάτω), η μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των MAP κινασών p44/42 (γνωστές και ως κινάσες Erk1/2) κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, παρουσιάζει κύτταρο-ειδικό πρότυπο απόκρισης. Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζουν μια ήπια δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p44/42, ενώ τα καρκινικά

κύτταρα RT4 εμφανίζουν αρχικά μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων p44/42 για τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις του 17-DMAG (0,01 και 0,1 μM), η οποία ακολουθείται από επαγωγή των επιπέδων στην συγκέντρωση του 1 μM 17-DMAG. Παρόμοιο πρότυπο μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των MAP κινασών παρουσιάζουν και τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, αλλά και τα TCCSUP, με την εναλλαγή μειορύθμισης-αύξησης πρωτεϊνικών επιπέδων να προκύπτει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG).

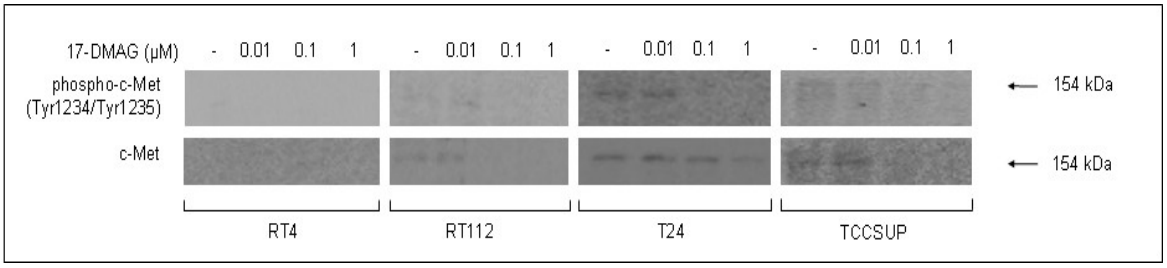
Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική επίδραση του 17-DMAG στην σηματοδότηση των κινασών p44/42, επιχειρήθηκε η ανίχνευση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε κατάλοιπα θρεονίνης της θέσης 202 (Thr202) για την p44 και σε κατάλοιπα τυροσίνης της θέσης 204 (Tyr204) για την p42, καθώς και η διαφοροποίηση της σηματοδότησης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 65 (κάτω), υπάρχει συστατική φωσφορυλίωση και των τεσσάρων (4) καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, ενώ παρουσιάζουν κοινό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της φωσφορυλίωσής τους, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, με τα κύτταρα ενδιάμεσης κακοήθειας RT112 και τα TCCSUP (υψηλής κακοήθειας) να εμφανίζουν την πιο ισχυρή μειορύθμιση, με ολική εξάλειψη της σηματοδότησης MAPK από την ενδιάμεση δόση (0,1 μM 17-DMAG) του φαρμακευτικού παράγοντα. Η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 φαίνεται, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, να ενορχηστρώνει την πολλαπλή αναστολή της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, με την λειτουργική ανάσχεση πολλαπλών μορίων-«στόχων» που συμμετέχουν στην προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης και τον πολλαπλασιασμό.

4.3.7 Η χορήγηση 17-DMAG οδηγεί σε αναστολή της κινητικότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης

Η αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, ενώ αποτελεί φαινοτυπική έκφραση που αποτελεί τη βάση της πρώιμης φάσης διήθησης γειτονικών ιστών από καρκινικά κύτταρα ενός όγκου. Ένα από τα μόρια-«κλειδιά» στην ανάπτυξη της κινητικότητας των εξαλλαγμένων κυττάρων και της έναρξης της κυτταρικής σηματοδότησης που οδηγεί στη διήθηση παρακείμενων ιστών αποτελεί ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF-R), γνωστός και ως c-Met. Σε μια προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 στην κυτταρική κινητικότητα, επιχειρήθηκε η μελέτη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην σηματοδότηση c-Met σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, με τη βοήθεια ανοσοστυπωμάτων Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 66, στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας RT4 δεν ανιχνεύονται συστατικά επίπεδα πρωτεΐνης c-Met, ενώ στα κύτταρα RT112 εντοπίζονται ίχνη του συγκεκριμένου υποδοχέα. Τα πλέον κακοήθη καρκινικά κύτταρα T24 παρουσιάζουν συστατικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη c-Met, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της οποίας φαίνεται να ακολουθούν πρότυπο ισχυρής δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, μέχρι τη συνολική εξάλειψή τους στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (1 μM) του παράγοντα. Τα κύτταρα TCCSUP (βαθμού κακοήθειας 4) εμφανίζουν συστατικά επίπεδα υποδοχέα c-Met, τα οποία μειορυθμίζονται κάτω από την επίδραση 17-DMAG, με την πλήρη αναστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων να επιτυγχάνεται κάτω από την επίδραση 0,1 μM 17-DMAG.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η μελέτη της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού c-Met στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, με την ανίχνευση φωσφορυλιωμένων μορίων του υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στις αμινοξικές θέσεις 1234 και 1235 (Tyr1234 και Tyr1235). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 66, δεν ανιχνεύονται επίπεδα

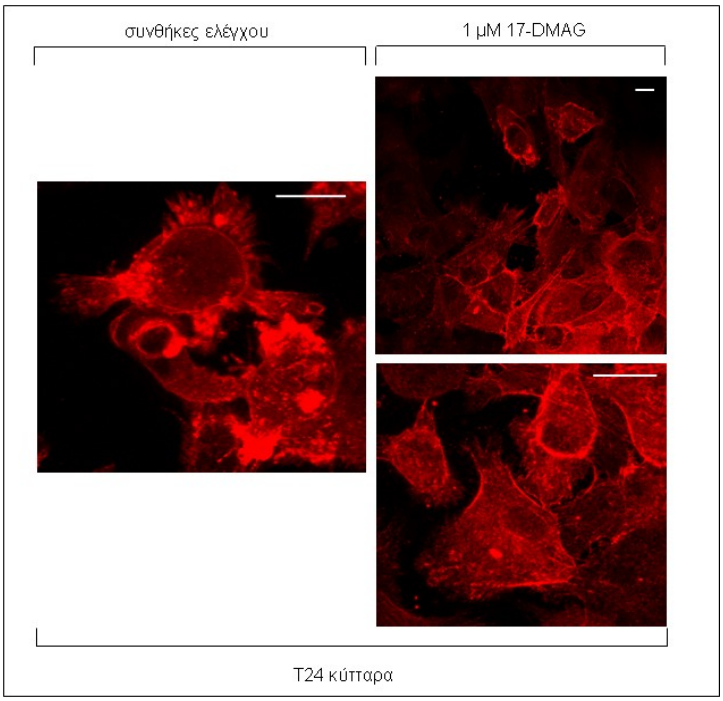
συστατικής φωσφορυλίωσης του υποδοχέα c-Met στην καρκινική σειρά χαμηλής κακοήθειας RT4. Η κυτταρική σειρά ενδιάμεσης κακοήθειας RT112, εμφανίζει ανιχνεύσιμα επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης c-Met, με την πρωτεϊνική ζώνη να εξαλείφεται κάτω από την επίδραση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων του φαρμακευτικού παράγοντα (0,01 μM 17-DMAG). Η καρκινική σειρά υψηλής κακοήθειας T24 παρουσιάζει συστατικά ενεργοποιημένο υποδοχέα c-Met, με τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης να ακολουθούν πρότυπο μειορύθμισης σε απόκριση γραμμικά αυξανόμενων δόσεων 17-DMAG, και ολική αναστολή της φωσφορυλίωσης από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM). Τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας TCCSUP εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα συστατικής ενεργοποίησης του υποδοχέα c-Met, με τη φωσφορυλίωση να εμφανίζει ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη αναστολή κάτω από την επίδραση του 17-DMAG, με την πλήρη ανάσχεση της ενεργότητας να επιτυγχάνεται από τη δόση του 0,1 μM του παράγοντα. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, αναδεικνύεται η ανασταλτική δράση του ημισυνθετικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην κινητικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών της ουροδόχου κύστης και στη δυναμική ανάσχεση του δυναμικού διεισδυτικότητας που φέρουν τα εξαλλαγμένα κύτταρα.



Εικόνα 66: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στο δυναμικό διεισδυτικότητας καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Αναστολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF υποδοχέας ή c-Met).

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική κίνηση αποτελούν σύνθετες διαδικασίες, οι οποίες απαιτούν τη συνεργιστική δράση και το συντονισμό πολλαπλών πρωτεϊνικών μορίων, ενώ ο κυτταροσκελετός αποτελεί κυρίαρχο δομικό και λειτουργικό στοιχείο, τα μόρια του οποίου προσδίδουν

την πλαστικότητα και την ελαστικότητα που διέπει την «ευελιξία» των καρκινικών κυττάρων [343]. Η ανάπτυξη κυτταρικών προεκβολών ή φυλλοποδίων, η προώθηση της κυτταρικής κίνησης και η μετανάστευση πραγματοποιούνται κάτω από το συντονισμό των επιμέρους μορίων του κυτταρικού σκελετού, τα οποία πολυμερίζονται ή αποπολυμερίζονται [344]. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη της μιτωτικής ατράκτου και η κυτοκίνηση που ολοκληρώνεται κατά την τελόφαση, με την απομάκρυνση των θυγατρικών κυττάρων, αποτελούν φαινόμενα στα οποία κατ' εξοχήν εμπλέκεται το δίκτυο του κυτταρικού σκελετού [345-347]. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μελέτη διάφορων επιμέρους μορίων του κυτταροσκελετού με την χρήση ανοσοκυτταροχημείας, για τη σήμανση των προς μελέτη πρωτεϊνικών μορίων και την ακόλουθη παρατήρηση των κυττάρων με τη χρήση συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser.



Εικόνα 67: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στον κυτταρικό εντοπισμό, την μορφή και την κατανομή της ολικής ακτίνης του κυτταρικού σκελετού. Οι οπτικές τομές που παρουσιάζονται προέρχονται από παρατήρηση καρκινικών κυττάρων T24 σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

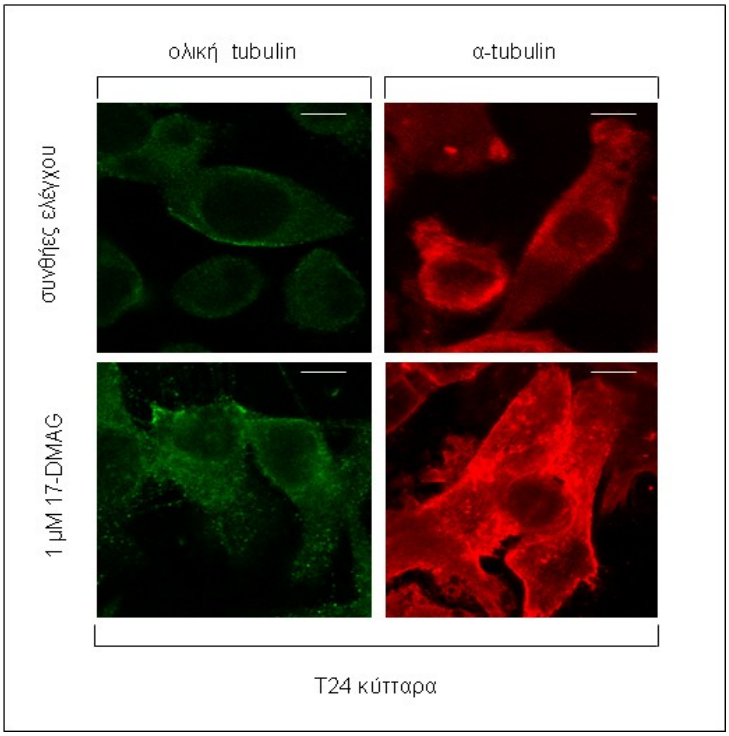
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 67, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της ολικής ακτίνης του κυτταρικού σκελετού καρκινικών κυττάρων ουροδόχου

κύστης T24, τόσο σε κανονικές συνθήκες, όσο και κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG, για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Οι τομές συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser που παρατίθενται εδώ αποκαλύπτουν μια μεταβολή του προτύπου διασποράς της ακτίνης στο κυτταρόπλασμα, κάτω από την επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Σε κανονικές συνθήκες, η ακτίνη φαίνεται πως έχει διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή, με την ένταση της χρωστικής να είναι πιο έντονη σε περιπτώσεις κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού ή εκτείνουν κυτταροπλασματικές προεκβολές.

Κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών, φαίνεται πως υπάρχει μια αλλαγή στο πρότυπο κατανομής της κυτταροπλασματικής ακτίνης, με μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνικών μορίων να έχει εκτοπιστεί στην περιφέρεια του κυττάρου, κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Επίσης, φαίνεται σαφώς πως η διάταξη των ινιδίων της ακτίνης έχει διαφοροποιηθεί κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG, καθώς σχηματίζουν ευθείες, νηματοειδείς μακρομοριακές δομές, σε αντίθεση με το στικτό, διάχυτο πρότυπο των κυττάρων που βρίσκονται σε κανονικές συνθήκες. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι τα κύτταρα T24, τα οποία έχουν υποστεί την επίδραση του φαρμακευτικού παράγοντα, δεν παρουσιάζουν πολυάριθμες κυτταρικές προεκβολές, ούτε και αυξημένη πλαστικότητα στο χώρο.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του 17-DMAG στην κυτταροπλασματική κατανομή της τουμπουλίνης (ολικής και α-τουμπουλίνης), ενός άλλου μέλους του δικτύου του κυτταρικού σκελετού. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 68, η ολική τουμπουλίνη, εμφανίζει ένα διάχυτο, στικτό πρότυπο κατανομής στο κυτταρόπλασμα, απουσιάζοντας από την περιοχή του πυρήνα (Εικόνα 68, επάνω αριστερά, πράσινο χρώμα). Κάτω από την επίδραση 1 μM του 17-DMAG, φαίνεται η αλλαγή του προτύπου ενδοκυτταρικού εντοπισμού της τουμπουλίνης, καθώς δημιουργούνται συγκεκριμένες περιοχές, νησίδες του κυτταροπλάσματος, που παρουσιάζουν συσσώρευση των πρωτεϊνικών μορίων του κυτταρικού σκελετού, ενώ καταδεικνύεται σαφώς η επαγωγή των επιπέδων της τουμπουλίνης, λόγω αύξησης της έντασης της χρώσης των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 68, κάτω αριστερά). Όμοια πειραματικά

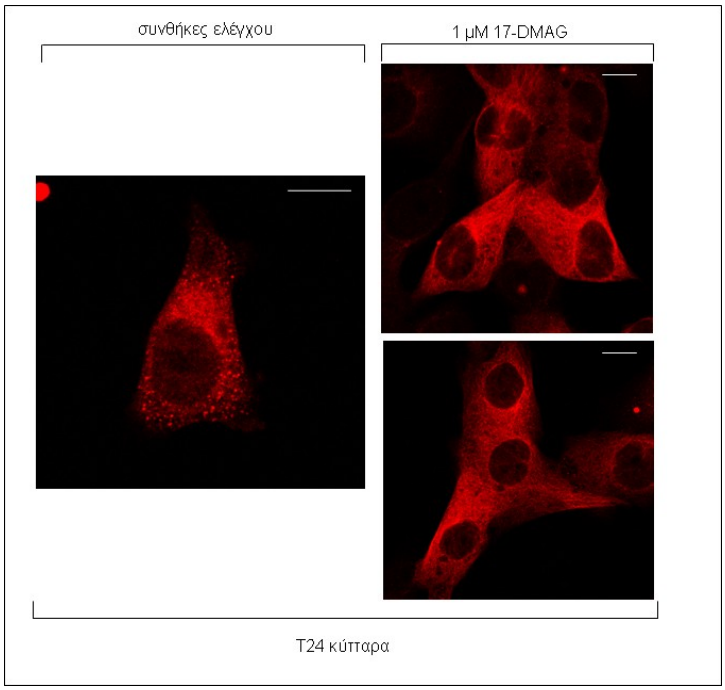
αποτελέσματα καταδεικνύει η μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της α-τουμπουλίνης (Εικόνα 68 δεξιά, κόκκινο χρώμα), η οποία σε κανονικές συνθήκες φαίνεται πως παρουσιάζει ένα διάχυτο, στικτό μοτίβο κυτταροπλασματικής κατανομής, το οποίο διαταράσσεται κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG. Όπως καταδεικνύεται σαφώς στην Εικόνα 68 (κάτω δεξιά), η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 λόγω επίδρασης 17-DMAG οδηγεί σε απορρύθμιση της ομοιόμορφης κυτταροπλασματικής κατανομής της α-τουμπουλίνης, καθώς εντοπίζονται επιμέρους υποκυτταρικές περιοχές, οι οποίες εμφανίζουν συσσώρευση πρωτεϊνικών μορίων, που φαίνεται να έχουν χάσει τη λειτουργικότητά τους.



Εικόνα 68: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στον κυτταρικό εντοπισμό, την μορφή και την κατανομή της ολικής και α-τουμπουλίνης του κυτταρικού σκελετού. Οι οπτικές τομές που παρουσιάζονται προέρχονται από παρατήρηση καρκινικών κυττάρων T24 σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 στο πολύπλοκο δίκτυο του κυτταρικού σκελετού, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης του 17-DMAG σε μόρια α- και β-τουμπουλίνης, τα οποία αποτελούν τα ενεργά επιμέρους συστατικά του

δικτύου των μικροσωληνίσκων του κυτταροπλάσματος. Σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρατίθενται πιο πάνω, ακολούθησε μελέτη του κυτταροπλασματικού εντοπισμού ενός επιπλέον μέλους της οικογένειας των τουμπουλινών και συγκεκριμένα ο υπότυπος III της β-τουμπουλίνης (βIII-tubulin) Όπως φαίνεται στην Εικόνα 69, η βIII-τουμπουλίνη, κάτω από κανονικές συνθήκες εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό, στικτό πρότυπο ομοιόμορφης κατανομής στο κυτταρόπλασμα (αριστερή στήλη), το οποίο προσδίδει χαρακτηριστική φαινοτυπική εικόνα στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης T24. Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 69 (δεξιά στήλη), η επίδραση 1 μM 17-DMAG οδηγεί σε πλήρη ανατροπή της ενδοκυτταρική τοπολογίας της βIII-τουμπουλίνης, με το μοτίβο κατανομής να αναδεικνύει την παραγωγή συμπυκνωμένων, μεγαλομοριακών ινών και νηματίων, που διατρέχουν ολόκληρο το μήκος και την επιφάνεια του κυτταροπλάσματος, δημιουργώντας ευθυγραμμισμένες, μακρομοριακές δομές, προσδίδοντας έναν χαρακτηριστικό «ινώδη» φαινότυπο.

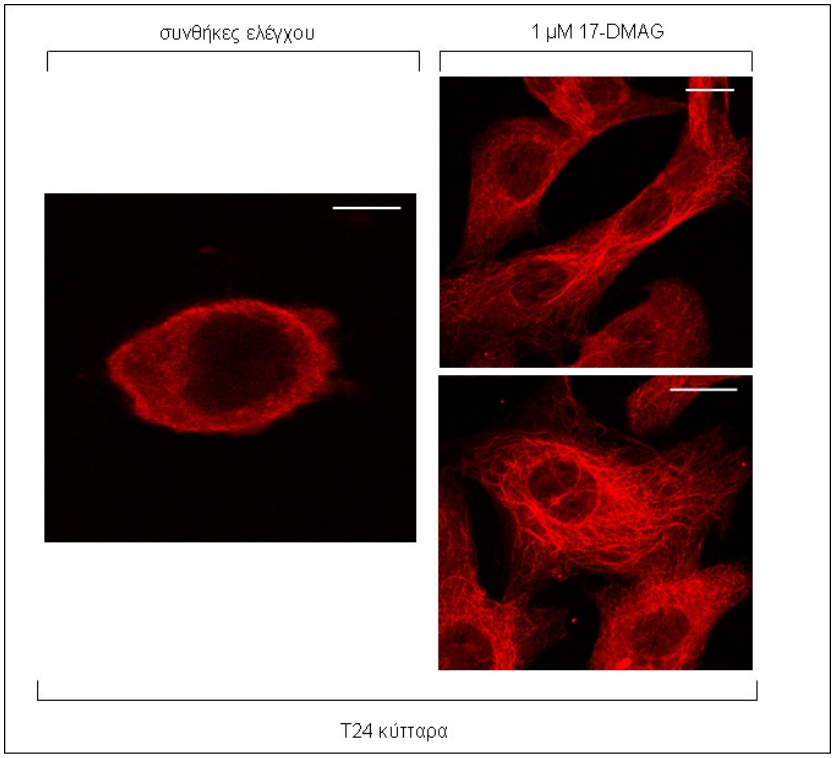


Εικόνα 69: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στον κυτταρικό εντοπισμό, την μορφή και την κατανομή της βIII-τουμπουλίνης του κυτταρικού σκελετού. Οι οπτικές τομές που παρουσιάζονται προέρχονται από παρατήρηση καρκινικών κυττάρων T24 σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

Η μεταβολή του προτύπου της ενδοκυτταρικής κατανομής μελών του κυτταροσκελετού, κάτω από την επίδραση ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, σε καρκινικά κύτταρα T24, οδήγησε στην μελέτη της επίδρασης του 17-DMAG στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των δομικών πρωτεϊνών του κυττάρου. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνικών μορίων, όπως είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, κ.λπ. [348, 349], καθοδηγούν τη λειτουργική δυναμική των πρωτεϊνικών μορίων του κυττάρου, ενορχηστρώνοντας τη σωστή αναδίπλωσή τους στο χώρο, τη στόχευση σε συγκεκριμένα υπο-κυτταρικά διαμερίσματα, την μεταγωγή σήματος και την ενεργοποίηση κατωρροϊκών στόχων [349-356]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 70 (αριστερή στήλη), πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της ολικής ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε κανονικές συνθήκες, η οποία ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο στικτής κατανομής σε ολόκληρο το εύρος του κυτταροπλάσματος των καρκινικών κυττάρων T24. Η ακετυλίωση της τουμπουλίνης, καθώς και η αντίθετη διαδικασία (απο-ακετυλίωση) καθοδηγούν, μεταξύ άλλων, το δυναμικό πολυμερισμό και αποπολυμερισμό των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων, ρυθμίζοντας τις επιμέρους κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του κυτταρικού σκελετού, όπως είναι η μίτωση, η ανάπτυξη προεκβολών (φυλλοπόδια), η κινητικότητα και η κυτταρική μετανάστευση, η κυτταροπλασματική μεταφορά πρωτεϊνικών μορίων, η μεταγωγή της κυτταρικής σηματοδότησης, κ.λπ. [310, 357-364].

Κάτω από την επίδραση 1 μM 17-DMAG, όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 70 (δεξιά στήλη), παρουσιάζεται ισχυρά διαφοροποιημένο πρότυπο κυτταροπλασματικής κατανομής της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης, σε σύγκριση με αυτό που παρατηρήθηκε κάτω από κανονικές συνθήκες. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα μόρια της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σχηματίζουν μακρομοριακές, ινώδεις και νηματοειδείς δομές, οι οποίες έχουν μεγάλο μήκος και διατρέχουν ολόκληρο το κύτταρο. Οι πολλαπλές, ευθυγραμμισμένες ίνες σταθεροποιημένης, ακετυλιωμένης τουμπουλίνης φανερώνουν ένα είδος μοριακού «παγώματος» του κυτταρικού σκελετού, καταλήγοντας σε ανάσχεση της δυναμικής μεταβολής του μεγέθους και της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων T24, καθώς και σε ενδεχόμενη καταστολή της κυτταροπλασματικής

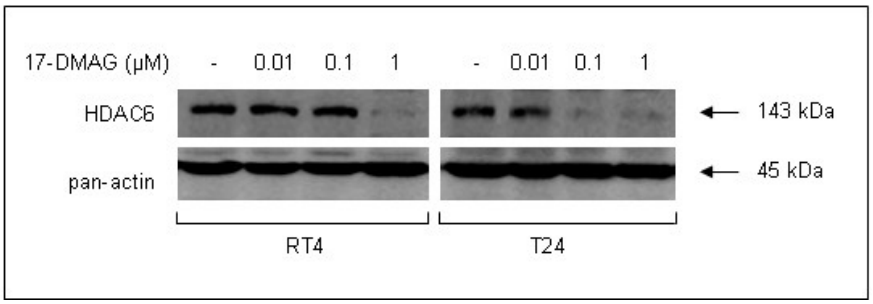
μεταφοράς, τόσο πρωτεϊνικών μορίων, όσο και σηματοδοτικών μηχανισμών, σε απόκριση κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του 17-DMAG.



Εικόνα 70: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στον κυτταρικό εντοπισμό, την μορφή και την κατανομή της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης του κυτταρικού σκελετού. Οι οπτικές τομές που παρουσιάζονται προέρχονται από παρατήρηση καρκινικών κυττάρων T24 σε συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser (bar: 10 μm).

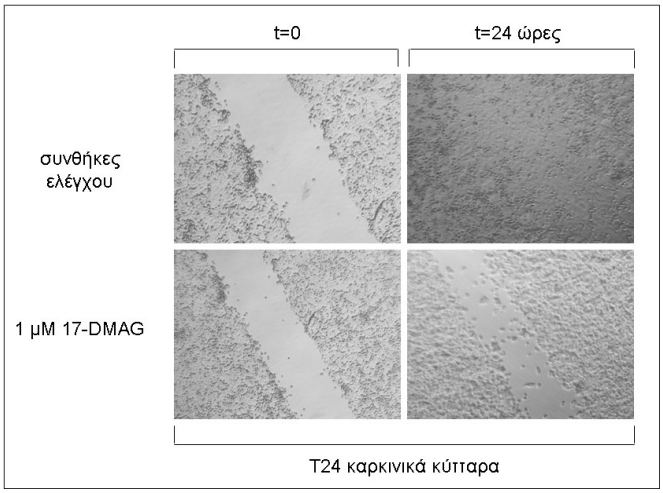
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο ρόλος της επίδρασης του 17-DMAG στην αναστολή της λειτουργικής «πλαστικότητας» του δικτύου του κυτταροσκελετού με την μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της αποακετυλάσης των ιστονών 6 (Histone deacetylase 6, HDAC6), η οποία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η αποακετυλάση HDAC6 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργικότητας του κυτταρικού σκελετού, καθώς η αφαίρεση ακετυλομάδων από μόρια τουμπουλίνης οδηγεί στο δυναμικό πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και κατ' επέκταση, ενορχηστρώνει την κυτταρική κινητικότητα [361, 365-375]. Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 71, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των

κυτταροπλασματικών επιπέδων της HDAC6 πρωτεΐνης, με τα κύτταρα T24 να επιδεικνύουν ισχυρότερο πρότυπο μείωσης, καθώς τα επίπεδα της HDAC6 εξαλείφονται από την ενδιάμεση συγκέντρωση του παράγοντα (0,1 μM 17-DMAG), συγκριτικά με αυτό των κυττάρων υψηλής διαφοροποίησης (RT4).



Εικόνα 71: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στα πρωτεϊνικά επίπεδα της αποακετυλάσης των ιστονών 6 (HDAC6), η οποία ενορχηστρώνει, μεταξύ άλλων, την αφαίρεση ακετυλομάδων από τα μόρια τουμπουλίνης του κυτταρικού σκελετού.

Σε συνέχεια των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, επιχειρήθηκε η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης με τη βοήθεια της δοκιμασίας επούλωσης ανοιχτής «πληγής». Όπως καταδεικνύεται στην Εικόνα 72, τα καρκινικά κύτταρα T24 (υψηλής κακοήθειας) επιδεικνύουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και ισχυρή κινητικότητα, με αποτέλεσμα να καταφέρνουν να «επουλώσουν» την ασυνέχεια στην *in vitro* καλλιέργειά τους, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 72, επάνω δεξιά). Κάτω από την επίδραση της υψηλότερης συγκέντρωσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG (1 μM), τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας οδηγούνται σε ισχυρή ανάσχεση της κινητικότητας, με αποτέλεσμα η ασυνέχεια στο μονοκυτταρικό ταπήτιο να μη «γεμίζει», αναδεικνύοντας φαινοτυπικά το μοριακό «πάγωμα» του δικτύου των μικροσωληνίσκων και την ισχυρή ανασταλτική επίδραση της ημισυνθετικής ανσαμυκίνης 17-DMAG στην κυτταρική κίνηση και το μιτωτικό δυναμικό καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.



Εικόνα 72: Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 17-DMAG στην κινητικότητα T24 καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Καταδεικνύεται ξεκάθαρα η μείωση του μεταναστευτικού δυναμικού των κυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να «κλείνουν» («επουλώνουν») την ασυνέχεια του κυτταρικού μονοταπητίου κάτω από συνθήκες ελέγχου, σε διάστημα 24 ωρών (επάνω δεξιά εικόνα), ενώ κάτω, απεικονίζεται η απώλεια της δυνατότητας των T24 κυττάρων να «γεμίσουν» το κενό, υπό την επίδραση 1 μM 17-DMAG για χρονικό διάστημα 24 ωρών (κάτω δεξιά εικόνα).

Όπως καταδεικνύουν τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, η φαρμακο-επαγόμενη ανάσχεση της Hsp90 λειτουργικότητας, λόγω χορήγησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17-DMAG, οδηγεί σε αναστολή όλων των επιμέρους φαινοτυπικών παραμέτρων της νεοπλασματικής εξαλλαγής των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, οδηγώντας σε ανάσχεση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, αναστολή του μιτωτικού δυναμικού, επαγωγή μονοπατιών κυτταρικού θανάτου και αναστολή της λειτουργικότητας του δικτύου του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής κινητικότητας, που ενδεχομένως συσχετίζεται άρρηκτα με το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων του ανθρώπινου καρκινικού ουροθηλίου. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης στη σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση έναντι του καρκίνου τη ουροδόχου κύστης, καθώς τα αρχικά στοιχεία που παρουσιάζονται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής αντανακλούν τον αντι-νεοπλασματικό χαρακτήρα του 17-DMAG, το οποίο οδηγεί σε ανάσχεση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν τον καρκινικό φαινότυπο.

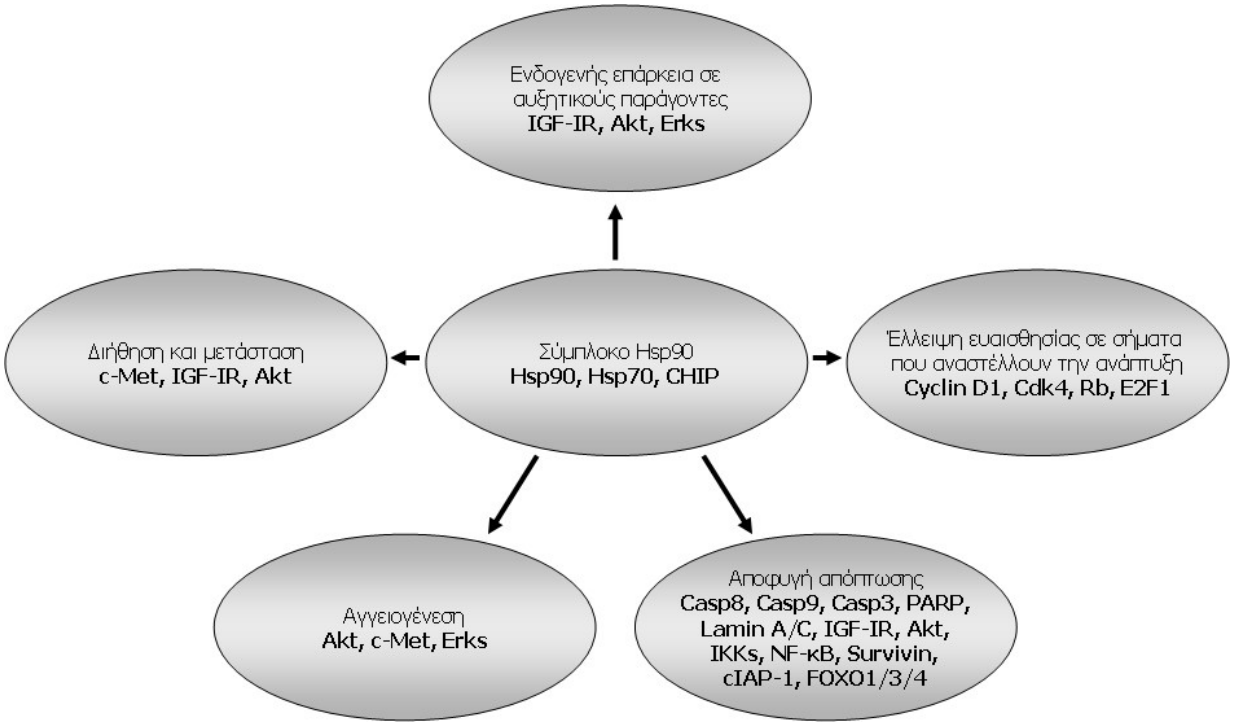
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. Συζήτηση

Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης ακολουθούν συνεχώς ανοδική πορεία, με αποτέλεσμα η νόσος να εξελίσσεται σε σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας στις ανεπτυγμένες κοινωνίες δυτικού τύπου, καθώς το σύνολο των σχετικών ασθενών υπολογίζεται σε πάνω από δύο (2) εκατομμύρια παγκοσμίως [10]. Τα περιστατικά διάγνωσης κακοηθειών του ουροθηλίου μόνο για τις Ηνωμένες Πολιτείες ξεπέρασαν τις 70000 για το έτος 2010, ενώ καταγράφηκαν πάνω από 15000 θάνατοι, οι οποίοι οφείλονται σε νεοπλασίες της κύστης [13]. Οι αντίστοιχοι αριθμοί που αφορούν στο Ηνωμένο Βασίλειο ξεπερνούν τα 10000 καινούρια περιστατικά ετησίως, με τον αριθμό καταγεγραμμένων θανάτων να φτάνει τις 5000 [12]. Ο αριθμός των ασθενών στους οποίους διαγιγνώσκονται νεοπλασίες της ουροδόχου κύστης ξεπερνά τις 300000 ετησίως, σε παγκόσμια κλίμακα [11]. Η υψηλή ετερογένεια του καρκίνου της ουροδόχου κύστης καθώς και το υψηλό ποσοστό επανεμφάνισης διεισδυτικής νόσου σε χρονικό ορίζοντα πενταετίας [8, 32, 85, 87], καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η καρκινική εξαλλαγή αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία πολλών βημάτων, η οποία προκύπτει μέσα από τη συσσώρευση διαδοχικών μεταλλαγών στο γενετικό υλικό των κυττάρων [171-175]. Οι μεταλλαγές αυτές αφορούν σε πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία προωθούν την ογκογένεση, έχουν δε σχέση με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την αποσιώπηση γενετικών τόπων που δρουν ογκοκατασταλτικά, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της κινητικότητας των κυττάρων, κ.λπ. [174, 175, 178]. Σύμφωνα με το ευρέως αποδεκτό μοντέλο των Hanahan και Weinberg [273, 274], τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της καρκινικής εξαλλαγής (φαινοτυπικά «ορόσημα», hallmark traits) αφορούν σε έξι (6) βιολογικές δράσεις των κυττάρων, οι οποίες μεταλλάσσονται κατά την πρόοδο της ογκογένεσης. Τα ορόσημα του καρκινικού φαινοτύπου συναποτελούν την οργανωτική αρχή στην οποία στηρίζεται η λειτουργική ανάπτυξη, αλλά και η πολυπλοκότητα της

νεοπλασματικής ασθένειας. Τα ορόσημα της καρκινικής εξαλλαγής περιλαμβάνουν την ενδογενή επάρκεια σε σήματα αύξησης, την έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα αναστολής της αύξησης, την αποφυγή των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, την πολλαπλασιαστική αθανατοποίηση, την ενίσχυση της αγγειογένεσης και την ανάπτυξη μηχανισμών διήθησης και μετάστασης. Η κινητήρια δύναμη που προωθεί τις επιμέρους παραμέτρους της κακοήθειας είναι η αυξανόμενη γενετική αστάθεια των κυττάρων που έχουν εισέλθει στην διαδικασία της καρκινογένεσης [273, 274].



Εικόνα 73: Επίδραση της αναστολής της Hsp90 σε όλες τις παραμέτρους «ορόσημα» της καρκινικής εξαλλαγής. Είναι σαφής η επίδραση των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, η οποία οδηγεί σε ανάσχεση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην προώθηση της ογκογένεσης.

Η Hsp90 είναι μια μοριακή συνοδός που βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων υπό κανονικές συνθήκες, ενώ υπερεκφράζεται κάτω από συνθήκες περιβαλλοντικού στρες [182, 268]. Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ο σημαντικός ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην καρκινογένεση, καθώς αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του μοριακού μηχανισμού που επιτρέπει στα κύτταρα να διαφύγουν των

φυσιολογικών λειτουργιών τους [208, 276, 291, 376]. Η Hsp90 κατέχει ρόλο-«κλειδί» σε πολλαπλά ογκογονικά μονοπάτια και αποτελεί σταθερό σημείο αναφοράς στη διατήρηση της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών-«πελατών» της, στο συνεχώς μεταβαλλόμενο κυτταροπλασματικό περιβάλλον που δημιουργεί το ασταθές γενετικό προφίλ των νεοπλασματικών κυττάρων [268, 271]. Η συμμετοχή της μοριακής συνοδού Hsp90 στην ωρίμανση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών-«πελατών» της, καθώς και το μεγάλο εύρος των ογκογονιδίων τα οποία στηρίζουν τη δομική και λειτουργική ακεραιότητά τους στη συγκεκριμένη μοριακή συνοδό, αναδεικνύουν τον ενδεχόμενα σημαντικό ρόλο των αναστολέων της Hsp90 στη σύγχρονη χημειοθεραπεία [192, 377, 378]. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, εξετάστηκε ενδελεχώς η επίδραση μιας ομάδας φαρμακευτικών ενώσεων, των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, μέλη της οποίας αποτελούν η τζελνταναμυκίνη (GA), το 17-AAG και το 17-DMAG, σε καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας και γενετικού υποβάθρου (π.χ. στον *p53* γενετικό τόπο). Όπως καταδεικνύεται στο πλαίσιο των πειραματικών δοκιμασιών που παρατίθενται εδώ, η επαγόμενη απο ανσαμυκίνη αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε ανάσχεση πολλαπλών σηματοδοτικών μηχανισμών που έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης RT4, RT112, T24 και TCCSUP, αποδεικνύοντας την παράλληλη καταστολή όλων των επιμέρους φαινοτύπων-«οροσήμων» της καρκινικής εξαλλαγής.

Μια απο τις κυριότερες βιολογικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων είναι η ύπαρξη απορρυθμισμένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού [274]. Η ανεξέλεγκτη αύξηση των κυττάρων και το υψηλό μιτωτικό δυναμικό αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά των φαινοτυπικών γνωρισμάτων-«οροσήμων» της καρκινικής εξαλλαγής, τα οποία προωθούν την ογκογένεση [273, 274]. Στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής αυτής, παρατηρήθηκε ισχυρή ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Κυρίαρχο χαρακτηριστικό της

κυτταροστατικής επίδρασης των ανσαμυκινών αποτελεί η ανάσχεση του κύκλου στο σημείο ελέγχου της μετάβασης από τη G1 στη φάση S (αναστολή G1/S), ενώ η καταστολή σε άλλα σημεία του κύκλου (G2/M και S) προκύπτει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον βαθμό κακοήθειας. Ειδικότερα, το γενικευμένο μοτίβο της αναστολής G1/S του κυτταρικού κύκλου που παρατηρείται κάτω από την επίδραση τόσο της τζελνταναμυκίνης, όσο και του αναλόγου 17-AAG (ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας των υπό μελέτη κυττάρων), ανατρέπεται από την κυτταροστατική δράση του 17-DMAG, το οποίο εμφανίζει ισχυρή ανάσχεση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας στο σημείο ελέγχου G2/M. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανότατα οφείλεται σε ιδιαιτερότητες του πρωτεώματος των συγκεκριμένων κυττάρων, με αποτέλεσμα τη διαφορική επίδραση του κυτταρικού περιεχομένου στον κυτταροστατικό μηχανισμό δράσης της ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης 17-DMAG [379].

Προκειμένου να διευκρινιστούν τα αίτια της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων στα οποία κωδικοποιούνται πρωτεϊνικά μόρια που διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ομαλή μετάβαση των κυττάρων στις επιμέρους φάσεις του πολλαπλασιασμού. Συνολικά, τα αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ καταδεικνύουν πως σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, πραγματοποιείται μειορύθμιση σημαντικών μορίων-«κλειδιών», τα οποία ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως είναι η κινάση Cdk4, η κυκλίνη D1, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb και ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1. Η δοσο-εξαρτώμενη αναστολή των επιπέδων των επιμέρους πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στα σύμπλοκα κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών ενορχηστρώνει κυρίως την αναστολή της μετάβασης των κυττάρων από τη G1 στην φάση S του κύκλου, αλλά και από τη G2 στη φάση M, στην περίπτωση καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας, κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του υδατοδιαλυτού παράγοντα 17-DMAG. Η φαρμακο-επαγόμενη μειορύθμιση των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων οδηγεί σε αναπόφευκτη συσσώρευση κυττάρων στις φάσεις G1 και G2, με επακόλουθη ανάσχεση του μιτωτικού

δυναμικού και τελικά του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η συστατική φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, τα επίπεδα της οποίας φαίνεται να ακολουθούν βαθμο-ειδικό (grade-dependent) μοτίβο, καθώς οι κυτταρικές σειρές αυξημένης κακοήθειας εμφανίζουν επίπεδα βασικής ενεργοποίησης της pRb, με μοναδική εξαίρεση τα κύτταρα TCCSUP, τα οποία δεν παρουσιάζουν συστατικά επίπεδα ενεργοποίησης pRb. Η διαφοροποίηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb ανά κυτταρικό τύπο και βαθμό κακοήθειας θα μπορούσε να αποδειχθεί σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση και σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης, σε συνδυασμό με άλλα μόρια που επίσης, επιδεικνύουν βαθμο-ειδικό πρότυπο έκφρασης [296]. Η δημιουργία ενός πάνελ πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία συνδέονται άμεσα με τον βαθμό κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο με σημαντική κλινική αξία για την πρόγνωση και την επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης της ασθένειας [380]. Οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης έχει δειχθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου σε όλα τα επιμέρους σημεία ελέγχου, ανάλογα με το κυτταρικό πλαίσιο και τον βαθμό κακοήθειας των εκάστοτε υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων [379]. Για παράδειγμα, σε καρκινικά κύτταρα κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα προκαλείται αναστολή του κυτταρικού κύκλου τόσο στο σημείο ελέγχου G1/S, όσο και στο σημείο μετάβασης G2/M [381], ενώ σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2 έχει δειχθεί ότι χορήγηση του 17-AAG προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S [240]. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής καταδεικνύεται σαφώς ο ισχυρά κυτταροστατικός χαρακτήρας των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης έναντι καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης διαφορετικής κακοήθειας και η αποδοτική καταστολή μιας σημαντικής παραμέτρου-«οροσήμου» της καρκινικής εξαλλαγής (Εικόνα 73).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης της συγκεκριμένης ομάδας αντιβιοτικών, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

ουροδόχου κύστης, ώστε να αναδειχθεί ο πιθανός αντι-νεοπλασματικός χαρακτήρας των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων. Σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας με παράλληλη ενεργοποίηση μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκίνης. Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και ο επακόλουθος κατακερματισμός των δομικών στοιχείων του πυρήνα, που οδηγεί στην ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου φαίνεται πως επέρχεται με τρόπο τόσο δοσο-εξαρτώμενο, όσο και ειδικό για τον εκάστοτε τύπο κυττάρου [296]. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αποτελεί η ενεργοποίηση και των δύο (2) μονοπατιών αποπτωτικού θανάτου, τόσο του ενδογενούς, μιτοχονδριακού (ενεργοποίηση κασπάσης-9), όσο και αυτό των υποδοχέων θανάτου (ενεργοποίηση κασπάσης-8). Πρέπει να σημειωθεί πως η ενεργοποίηση των μονοπατιών αποπτωτικού θανάτου παρουσιάζει πρότυπο δοσο-εξαρτώμενο και κυτταρο-ειδικό, με τα RT112 κύτταρα να εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα πρωτεολυτικής επαγωγής της απόπτωσης για όλες τις ανσαμυκίνες που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν τα αποτελέσματα που έδωσαν οι δοκιμασίες κυτταρικής επιβίωσης, σύμφωνα με τις οποίες οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά επιβίωσης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν [296]. Από την άλλη, τα επίπεδα ενεργοποίησης της εκτελεστικής κασπάσης-3 βρέθηκαν να διαφέρουν ανά κυτταρικό τύπο, γεγονός που φανερώνει είτε την πρωτεολυτική ενεργοποίηση άλλων εκτελεστικών κασπασών (κασπάση-6 ή -7) ή την ανάπτυξη εναλλακτικών μονοπατιών προγραμματισμένου θανάτου, όπως είναι η αυτοφαγία [382, 383]. Όπως αποδεικνύεται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, η μείωση της επιβίωσης καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης οφείλεται σε συνδυαστική ενεργοποίηση μονοπατιών προγραμματισμένου θανάτου, καθώς κάτω από την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων των χημειοθεραπευτικών παραγόντων, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη αυτοφαγικού θανάτου με ενεργοποίηση λυσοσωμικών ενζύμων για τον κατακερματισμό μελών του κυτταροπλασματικού πρωτεώματος. Η

επαγωγή αποπτωτικού θανάτου λόγω επίδρασης ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης σε καρκινικά κύτταρα έχει επίσης παρατηρηθεί σε καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος [384] και καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου [289]. Με βάση τα δεδομένα που καταδεικνύονται στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της μοριακής συνοδού Hsp90 οδηγεί σε θάνατο των καρκινικών σειρών της ουροδόχου κύστης [296], περιορίζοντας έντονα την ενδογενή δυνατότητα των νεοπλασματικών κυττάρων για αποφυγή των σηματοδοτικών μηχανισμών που επάγουν μονοπάτια προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αναστέλλοντας μια σημαντική παράμετρο-«ορόσημο» της καρκινικής εξαλλαγής που αφορά στην προώθηση της επιβίωσης (Εικόνα 73).

Τα ολικά επίπεδα έκφρασης της Hsp90 αυξάνονται κατά την καρκινική εξαλλαγή, γεγονός που συνδέεται με τον «εθισμό» ("addiction") καρκινικών κυττάρων σε προϊόντα ογκογονιδίων (τα οποία αποτελούν πρωτεΐνες-«πελάτες» της μοριακής συνοδού) και σε σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία αυτά συμμετέχουν. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, η συστατική έκφραση της Hsp90 ξεπερνά σε απόλυτο ποσοστό το 90% των δειγμάτων, με σημαντικές διαφοροποιήσεις ανά βαθμό κακοήθειας. Δείγματα όγκων που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό κακοήθειας και διήθηση των παρακείμενων ιστών εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα Hsp90 σε σχέση με επιφανειακούς, μη διεισδυτικούς όγκους του ουροθηλίου [385]. Παρόλα αυτά, ένα 10% των δειγμάτων εμφανίζει χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης Hsp90 συγκριτικά με το φυσιολογικό ουροθήλιο και το συγκεκριμένο φαινόμενο φαίνεται πως συνδέεται με ανάπτυξη μεταστάσεων και κακή πρόγνωση για τον ασθενή [386, 387]. Εκτός από τα ολικά επίπεδα έκφρασης της Hsp90, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η δομική ακεραιότητα και η στερεοδομή της μοριακής συνοδού. Σχετικά πρόσφατα αποδείχτηκε πως πρωτεϊνικά μόρια Hsp90 που έχουν απομονωθεί από νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης με χημικά ανάλογα των ανσαμυκινών βενζοκινόνης, σε σχέση με μόρια της πρωτεΐνης που έχουν απομονωθεί από φυσιολογικούς ιστούς [284]. Σε αυτή την περίπτωση, μόρια Hsp90 τα οποία βρίσκονται σε λειτουργικά σύμπλοκα με τους ογκογονικούς-«πελάτες» τους είναι πιο ευαίσθητα στην

ανασταλτική δράση των ανσαμυκινών βενζοκινόνης, σε σχέση με τις κατά κύριο λόγο, «ελεύθερες», μη συμπλοκοποιημένες μορφές της μοριακής συνοδού, που προέρχονται από φυσιολογικούς ιστούς [276]. Επί της ουσίας, φαίνεται πως η στερεοδομή της Hsp90 που προέρχεται από κακοήθη κύτταρα ρυθμίζει την εξειδίκευση της διαδικασίας σύνδεσης με τον αναστολέα, γεγονός το οποίο συνηγορεί υπέρ ενός ενδεχόμενα σημαντικού ρόλου των ανσαμυκινών βενζοκινόνης στα πλαίσια της σύγχρονης και στοχευμένης χημειοθεραπείας του καρκίνου [159, 182, 187, 276, 284].

Στο πλαίσιο των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη διατριβή, η χορήγηση της συγκεκριμένης κατηγορίας αντιβιοτικών για διάστημα 24 ωρών οδήγησε σε μειορύθμιση και αναστολή της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας της Hsp90 σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που μελετήθηκαν. Η δοσο-εξαρτώμενη αναστολή βρέθηκε να εμφανίζει κυτταρο-ειδικό μοτίβο, ενώ ταυτόχρονα αποδείχτηκε πως το πρότυπο της μειορύθμισης είναι στενά συνυφασμένο με το βαθμό κακοήθειας της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας (RT4 και RT112) παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην ερευνητική βιβλιογραφία η παραγωγή μιας επιπλέον πρωτεϊνικής ζώνης (~65 kDa), που αντιστοιχεί σε θραύσμα, προϊόν πρωτεόλυσης της ώριμης Hsp90, ενώ από την άλλη, τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας (T24 και TCCSUP) εμφανίζουν ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης, χωρίς την παραγωγή επιπλέον ζώνης [296]. Με βάση στοιχεία της ερευνητικής βιβλιογραφίας, καθώς και με ερευνητικές εργασίες που έχουν δημοσιευτεί από τις ερευνητικές ομάδες των εργαστηρίων μας [195, 388, 389], η δημιουργία του κατακερματισμένου θραύσματος της Hsp90 ενδεχομένως οφείλεται στην πρωτεολυτική επεξεργασία του από το γρανουλοένζυμο Β (granzyme B) [388, 389]. Με τη βοήθεια του μαθηματικού αλγόριθμου GrabCas, ανιχνεύτηκε μια ειδική αμινοξική αλληλουχία αναγνώρισης για το granzyme B, τόσο στην πεπτιδική αλυσίδα της ισομορφής Hsp90α, όσο και για την ισομορφή Hsp90β. Από την άλλη, δεν εντοπίστηκε καμιά θέση αναγνώρισης για άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως οι κασπάσες, που να αποδίδει πιθανό πρωτεϊνικό θραύσμα ίσου μοριακού βάρους (~65 kDa) με αυτό που παράγεται κάτω από την επίδραση

αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Αναστολή της μοριακής συνοδού Hsp90, συνοδευόμενη από επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70 και 27 (Hsp70 και Hsp27), σε απόκριση ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου [390], προστάτη [391] και τραχήλου της μήτρας [391].

Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο αν η ανάπτυξη πρωτεολυτικού θραύσματος της Hsp90 συνδέεται γενικά με το βαθμό εξαλλαγής των κυττάρων. Όπως καταδεικνύουν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, οι κυτταρικές σειρές χαμηλού βαθμού κακοήθειας εμφανίζουν πρωτεολυμένη Hsp90. Πρέπει να σημειωθεί ο πιθανός ρόλος του *p53* γενετικού υποβάθρου των κυττάρων, καθώς οι σειρές που εμφάνισαν την ανάπτυξη του πρωτεολυτικού θραύσματος των ~65kDa (RT4 και RT112) φέρουν p53 φυσικού τύπου (wt p53), ενώ τα πλέον κακοήθη καρκινικά κύτταρα T24 και TCCSUP, τα οποία δεν ανέπτυξαν κατακερματισμό της μοριακής συνοδού, φέρουν μεταλλαγμένη p53 (mut p53). Η ανάπτυξη πρωτεολυτικού θραύσματος της Hsp90 στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης χαμηλής (RT4) ή ενδιάμεσης (RT112) κακοήθειας, ενδεχομένως να συνεισφέρει περαιτέρω στο δομικό ακρωτηριασμό της μοριακής συνοδού από τα μέλη της συγκεκριμένης κατηγορίας χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Είναι πιθανό η κυτταροπλασματική συσσώρευση των εν λόγω θραυσμάτων να λειτουργεί ως κυρίαρχος αρνητικός παράγοντας (dominant negative component), ο οποίος οδηγεί στην επιπλέον ανάσχεση της ομαλής λειτουργικότητας της Hsp90 ως μοριακής συνοδού [296]. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί πως το πρότυπο της αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκίνης είναι αποτέλεσμα τροποποιήσεων που πραγματοποιούνται σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, καθώς ανάλυση της έκφρασης των γενετικών τόπων *Hsp90α* και *Hsp90β* κατέδειξε πως δεν επηρεάζεται η μεταγραφική ενεργότητα των δύο (2) γονιδίων. Είναι πιθανόν, οι μεταβολές των επιπέδων της κυτταροπλασματικής Hsp90 να οφείλονται σε ενεργοποίηση πολλαπλών, εναλλακτικών μονοπατιών πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, όπως αυτό της

πρωτεοσωμικής διάσπασης μέσω ουβικουϊτίνωσης, της αυτοφαγίας και σύντηξης με λυσοσώματα [308, 338, 340, 392]. Πρέπει να σημειωθεί ότι πρωτεόλυση της Hsp90 έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα ως απόκριση σε παράγοντες που επάγουν οξειδωτικό στρες [393], σε φαρμακευτικά προϊόντα που περιέχουν αρσενικό (arsenic-based compounds) [394], αλλά και σε άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως δοξορουβικίνη (doxorubicin) και σισπλατίνη (cisplatin) [388, 389]. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσε να εξηγηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, η λειτουργική καταστολή της Hsp90, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα της ώριμης πρωτεΐνης αυξάνονται σε απόκριση υψηλών συγκεντρώσεων ανσαμυκινών. Επίσης, είναι πιθανόν η έντονη πρωτεολυτική επεξεργασία της Hsp90 να έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω επαγωγή των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης, στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Η λειτουργική ανάσχεση που προκαλείται από την ανάπτυξη του πρωτεϊνικού θραύσματος ~65 kDa στην μοριακή συνοδό φαίνεται πως καθιστά αδύνατη την στήριξη της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας πλειάδας πρωτεϊνών-«πελατών» της (IGF-IR, Akt, IKKs, κ.λπ.), φαινόμενο που παρατηρήθηκε επίσης, στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής (βλέπε παρακάτω).

Η ανάπτυξη του ιδιαίτερου προτύπου μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 αποτελεί ένα ιδιαίτερο στοιχείο της απόκρισης των καρκινικών κυττάρων υψηλής διαφοροποίησης σε ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης. Ωστόσο, η μοριακή συνοδός δεν είναι η μοναδική πρωτεΐνη που εμφανίζει το συγκεκριμένο μοτίβο διαφοροποίησης, καθώς κάποιες πρωτεΐνες-«πελάτες» της Hsp90 ακολουθούν το πρότυπο αρχικής μείωσης, και κατόπιν αύξησης της έκφρασής τους, όπως η α-τουμπουλίνη, οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO και η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση Cdk4, ενώ το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται μέχρι και για πρωτεϊνικά μόρια που δεν αποτελούν *bona fide* «πελάτες» της μοριακής συνοδού, όπως είναι οι MAP κινάσες p44/42 (Erk1/2). Πρέπει να σημειωθεί πως το ιδιαίτερο πρότυπο της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων βενζοκινονών ανσαμυκίνης δεν είναι καθολικό, καθώς πολλοί «πελάτες» της Hsp90 όπως είναι οι υποδοχείς IGF-IR και c-Met, η κινάση Akt, οι κινάσες

IKKα/β, η λιγάση ουβικουϊτίνης CHIP και η αποακετυλάση των ιστονών HDAC6, επιδεικνύουν ένα πρότυπο ομαλής, δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης των πρωτεϊνικών τους επιπέδων. Η διαφορική μειορύθμιση των επιμέρους επιπέδων έκφρασης των μελών του κυτταρικού πρωτεώματος αναδεικνύει πολλαπλά επίπεδα ελέγχου της πρωτεολυτικής διαδικασίας, η οποία πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη περισσότερων του ενός μονοπατιού αποικοδόμησης, όπως ο κατακερματισμός πρωτεϊνών μέσω πρωτεασώματος, με την προσθήκη μορίων ουβικουϊτίνης από ειδικές λιγάσες, καθώς και η μεταφορά πρωτεϊνικών μορίων στα λυσοσώματα και η αποικοδόμησή τους από ειδικά λυσοσωμικά ένζυμα [308, 309, 339, 340, 392].

Σημαντικό πειραματικό εύρημα της συγκεκριμένης διατριβής αποτελεί και η ταυτόχρονη, αντισταθμιστική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp70, σε απόκριση της αναστολής της Hsp90, που επάγεται από αντιβιοτικά ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, πιθανότατα με αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του παράγοντα. Στα αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, φαίνεται λοιπόν σαφώς η αντιρροπιστική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp70 κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, καθώς και η ανάπτυξη ενός πρωτεολυτικού θραύσματος μοριακού βάρους ~65 kDa, με δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο, στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Όμοια με την Hsp90, χρησιμοποιήθηκε ο υπολογιστικός αλγόριθμος GrabCas για να εντοπιστούν πιθανές αμινοξικές αλληλουχίες κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλυσίδας της Hsp70 που να αναγνωρίζονται από πρωτεολυτικά ένζυμα. Πράγματι, εντοπίστηκε ένα αμινοξικό μοτίβο το οποίο αναγνωρίζεται από το granzyme B και δικαιολογεί την δημιουργία πρωτεϊνικού προϊόντος με μοριακό βάρος όμοιο του αναμενόμενου, ενώ και σε αυτή την περίπτωση δεν αποκαλύφθηκε μοτίβο αναγνώρισης από άλλες σχετικές πρωτεάσες [296].

Στη συνέχεια των πειραμάτων, μελετήθηκε το πρωτεϊνικό μόριο CHIP, μια Ε3 λιγάση ουβικουϊτίνης της Hsp90, προκειμένου να συνδεθούν τα επίπεδα έκφρασής της με την ανάπτυξη του ενδιαφέροντος μοτίβου αυξομείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90, της α-τουμπουλίνης, των κινασών Erk1/2

κ.λπ., κάτω από την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Όπως αποδεικνύεται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της λιγάσης CHIP παρουσιάζουν δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών, με αποτέλεσμα να μην φαίνεται αρχικά, να υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην ενεργοποίηση της αποικοδόμησης μέσω πρωτεασώματος από το CHIP και την αυξομείωση των επιπέδων τόσο της Hsp90, όσο και των επιλεγμένων πρωτεϊνών-«πελατών» της. Το γεγονός αυτό υπονοεί είτε ενδεχόμενη ανάμειξη άλλων λιγασών ουβικουϊτίνης στην απόκριση που παρατηρείται, είτε ύπαρξη ενός «κατωφλιού» κρίσιμης συγκέντρωσης της κυτταροπλασματικής λιγάσης CHIP, που αν και παρουσιάζει ελαττωμένα επίπεδα, παραμένει λειτουργική ως προς τις πρωτεΐνες-«πελάτες» αλλά όχι ως προς την ίδια την μοριακή συνοδό [395, 396].

Όπως παρουσιάζεται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκε μελέτη της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 σε μια πλειάδα πρωτεϊνικών-«πελατών» της μοριακής συνοδού, οι οποίοι συμμετέχουν στο πολύπλοκο δίκτυο ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, προάγοντας τις φαινοτυπικές παραμέτρους-«ορόσημα» της καρκινικής εξαλλαγής. Η εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης οδήγησε σε κυτταρο-ειδικό πρότυπο μειορύθμισης διαφόρων πρωτεϊνών-μελών του άξονα της σηματοδότησης Akt, συνεισφέροντας στην αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης, της κινητικότητας και του μιτωτικού δυναμικού. Η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών βενζοκινόνης οδήγησε στην μειορύθμιση των επιμέρους μελών της σηματοδότησης IFG-IR/Akt, με συνέπεια την καταστολή της μεταγωγής σήματος από την μεμβράνη προς τον πυρήνα. Η δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση του υποδοχέα του IGF-I, της κινάσης Akt, καθώς και των κατωρροϊκών πρωτεϊνικών κινασών IKKα και IKKβ παρατηρήθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, ανεξάρτητα από το βαθμό κακοήθειας [296].

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί η ύπαρξη κυτταρο-ειδικού προτύπου βασικής ενεργότητας του άξονα σηματοδότησης IGF-IR/Akt/IKK

στις καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης, με τα κύτταρα υψηλής κακοήθειας να εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα φωσφορυλίωσης των επιμέρους πρωτεϊνικών μορίων, σε αντίθεση με τα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, τα οποία δεν εμφάνισαν σημαντικά επίπεδα συστατικής ενεργότητας. Η συνεισφορά της σηματοδότησης Akt στην ανάπτυξη του εξαλλαγμένου φαινοτύπου φαίνεται πως συνδέεται με τα επίπεδα βασικής ενεργότητας του μονοπατιού, η ρύθμιση του οποίου πιθανόν πραγματοποιείται με αυτοκρινή τρόπο. Η έλλειψη φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνικών μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι IGF-IR/Akt/IKKs στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 υποδηλώνει ότι ο άξονας σηματοδότησης αυτός είναι ανενεργός κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Από την άλλη, τα κύτταρα T24 και TCCSUP παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα συστατικής ενεργότητας του εν λόγω μονοπατιού μεταγωγής σήματος, ενώ τα ενδιάμεσης κακοήθειας κύτταρα RT112 φαίνεται να εμφανίζουν ενδιάμεσο πρότυπο φωσφορυλίωσης, με τα επιμέρους μόρια να χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα συστατικής ενεργότητας. Το σημαντικό αυτό εύρημα, το οποίο παρουσιάζεται για πρώτη φορά στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας, καταδεικνύει το κυτταρο-ειδικό μοτίβο συστατικής ενεργότητας του συγκεκριμένου άξονα σηματοδότησης. Πρόκειται για έναν φαινότυπο που οπωσδήποτε συνδέεται άμεσα με το γενετικό υπόβαθρο και το ευρύτερο κυτταρικό περιεχόμενο του καρκινικού ουροθηλίου. Στα πειράματα διερεύνησης του ενδεχόμενου ενεργοποίησης του μονοπατιού στα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας (RT4 και RT112), αποδείχθηκε σαφώς ότι μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα με IGF-I, πραγματοποιείται κατωρροϊκή σηματοδότηση προς την κινάση Akt, αναδεικνύοντας την ενδογενή δυνατότητα μεταγωγής σήματος στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, καταρρίπτοντας το σενάριο της ύπαρξης μεταλλαγών που αφορούν στη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στο συγκεκριμένο μονοπάτι.

Συνέπεια της αναστολής της σηματοδότησης Akt αποτελεί η ανάσχεση της μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα NF-κB λόγω εγκλωβισμού και επιλεγμένης διαμερισματοποίησής του στην κυτταροπλασματική περιοχή, όπως καταδεικνύεται τόσο άμεσα, από πειράματα ανοσοκυτταροχημείας, όσο

και έμμεσα από πειράματα ανίχνευσης της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης διάφορων γονιδίων-«στόχων» του, όπως των *cIAP1*, *cIAP2* και *Survivin*. Φαίνεται λοιπόν πως η παρατηρούμενη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB και η επακόλουθη καταστολή της δράσης των αντι-αποπτωτικών γονιδίων τα οποία ενεργοποιεί, συνεπικουρούν στην κυτταροτοξική δράση των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης [296, 397]. Ο κρίσιμος ρόλος της απορρύθμισης του άξονα κυτταρικής σηματοδότησης IGF-IR/Akt στην προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής και την ανάπτυξη κακοήθειας έχει μελετηθεί και σε άλλα βιολογικά συστήματα [398]. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί επιστημονικές μελέτες της αναστολής της σηματοδότησης Akt σε απόκριση ανσαμυκινών βενζοκινόνης τόσο σε καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος [399] όσο και σε υποτύπους καρκίνου του γαστρεντερικού σωλήνα [400]. Η πλήρης καταστολή της σηματοδότησης Akt, κάτω από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης καταδεικνύει την αποτελεσματική ανάσχεση της μεταγωγής σήματος σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, λόγω αναστολής της Hsp90 (Εικόνα 73) [296].

Στην εργασία αυτή, η αναστολή της μοριακής συνοδού Hsp90 λόγω επίδρασης ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης οδήγησε σε μεταβολή της φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων FOXO, μορίων κατωρροϊκά εντοπιζόμενων της σηματοδότησης Akt, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 φέρουν συστατικά φωσφορυλιωμένους παράγοντες FOXO, αντίθετα με τα κύτταρα RT112 και RT4, όπου τα επίπεδα φωσφορυλίωσης ποικίλουν από χαμηλά (RT112) έως μη ανιχνεύσιμα (RT4). Σε ότι αφορά στην κυτταρική σειρά υψηλής κακοήθειας TCCSUP, καταδεικνύεται σαφής ύπαρξη χαμηλών επιπέδων συστατικής φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων FOXO, γεγονός το οποίο πιθανόν συνδέεται με πλήρη ανεξαρτητοποίηση των κυττάρων υψηλής κακοήθειας από τη ρυθμιστική δράση των συγκεκριμένων μορίων, τα οποία λειτουργούν ως επαγωγείς αποπτωτικού θανάτου [317, 318, 325]. Η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση της φωσφορυλίωσης των

μεταγραφικών παραγόντων FOXO1 και FOXO3, ενισχύοντας την αποπτωτική δραστηριότητά τους και συνεισφέροντας παράλληλα στον κυτταροτοξικό χαρακτήρα της τζελντανανμυκίνης και των ημισυνθετικών αναλόγων της [296].

Η αναστολή της Hsp90 με επακόλουθη ανάσχεση του σηματοδοτικού δυναμικού της κινάσης Akt συνοδεύεται από ταυτόχρονη καταστολή της σηματοδότησης Raf/MEK/Erk σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, όπως αποδεικνύεται στην εργασία αυτή. Παρά το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των κινασών p44/42 (Erk1/2) σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο αυξομείωσης με εκείνο της Hsp90, εν τούτοις τα επίπεδα φωσφορυλίωσής τους εμφανίζουν ένα δοσο-εξαρτώμενο μοτίβο μειορύθμισης και στις τέσσερις (4) καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Επομένως, η μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνών Erk σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκίνης δεν αντικατοπτρίζει τη λειτουργική ακεραιότητα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, καθώς η δυνατότητα μεταγωγής του σήματος εξαλείφεται ήδη από τις ενδιάμεσες δόσεις του εκάστοτε φαρμακευτικού παράγοντα, ωστόσο με ποσοτικές διαφορές, σε επίπεδο έντασης [296]. Η πλήρης ανάσχεση της σηματοδότησης Erk καταδεικνύει τη μοριακή «διακοπή» σηματοδοτικών μονοπατιών λόγω αναστολής της Hsp90 και φανερώνει την πολλαπλότητα της δράσης των ανσαμυκινών βενζοκινόνης ακόμα και σε πρωτεϊνικά μόρια που δεν αποτελούν *bona fide* «πελάτες» της μοριακής συνοδού (Εικόνα 73), οι οποίοι ωστόσο συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εντοπίζονται κατωρροϊκά τέτοιων πρωτεϊνικών μορίων-«πελατών» (π.χ. Raf-1). Σύνδεση μεταξύ αναστολής της Hsp90 από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης και της σηματοδότησης Erk έχει αναφερθεί σε λευχαιμικά καρκινικά κύτταρα και κύτταρα λεμφώματος Hodgkin [401, 402].

Η κυτταρική διήθηση και η μετάσταση αποτελούν δύο (2) σημαντικά φαινόμενα-«ορόσημα» στην εξέλιξη της καρκινικής εξαλλαγής και απαντώνται συχνά σε προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης [273, 274]. Πρωτεϊνικό μόριο-«κλειδί» στη ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη μεταναστευτικού δυναμικού αποτελεί ο υποδοχέας c-Met, ο

οποίος είναι σημαντική πρωτεΐνη-«πελάτης» της Hsp90 [403]. Ένα σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανίχνευση συστατικής έκφρασης και ενεργότητας του υποδοχέα c-Met στα καρκινικά κύτταρα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP, ενώ χαρακτηριστική είναι η πλήρης απουσία του στα κύτταρα χαμηλής (RT4) κακοήθειας. Η κυτταρική σειρά RT112 (ενδιάμεσης κακοήθειας) εμφανίζει χαμηλά, ωστόσο ανιχνεύσιμα επίπεδα του υποδοχέα, αναδεικνύοντας την σύνδεση ανάμεσα στο βαθμό κακοήθειας και τα βασικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του c-Met [296, 402, 404]. Όπως καταδεικνύεται στο πλαίσιο των πειραματικών αποτελεσμάτων που παρατίθενται εδώ, η αναστολή της Hsp90 από ανσαμυκίνες οδηγεί σε δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης c-Met, καθώς και της σηματοδοτικής ενεργότητας του υποδοχέα, συνεισφέροντας έτσι σημαντικά στην ανάσχεση της κυτταρικής κινητικότητας, όπως αποδεικνύουν οι δοκιμασίες επούλωσης ανοιχτής πληγής. Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, καθίσταται σαφές ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα συστατικής φωσφορυλίωσης μορίων όπως η κινάση Akt, οι MAP κινάσες Erk1/2, οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO και οι υποδοχείς IGF-IR και c-Met, γεγονός που τους προσδίδει επιθετικότητα, ικανότητα διήθησης παρακείμενων ιστών και ισχυρό μεταστατικό δυναμικό. Όμως, η αναστολή της Hsp90 από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της κυτταρικής κινητικότητας και διήθησης (Εικόνα 73), όπως έχει επίσης δειχθεί σε καρκινικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος [402].

Η καταστολή της κυτταρικής κινητικότητας, λόγω φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 αποδείχθηκε περαιτέρω με την ειδική χρώση μορίων του κυτταρικού σκελετού και την παρατήρηση κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser. Η μεταβολή του προτύπου της κυτταροπλασματικής κατανομής και οργάνωσης των πρωτεϊνικών μορίων της ακτίνης και της τουμπουλίνης κατέδειξε την ισχυρή επίδραση των ανσαμυκινών βενζοκινόνης στη δυναμική του κυτταροσκελετού, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε λειτουργική αναστολή της ανάπτυξης προεκβολών και φυλλοποδίων, ανάσχεση της διήθησης παρακείμενων ιστών, και ίσως

μείωση της μετανάστευσης. Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν την συσσώρευση ακετυλιωμένης τουμπουλίνης με επακόλουθο μοριακό «πάγωμα» των μικροσωληνίσκων και ενδεχομένως άλλων κυτταροπλασματικών ινιδίων, αποκαλύπτοντας έτσι τη λειτουργική απενεργοποίηση του κυτταροσκελετού. Είναι γνωστό ότι η ακετυλίωση και απο-ακετυλίωση αποτελούν την κρίσιμη επιγενετική τροποποίηση-«διακόπτη» που ευθύνεται για τον δυναμικό πολυμερισμό και απο-πολυμερισμό της τουμπουλίνης και τον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων [369-371, 374, 375].

Στην προσπάθεια εξιχνίασης του μηχανισμού με τον οποίο η δια μέσω ανσαμυκινών αναστολή της Hsp90 οδηγεί στη μοριακή αδρανοποίηση της τουμπουλίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης, πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπέδων έκφρασης της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC6, με τη χρήση ανοσοστυπωμάτων Western. Η HDAC6 αποτελεί *bona fide* «πελάτη» της μοριακής συνοδού Hsp90 [159], ενώ είναι γνωστή η δράση της στην αφαίρεση ακετυλομάδων από τα μόρια της τουμπουλίνης, καθιστώντας την επιδεκτική σε πολυμερισμό [371, 374]. Όπως κατέδειξαν τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, η αναστολή της Hsp90 οδήγησε σε ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της HDAC6, προτείνοντας τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται αδρανοποίηση του δικτύου του κυτταροσκελετού των καρκινικών κυττάρων. Πέρα από την αναστολή της κυτταρικής κινητικότητας, το μοριακό «πάγωμα» της τουμπουλίνης μέσω μειορύθμισης της HDAC6 συνεισφέρει στη συνολική καταστολή του καρκινικού φαινοτύπου, καθώς η αδρανοποίηση των μικροσωληνίσκων προκαλεί ανάσχεση της ενδοκυτταρικής μεταφοράς πρωτεϊνικών μορίων και κυστιδίων, οδηγώντας σε πολυ-επίπεδη ελάττωση της νεοπλασματικής σηματοδότησης λόγω περιορισμών στην ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην εν λόγω μεταγωγή σήματος [347, 351, 363, 374]. Φαίνεται λοιπόν πως η καταστολή της ομαλής λειτουργίας των ινιδίων του κυτταροσκελετού αναστέλλει πολλαπλές επιμέρους παραμέτρους της καρκινικής εξαλλαγής. Τέλος, επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή της HDAC6 προκαλεί ακετυλίωση της ίδιας της μοριακής συνοδού Hsp90, καθοδηγώντας τη

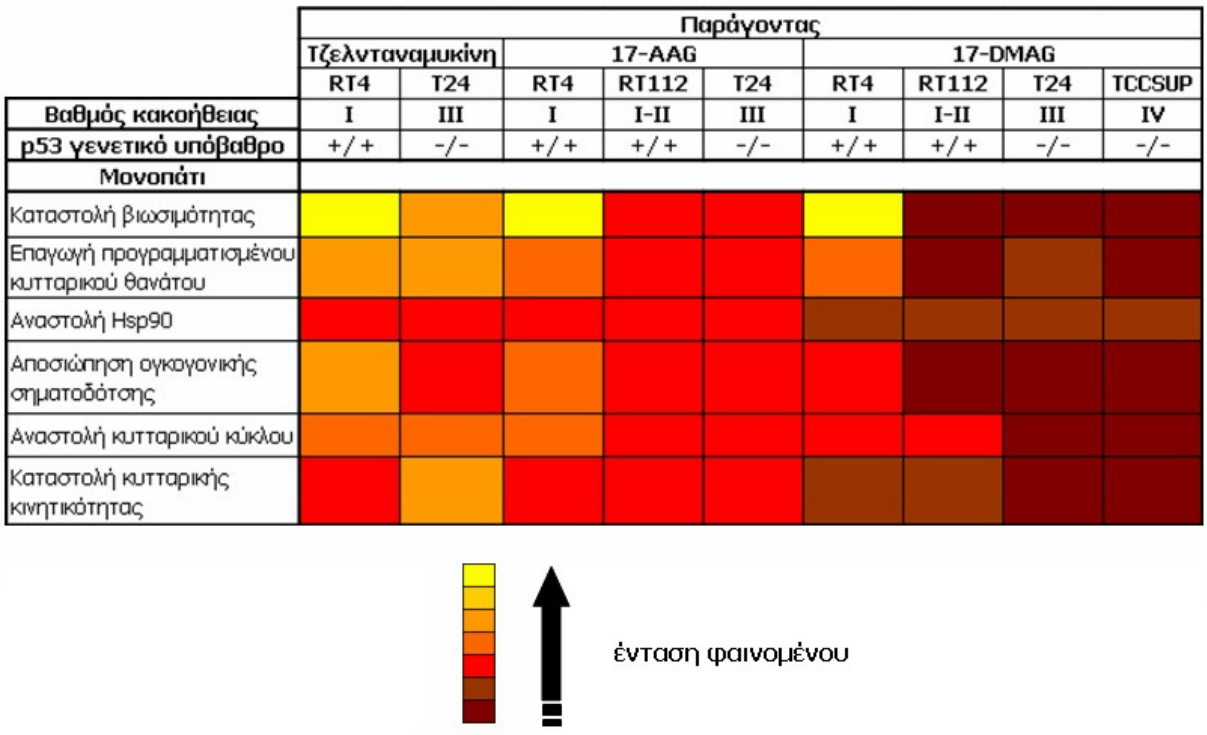
λειτουργική απενεργοποίησή της [405]. Η ακετυλίωση της Hsp90 που επάγεται από μειορύθμιση της HDAC6, η ταυτόχρονη παραγωγή του πρωτεολυτικού θραύσματος των ~65 kDa σε καρκινικές σειρές χαμηλής κακοήθειας, καθώς και η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της ενδογενούς ενεργότητας ATPάσης της Hsp90 φαίνεται πως θα μπορούσαν να δράσουν συνεργιστικά προκαλώντας δραματική ελάττωση της λειτουργικότητας της μοριακής συνοδού, ακόμα και σε περιπτώσεις που τα συνολικά πρωτεϊνικά της επίπεδα φαίνεται να αυξάνονται, σε απόκριση ανσαμυκινών βενζοκινόνης. Πρέπει να σημειωθεί επίσης, ο ρόλος της αποακετυλάσης HDAC6 σε έναν νέο, προτεινόμενο μηχανισμό αποικοδόμησης πρωτεϊνικών μορίων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, αλλά δεν αποικοδομούνται μέσω ουβικουϊτίνωσης και μεταφοράς στο πρωτεάσωμα. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, οι πρωτεΐνες που δεν έχουν σωστή λειτουργική αναδίπλωση στο χώρο μεταφέρονται πάνω στους μικροσωληνίσκους με την μεσολάβηση της HDAC6 και οδηγούνται στα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC, microtubule organizing center), όπου τοποθετούνται σε δομές γνωστές ως «συσσωματοσώματα» (aggresomes) και ακολούθως αποικοδομούνται στο λυσόσωμα [406, 407]. Φαίνεται λοιπόν πως η φαρμακο-επαγόμενη ανάσχεση της HDAC6 σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης προωθεί την καταστολή του ογκογονικού φαινοτύπου μέσω επιμέρους αντιδράσεων σε πολλαπλά επίπεδα της κυτταρικής φυσιολογίας, συνεισφέροντας και ενισχύοντας την αναστολή της Hsp90 από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης.

Ο μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών μορίων που διατηρούν τη δομική και λειτουργική τους ακεραιότητα χάρη στην μοριακή συνοδό Hsp90, καθώς και το ευρύ φάσμα των κυτταρικών διεργασιών στις οποίες αυτά συμμετέχουν, οδήγησε στην μελέτη της επίδρασης των ανσαμυκινών βενζοκινόνης στο επίπεδο ολόκληρου του πρωτεώματος καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Όπως αποδεικνύεται στη συγκεκριμένη διατριβή, η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδηγεί στην μειορύθμιση μιας πλειάδας πρωτεϊνικών-«πελατών», καθώς και στην αναστολή των επιμέρους κυτταρικών διεργασιών στις οποίες αυτοί συμμετέχουν. Χαρακτηριστικό γεγονός αποτελεί η ταυτόχρονη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης

περισσότερων από εκατό (100) πρωτεϊνικών μορίων σε απόκριση κάθε επιμέρους συγκέντρωσης του φαρμακευτικού παράγοντα 17-AAG, τα οποία συνιστούν μέλη του κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, ένζυμα του μεταβολισμού, μεμβρανικούς υποδοχείς, μεταγραφικούς παράγοντες, μόρια αποτοξίνωσης και κυτταροπροστασίας, ενζυμικούς καταλύτες, μεταφορείς ιόντων, κ.λπ. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι η αναστολή της Hsp90 από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης οδηγεί σε σημαντικές μεταβολές σε επίπεδο πρωτεώματος, ενορχηστρώνοντας την απόκριση των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στην αντι-νεοπλαστική τους δράση.

Όπως καταδεικνύουν συνολικά τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ, η αναστολή της μοριακής συνοδού Hsp90 από μέλη της ομάδας ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης έδωσε υποσχόμενα αποτελέσματα έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου ουροθηλίου. Ένας από τους στόχους της συγκεκριμένης διατριβής αποτέλεσε και η σύγκριση μεταξύ των επιμέρους μελών της ομάδας αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή κλινική αξία της εκάστοτε χημικής ένωσης στη σύγχρονη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Πρέπει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε ποιοτική και ποσοτική διακύμανση της αποτελεσματικότητας του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα, γεγονός που αναδεικνύει τη διαφοροποίηση της ανασταλτικής επίδρασης της κάθε χημικής ένωσης (Εικόνα 74). Η τζελνταναμυκίνη, η πρωτότυπη ένωση της ομάδας των βενζοκινονών ανσαμυκίνης, όπου εντοπίστηκε αρχικά η δυνατότητα μη-αντιστρεπτής αναστολής της Hsp90, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στο πλαίσιο της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας, έδειξε πως οδηγεί σε στοχευμένη αναστολή του μορίου στόχου της, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν την αποτελεσματική επίδραση της τζελνταναμυκίνης έναντι καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης υψηλής κακοήθειας, καθώς και την ισχυρή αναστολή των επιμέρους ογκογονικών σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες-«πελάτες» της μοριακής συνοδού. Παρά την δυνατότητα της τζελνταναμυκίνης για αναστολή του νεοπλασματικού φαινοτύπου, μελέτες σε *in vivo* συστήματα κατέδειξαν την ανάπτυξη ισχυρής ηπατοτοξικότητας, με

την αύξηση των επιπέδων των τρανσαμινασών, την επαγωγή της κρεατινικής φωσφοκινάσης, της γαλακτικής αφυδρογονάσης και του αζώτου της κυκλοφορίας, αποκλείοντας την πιθανή χρήση του φαρμακευτικού παράγοντα στον άνθρωπο [277, 285].



Εικόνα 74: Ενοποιημένα, συγκριτικά αποτελέσματα ανάσχεσης παραμέτρων της καρκινικής εξαλλαγής, λόγω φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 από ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Η ένταση της καταστολής απεικονίζεται με το διαβαθμισμένο χρωματικό πρότυπο (κάτω).

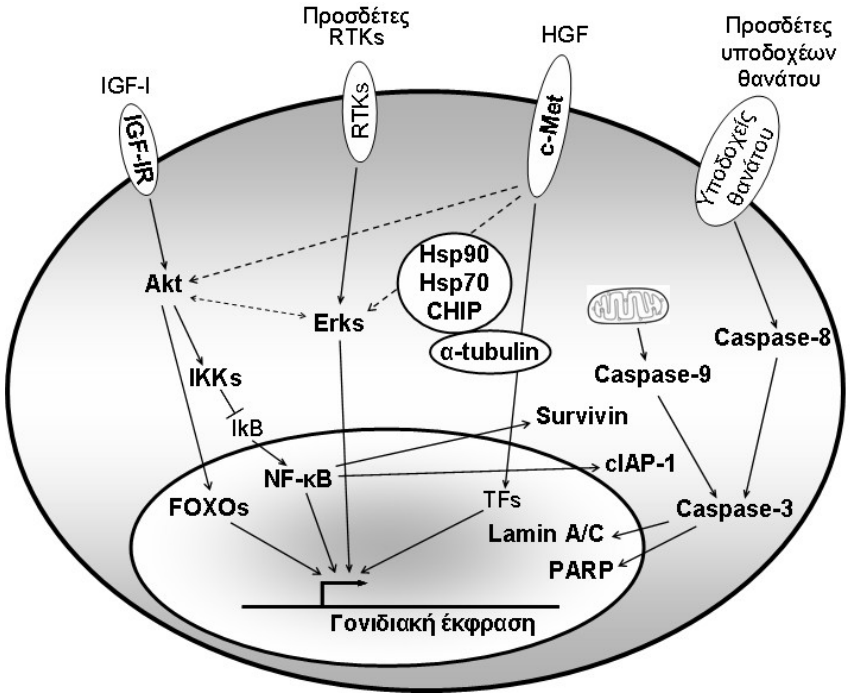
Τα ημισυνθετικά ανάλογα της τζελνταναμυκίνης (17-AAG και 17-DMAG) που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή έχουν υποστεί κατάλληλη χημική τροποποίηση ώστε να μην προκαλούν τοξικότητα στο ήπαρ των ανώτερων οργανισμών, αναιρώντας τις αρνητικές επιδράσεις της πρωτότυπης χημικής ένωσης και αποκτώντας έτσι σημαντικό πλεονέκτημα για πιθανές εφαρμογές στην κλινική πράξη. Πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το 17-AAG, όσο και το 17-DMAG επέδειξαν αποδοτικότερη κυτταροτοξική και ογκοκατασταλτική δράση συγκριτικά με την τζελνταναμυκίνη, παρουσιάζοντας ισχυρή εξειδίκευση στόχευσης για καρκινικά κύτταρα υψηλού βαθμού κακοήθειας. Και τα δύο (2) ημισυνθετικά ανάλογα επέδειξαν ισχυρή καταστολή της κυτταρικής

σηματοδότησης, ανάσχεση του πολλαπλασιασμού και δραματική μείωση της κυτταρικής κινητικότητας, με παρόμοιο ποιοτικό πρότυπο δράσης. Πιο συγκεκριμένα, το 17-DMAG εμφανίζει ισχυρότερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε κυτταρικές σειρές υψηλής κακοήθειας, συγκριτικά με το 17-AAG, ενώ και τα δύο (2) χημειοθεραπευτικά κατέδειξαν υψηλή αναστολή του κυτταρικού κύκλου, με κυτταρο- και βαθμο-ειδικό (cell type-specific και grade-dependent) πρότυπο ανάσχεσης. Πρέπει να σημειωθεί πως λόγω της υψηλής επαγωγής προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου από το 17-DMAG, δεν μελετήθηκε όλο το φάσμα των επιμέρους συγκεντρώσεων, καθώς η δόση των 10 μM αποδείχθηκε πολύ τοξική για τις κυτταρικές σειρές υψηλής κακοήθειας, δυσχεραίνοντας τους επιμέρους μοριακούς χειρισμούς λόγω του χαμηλού ποσοστού ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την υψηλή στόχευση της Hsp90 από το 17-DMAG και την ισχυρή αναστολή των παραμέτρων του καρκινικού φαινοτύπου από χαμηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα στις *in vitro* καλλιέργειες, συγκριτικά με αυτές της τζελντανανομυκίνης και του 17-AAG. Επιπλέον, το 17-DMAG επέδειξε αποτελεσματικότερη επαγωγή μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, καθώς μπορεί και επιτυγχάνει σημαντική ανάπτυξη αποπτωτικού και αυτοφαγικού φαινοτύπου από χαμηλότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με το 17-AAG. Παρόμοια αποτελέσματα παρήγαγαν τα πειράματα που αφορούν στην αναστολή της κυτταρικής σηματοδότησης, με το 17-DMAG να παρουσιάζει υψηλή ικανότητα ανάσχεσης των ογκογονικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος, γεγονός το οποίο δεν αναιρεί την υψηλά αποδοτική δράση του 17-AAG (Εικόνα 74). Τα πειραματικά δεδομένα που παρατίθενται εδώ βρίσκονται σε συμφωνία με τις κλινικές δοκιμές που πραγματοποιούνται για τους δύο (2) ημισυνθετικούς παράγοντες, καθώς τόσο το υδατοδιαλυτό 17-DMAG, όσο και το 17-AAG (συνήθως διαλυόμενο σε οργανικούς διαλύτες π.χ. DMSO) παρουσιάζουν υψηλή βιολογική δραστικότητα σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικές βιολογικές πλατφόρμες, με το 17-DMAG να μην υποκύπτει στις εκτενείς μεταβολικές τροποποιήσεις που υποβάλλεται το 17-AAG, όπως αποδεικνύουν κλινικές δοκιμές σε ζωικά μοντέλα πειραματικών όγκων [292, 408]. Επομένως, τόσο το 17-AAG, όσο και το 17-DMAG βρίσκονται στην αιχμή

της σύγχρονης στοχευμένης καρκινικής θεραπείας, παρουσιάζοντας υποσχόμενα προκλινικά και κλινικά αποτελέσματα, με το 17-DMAG να υπερτερεί συγκριτικά, λόγω αυξημένης αποτελεσματικότητας με τη χορήγηση χαμηλότερων επιμέρους δραστικών συγκεντρώσεων. Πρέπει να σημειωθεί λοιπόν η εισαγωγή των δύο (2) ημισυνθετικών ανσαμυκινών σε κλινικές δοκιμές φάσης I και II, οι οποίες αφορούν νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος (πολλαπλό μυέλωμα) καθώς και στερεούς όγκους, όπως εκείνον του μαστού και το μελάνωμα [409-412].

Ένα εξαιρετικά σημαντικό σημείο αποτελεί η αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων που παρουσιάστηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, κάτω από το πρίσμα της πρόγνωσης και της επιλογής της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης. Όπως καταδεικνύεται εδώ, υπάρχει μια πλειάδα μορίων τα οποία ενδεχομένως δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες (biomarkers) για την κλινική αξιολόγηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης, όπως τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt στο κατάλοιπο σερίνης της θέσης 473 (Ser473), η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, η συστατική έκφραση του υποδοχέα c-Met και τα επίπεδα της ενεργότητάς του (φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα τυροσίνης των θέσεων 1234 και 1235, Tyr1234/Tyr1235), οι φωσφορυλιωμένοι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO3 και FOXO1 (Thr32 και Thr24 αντίστοιχα), ο συστατικά ενεργοποιημένος υποδοχέας του IGF-I (Tyr1131), τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης του γενετικού τόπου *Bok* και το γενετικό καθεστώς της πρωτεΐνης p53 (φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένη). Η πλειοψηφία των μορίων που φαίνεται να παρουσιάζουν βαθμο-ειδικό (grade-specific) μοτίβο έκφρασης αφορούν σε σύνδεση ανάμεσα σε συστατικά επίπεδα ενεργότητας και βαθμό κακοήθειας, με τους περισσότερο κακοήθεις φαινοτύπους να σχετίζονται με σημαντικά επίπεδα βασικής ενεργότητας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Είναι λοιπόν δυνατή η δημιουργία ενός συνδυασμένου πρωτοκόλλου κλινικής σταδιοποίησης νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης με ταυτόχρονη ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων που παρουσιάζουν βαθμο-εξαρτώμενο πρότυπο έκφρασης και λειτουργίας, το

οποίο θα μπορούσε να αποδειχθεί σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο, με υψηλή προγνωστική αξία.



Εικόνα 75: Πολλαπλή επίδραση των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης σε κυτταρικό επίπεδο. Στην εικόνα παρουσιάζεται η πολυδιάστατη επίδραση των συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας. Οι συνεχείς γραμμές αντικατοπτρίζουν γραμμική κυτταρική σηματοδότηση, ενώ οι στικτές γραμμές καταδεικνύουν παράπλευρες και διακλαδισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονοπατιών μεταγωγής σήματος (RTK-Receptor Tyrosine Kinase, υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, TFs Transcription factors, μεταγραφικοί παράγοντες).

Η Hsp90 καταλαμβάνει κομβικό ρόλο στο περίπλοκο πλέγμα της ενδοκυτταρικής ογκογονικής σηματοδότησης, καθώς διαφυλάσσει τη δομική ακεραιότητα πολλαπλών προϊόντων ογκογονιδίων, ενώ παράλληλα ενορχηστρώνει τη διαμορφωτική ωρίμανση σε επίπεδο πρωτεώματος. Οι κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες οι οποίες επιτελούνται από την μοριακή συνοδό και ο αυξημένος βαθμός εξάρτησης των καρκινικών κυττάρων στις συγκεκριμένες λειτουργίες, φέρνουν την αναστολή της Hsp90 στο προσκήνιο της σύγχρονης χημειοθεραπείας [35, 36, 159, 276, 291]. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής παρουσιάστηκαν σαφή πειραματικά δεδομένα τα οποία ενισχύουν τις υποσχόμενες θεραπευτικές δυνατότητες της αναστολής

της Hsp90 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Η πλειοτροπική, στοχευμένη και συνδυαστική επίδραση των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης σε ένα πλήθος πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90 προσφέρει τη δυνατότητα ανάπτυξης μιας ισχυρής και επιτυχημένης πλατφόρμας στοχευμένης θεραπείας (Εικόνα 75) [296].

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, τα δεδομένα που παρατίθενται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής καταδεικνύουν ξεκάθαρα το σημαντικό ρόλο που μπορούν να διαδραματίσουν οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης στη θεραπεία των νεοπλασιών της ουροδόχου κύστης, καθώς η ανασταλτική επίδρασή τους οδηγεί τα κύτταρα σε πλήρη ανάσχεση των ογκογονικών σηματοδοτικών παραμέτρων, καταστολή της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού και μείωση της κινητικότητας, γεγονότα που καταλήγουν συνολικά στην αποσιώπηση του επιθετικού καρκινικού φαινοτύπου (Εικόνες 73 και 75). Η περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην αντι-νεοπλαστική δράση της συγκεκριμένης ομάδας αντιβιοτικών ενδέχεται να προσφέρει μια νέα προοπτική στην κλινική θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, καθώς και άλλων μοφών ανθρώπινης κακοήθειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

6. Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Moore KL: **Clinically oriented anatomy, 3rd edition**.
2. Berne RM, Levy MN: **Principles of physiology, second edition**. 1996.
3. Walsh PC: **Campbells Urology 8th Edition**; 2002.
4. Rubin E: **Essential pathology, 3rd edition**. 2000.
5. Burkitt G, Young B, Heath JW: **Wheater's functional histology, 3rd edition**. 2000.
6. Netter FH: **Atlas of human anatomy, 3rd edition**. 2003.
7. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG: **Williams Gynecology**. 2008
8. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A: **Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management**. *Cancer Pract* 2002, **10**(6):311-322.
9. Clark PE: **Bladder cancer**. *Curr Opin Oncol* 2007, **19**(3):241-247.
10. Wu XR: **Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(9):713-725.
11. Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA: **The present and future burden of urinary bladder cancer in the world**. *World J Urol* 2009, **27**(3):289-293.
12. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: **Cancer statistics, 2010**. *CA Cancer J Clin*, **60**(5):277-300.
13. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE: **Bladder cancer in 2010: how far have we come?** *CA Cancer J Clin*, **60**(4):244-272.
14. Scosyrev E, Trivedi D, Messing E: **Female bladder cancer: incidence, treatment, and outcome**. *Curr Opin Urol*, **20**(5):404-408.
15. Mungan NA, Aben KK, Schoenberg MP, Visser O, Coebergh JW, Witjes JA, Kiemeney LA: **Gender differences in stage-adjusted bladder cancer survival**. *Urology* 2000, **55**(6):876-880.
16. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000**. *Int J Cancer* 2001, **94**(2):153-156.
17. Micheli A, Mariotto A, Giorgi Rossi A, Gatta G, Muti P: **The prognostic role of gender in survival of adult cancer patients**. *Eur J Cancer* 1998, **34**(14):2271-2278.
18. Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Nagashima Y, Chang YJ, Hu YC, Tsai MY *et al*: **Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals**. *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**(7):558-568.
19. Shen SS, Smith CL, Hsieh JT, Yu J, Kim IY, Jian W, Sonpavde G, Ayala GE, Younes M, Lerner SP: **Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue**. *Cancer* 2006, **106**(12):2610-2616.
20. Johnson AM, O'Connell MJ, Miyamoto H, Huang J, Yao JL, Messing EM, Reeder JE: **Androgenic dependence of exophytic tumor growth in a transgenic mouse model of bladder cancer: a role for thrombospondin-1**. *BMC Urol* 2008, **8**:7.
21. Boorjian SA, Heemers HV, Frank I, Farmer SA, Schmidt LJ, Sebo TJ, Tindall DJ: **Expression and significance of androgen receptor coactivators in urothelial carcinoma of the bladder**. *Endocr Relat Cancer* 2009, **16**(1):123-137.
22. Tuygun C, Kankaya D, Imamoglu A, Sertcelik A, Zengin K, Oktay M, Sertcelik N: **Sex-specific hormone receptors in urothelial carcinomas of the human urinary bladder: a comparative analysis of clinicopathological features and survival outcomes according to receptor expression**. *Urol Oncol*, **29**(1):43-51.
23. Lynch CF, Cohen MB: **Urinary system**. *Cancer* 1995, **75**(1 Suppl):316-329.
24. Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, Murphy GP, Mettlin C, Menck HR: **The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society**. *Cancer* 1996, **78**(7):1505-1513.

25. Saad A, Hanbury DC, McNicholas TA, Boustead GB, Morgan S, Woodman AC: **A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine**. *BJU Int* 2002, **89**(4):369-373.
26. Soloway MS, Sofer M, Vaidya A: **Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder**. *J Urol* 2002, **167**(4):1573-1583.
27. Sexton WJ, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI, Kang LC: **Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease**. *Cancer Control*, **17**(4):256-268.
28. Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL: **Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials**. *J Urol* 2002, **168**(5):1964-1970.
29. Gallagher DJ, Milowsky MI, Iasonos A, Maluf FC, Russo P, Dalbagni G, Donat MS, Boyle MG, Zheng J, Riches J *et al*: **Sequential adjuvant chemotherapy after surgical resection of high-risk urothelial carcinoma**. *Cancer* 2009, **115**(22):5193-5201.
30. Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM: **Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading?** *Cancer* 1987, **60**(11):2766-2774.
31. Rubben H, Lutzeyer W, Fischer N, Deutz F, Lagrange W, Giani G: **Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors**. *J Urol* 1988, **139**(2):283-285.
32. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS: **Bladder cancer**. *Lancet* 2009, **374**(9685):239-249.
33. Gallagher DJ, Milowsky MI: **Bladder cancer**. *Curr Treat Options Oncol* 2009, **10**(3-4):205-215.
34. Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J: **Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review**. *Cancer* 2006, **106**(6):1205-1216.
35. Wallerand H, Reiter RR, Ravaud A: **Molecular targeting in the treatment of either advanced or metastatic bladder cancer or both according to the signalling pathways**. *Curr Opin Urol* 2008, **18**(5):524-532.
36. Voutsinas GE, Stravopodis DJ: **Molecular targeting and gene delivery in bladder cancer therapy**. *J Buon* 2009, **14 Suppl 1**:S69-78.
37. Vlaovic P, Jewett MA: **Cyclophosphamide-induced bladder cancer**. *Can J Urol* 1999, **6**(2):745-748.
38. Wu X, Gu J, Grossman HB, Amos CI, Etzel C, Huang M, Zhang Q, Millikan RE, Lerner S, Dinney CP *et al*: **Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes**. *Am J Hum Genet* 2006, **78**(3):464-479.
39. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB: **Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study**. *Int J Cancer* 1989, **44**(4):622-628.
40. Locke JR, Hill DE, Walzer Y: **Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage**. *J Urol* 1985, **133**(6):1034-1035.
41. Murta-Nascimento C, Schmitz-Drager BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N: **Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death**. *World J Urol* 2007, **25**(3):285-295.
42. Guha N, Steenland NK, Merletti F, Altieri A, Cogliano V, Straif K: **Bladder cancer risk in painters: a meta-analysis**. *Occup Environ Med*, **67**(8):568-573.
43. Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Campbell S, Rousseau MC, Boffetta P: **Listing occupational carcinogens**. *Environ Health Perspect* 2004, **112**(15):1447-1459.
44. Zeegers MP, Swaen GM, Kant I, Goldbohm RA, van den Brandt PA: **Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands**. *Occup Environ Med* 2001, **58**(9):590-596.

45. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Cogliano V: **Carcinogenicity of 1,3-butadiene, ethylene oxide, vinyl chloride, vinyl fluoride, and vinyl bromide**. *Lancet Oncol* 2007, **8**(8):679-680.
46. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Benbrahim-Tallaa L, Cogliano V: **Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting**. *Lancet Oncol* 2007, **8**(12):1065-1066.
47. Delclos GL, Lerner SP: **Occupational risk factors**. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008(218):58-63.
48. Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Belldegrun AS, Pantuck AJ: **Prevention of bladder cancer: a review**. *Eur Urol* 2006, **49**(2):226-234.
49. Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmoller J, Ishizaki T, Karakaya AE *et al*: **Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, **9**(5):461-467.
50. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U *et al*: **Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies**. *Int J Cancer* 2000, **86**(2):289-294.
51. Augustine A, Hebert JR, Kabat GC, Wynder EL: **Bladder cancer in relation to cigarette smoking**. *Cancer Res* 1988, **48**(15):4405-4408.
52. Byar D, Blackard C: **Comparisons of placebo, pyridoxine, and topical thiotepa in preventing recurrence of stage I bladder cancer**. *Urology* 1977, **10**(6):556-561.
53. Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, Bell DA: **The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction**. *Cancer Res* 1998, **58**(16):3603-3610.
54. Castelao JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK: **Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention**. *Br J Cancer* 2000, **82**(7):1364-1369.
55. Robbiano L, Carrozzino R, Bacigalupo M, Corbu C, Brambilla G: **Correlation between induction of DNA fragmentation in urinary bladder cells from rats and humans and tissue-specific carcinogenic activity**. *Toxicology* 2002, **179**(1-2):115-128.
56. Johansson SL, Cohen SM: **Epidemiology and etiology of bladder cancer**. *Semin Surg Oncol* 1997, **13**(5):291-298.
57. Bedwani R, Renganathan E, El Kwhsky F, Braga C, Abu Seif HH, Abul Azm T, Zaki A, Franceschi S, Boffetta P, La Vecchia C: **Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt**. *Br J Cancer* 1998, **77**(7):1186-1189.
58. Muthami LN, Katsivo MN, Kinoti SN, Omondi O, Karama M, Karumba P, Kingori F, Kimani S: **Pattern of Schistosoma mansoni infection after intervention in Mwea irrigation scheme in Kenya**. *East Afr Med J* 1995, **72**(2):94-100.
59. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ: **Relationship between schistosomiasis and bladder cancer**. *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**(1):97-111.
60. Sandhu JS, Vickers AJ, Bochner B, Donat SM, Herr HW, Dalbagni G: **Clinical characteristics of bladder cancer in patients previously treated with radiation for prostate cancer**. *BJU Int* 2006, **98**(1):59-62.
61. Buchanan-Davidson DJ: **Bladder cancer etiology and natural carcinogens**. *Wis Med J* 1980, **79**(5):29-30.
62. Cohen SM, Wittenberg JF, Bryan GT: **Effect of avitaminosis A and hypervitaminosis A on urinary bladder carcinogenicity of N-(4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide**. *Cancer Res* 1976, **36**(7 PT 1):2334-2339.
63. Greco AM, Gentile M, Di Filippo O, Coppola A: **Study of blood vitamin C in lung and bladder cancer patients before and after treatment with ascorbic acid. A preliminary report**. *Acta Vitaminol Enzymol* 1982, **4**(1-2):155-162.

64. Mirvish SS: **Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer**. *Cancer* 1986, **58**(8 Suppl):1842-1850.
65. Narisawa T, Reddy BS, Wong CQ, Weisburger JH: **Effect of vitamin A deficiency on rat colon carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine**. *Cancer Res* 1976, **36**(4):1379-1383.
66. Sporn MB: **Retinoids and carcinogenesis**. *Nutr Rev* 1977, **35**(4):65-69.
67. Cohen SM, Cano M, St John MK, Garland EM, Khachab M, Ellwein LB: **Effect of sodium saccharin on the neonatal rat bladder**. *Scanning Microsc* 1995, **9**(1):137-147; discussion 148.
68. Cohen SM, Garland EM, Cano M, St John MK, Khachab M, Wehner JM, Arnold LL: **Effects of sodium ascorbate, sodium saccharin and ammonium chloride on the male rat urinary bladder**. *Carcinogenesis* 1995, **16**(11):2743-2750.
69. Zeegers MP, Tan FE, Goldbohm RA, van den Brandt PA: **Are coffee and tea consumption associated with urinary tract cancer risk? A systematic review and meta-analysis**. *Int J Epidemiol* 2001, **30**(2):353-362.
70. Hoover RN, Strasser PH: **Artificial sweeteners and human bladder cancer. Preliminary results**. *Lancet* 1980, **1**(8173):837-840.
71. Villanueva CM, Fernandez F, Malats N, Grimalt JO, Kogevinas M: **Meta-analysis of studies on individual consumption of chlorinated drinking water and bladder cancer**. *J Epidemiol Community Health* 2003, **57**(3):166-173.
72. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C: **Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer**. *Nat Clin Pract Urol* 2006, **3**(6):327-340.
73. Marsit CJ, Karagas MR, Schned A, Kelsey KT: **Carcinogen exposure and epigenetic silencing in bladder cancer**. *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1076**:810-821.
74. Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A, Nelson HH, Kelsey KT: **Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer**. *Carcinogenesis* 2006, **27**(1):112-116.
75. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: **The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee**. *Am J Surg Pathol* 1998, **22**(12):1435-1448.
76. Edge SB, Byrd DR, Compton CC: **AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition**. 2010.
77. Goebell PJ, Knowles MA: **Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium**. *Urol Oncol*, **28**(4):409-428.
78. Cheng L, Cheville JC, Neumann RM, Leibovich BC, Egan KS, Spotts BE, Bostwick DG: **Survival of patients with carcinoma in situ of the urinary bladder**. *Cancer* 1999, **85**(11):2469-2474.
79. Cordon-Cardo C: **Molecular alterations in bladder cancer**. *Cancer Surv* 1998, **32**:115-131.
80. Cordon-Cardo C: **Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression**. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008(218):154-165.
81. Cote RJ, Datar RH: **Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms**. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003, **46 Suppl**:S67-83.
82. Abraham R, Pagano F, Gomella LG, Baffa R: **Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways**. *Front Biosci* 2007, **12**:826-838.
83. Sanchez-Carbayo M, Cordon-Cardo C: **Molecular alterations associated with bladder cancer progression**. *Semin Oncol* 2007, **34**(2):75-84.
84. Sugano K, Kakizoe T: **Genetic alterations in bladder cancer and their clinical applications in molecular tumor staging**. *Nat Clin Pract Urol* 2006, **3**(12):642-652.
85. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: **Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification**. *J Clin Oncol* 2006, **24**(35):5552-5564.
86. Knowles MA: **Tumor suppressor loci in bladder cancer**. *Front Biosci* 2007, **12**:2233-2251.

87. Mitra AP, Cote RJ: **Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer**. *Annu Rev Pathol* 2009, **4**:251-285.
88. Rothman N, Hayes RB, Zenser TV, DeMarini DM, Bi W, Hirvonen A, Talaska G, Bhatnagar VK, Caporaso NE, Brooks LR *et al*: **The glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null genotype and benzidine-associated bladder cancer, urine mutagenicity, and exfoliated urothelial cell DNA adducts**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, **5**(12):979-983.
89. Mitra AP, Lin H, Datar RH, Cote RJ: **Molecular biology of bladder cancer: prognostic and clinical implications**. *Clin Genitourin Cancer* 2006, **5**(1):67-77.
90. Marcus PM, Vineis P, Rothman N: **NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population**. *Pharmacogenetics* 2000, **10**(2):115-122.
91. McNeil N, Ried T: **Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine**. *Expert Rev Mol Med* 2000, **2000**:1-14.
92. Knowles MA: **Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?** *Carcinogenesis* 2006, **27**(3):361-373.
93. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Pairon JC, Jaurand MC *et al*: **FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder**. *Cancer Res* 2003, **63**(23):8108-8112.
94. Rieger-Christ KM, Mourtzinos A, Lee PJ, Zagha RM, Cain J, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC: **Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection**. *Cancer* 2003, **98**(4):737-744.
95. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jobsis AC, Zwarthoff EC: **FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma**. *Cancer Res* 2004, **64**(6):1911-1914.
96. Shariat SF, Lotan Y, Vickers A, Karakiewicz PI, Schmitz-Drager BJ, Goebell PJ, Malats N: **Statistical consideration for clinical biomarker research in bladder cancer**. *Urol Oncol*, **28**(4):389-400.
97. George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA *et al*: **p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer**. *J Clin Oncol* 2007, **25**(34):5352-5358.
98. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW: **Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis**. *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**(21):1603-1612.
99. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL: **Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer**. *Cancer Res* 1995, **55**(3):510-513.
100. O'Brien TS, Harris AL: **Angiogenesis in urological malignancy**. *Br J Urol* 1995, **76**(6):675-682.
101. O'Brien TS, Fox SB, Dickinson AJ, Turley H, Westwood M, Moghaddam A, Gatter KC, Bicknell R, Harris AL: **Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers**. *Cancer Res* 1996, **56**(20):4799-4804.
102. Johnson DE, Williams LT: **Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family**. *Adv Cancer Res* 1993, **60**:1-41.
103. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F: **Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas**. *Nat Genet* 1999, **23**(1):18-20.
104. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC *et al*: **Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors**. *Am J Pathol* 2001, **158**(6):1955-1959.

105. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amoros A, Tardon A, Carrato A, Serra C, Malats N, Real FX: **Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas**. *J Clin Oncol* 2006, **24**(22):3664-3671.
106. Lamy A, Gobet F, Laurent M, Blanchard F, Varin C, Moulin C, Andreou A, Frebourg T, Pfister C: **Molecular profiling of bladder tumors based on the detection of FGFR3 and TP53 mutations**. *J Urol* 2006, **176**(6 Pt 1):2686-2689.
107. van Rhijn BW, Montironi R, Zwarthoff EC, Jobsis AC, van der Kwast TH: **Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma**. *J Pathol* 2002, **198**(2):245-251.
108. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA: **FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer**. *J Pathol* 2007, **213**(1):91-98.
109. Gomez-Roman JJ, Saenz P, Molina M, Cuevas Gonzalez J, Escuredo K, Santa Cruz S, Junquera C, Simon L, Martinez A, Gutierrez Banos JL *et al*: **Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(2 Pt 1):459-465.
110. Martinez-Torrecuadrada J, Cifuentes G, Lopez-Serra P, Saenz P, Martinez A, Casal JI: **Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(17):6280-6290.
111. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC: **The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate**. *Cancer Res* 2001, **61**(4):1265-1268.
112. Lipponen P, Eskelinen M: **Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis**. *Br J Cancer* 1994, **69**(6):1120-1125.
113. Ravery V, Colombel M, Popov Z, Bastuji S, Patard JJ, Bellot J, Abbou CC, Fradet Y, Chopin DK: **Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer**. *Br J Cancer* 1995, **71**(1):196-200.
114. Oxford G, Theodorescu D: **The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression**. *J Urol* 2003, **170**(5):1987-1993.
115. Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC *et al*: **Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients**. *Clin Cancer Res* 2004, **10**(22):7457-7465.
116. Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG: **Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma**. *Cancer Res* 2001, **61**(18):6688-6692.
117. Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW: **Methylational urinalysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls**. *Oncogene* 2006, **25**(13):1984-1988.
118. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M *et al*: **Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma**. *J Clin Oncol* 2005, **23**(13):2903-2910.
119. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A *et al*: **Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features**. *Cancer Res* 2001, **61**(24):8659-8663.
120. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM *et al*: **Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients**. *Clin Cancer Res* 2002, **8**(2):464-470.

121. Dunn KL, Espino PS, Drobic B, He S, Davie JR: **The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling**. *Biochem Cell Biol* 2005, **83**(1):1-14.
122. Sears RC, Nevins JR: **Signaling networks that link cell proliferation and cell fate**. *J Biol Chem* 2002, **277**(14):11617-11620.
123. Kerkhoff E, Houben R, Loffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR: **Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling**. *Oncogene* 1998, **16**(2):211-216.
124. Kerkhoff E, Rapp UR: **Cell cycle targets of Ras/Raf signalling**. *Oncogene* 1998, **17**(11 Reviews):1457-1462.
125. Lipponen PK: **Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer**. *J Pathol* 1995, **175**(2):203-210.
126. Masters JR, Vesey SG, Munn CF, Evan GI, Watson JV: **c-myc oncoprotein levels in bladder cancer**. *Urol Res* 1988, **16**(5):341-344.
127. Cote RJ, Chatterjee SJ: **Molecular determinants of outcome in bladder cancer**. *Cancer J Sci Am* 1999, **5**(1):2-15.
128. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD: **Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53**. *Cell* 1992, **70**(6):923-935.
129. Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA: **Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens**. *Cancer Res* 1994, **54**(11):2914-2918.
130. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones PA, Skinner DG *et al*: **Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer**. *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**(14):1072-1079.
131. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ: **The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop**. *Genes Dev* 1993, **7**(7A):1126-1132.
132. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG: **ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways**. *Cell* 1998, **92**(6):725-734.
133. Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, Nakagawa M: **p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer**. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **339**(3):790-796.
134. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR: **The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein**. *Cell* 1991, **65**(6):1053-1061.
135. Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y, Kubota Y: **Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer**. *Br J Cancer* 1995, **71**(4):831-835.
136. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR *et al*: **Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53**. *Cancer Res* 1998, **58**(6):1090-1094.
137. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardon A, Serra C, Real FX: **PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors**. *Cancer Res* 2006, **66**(15):7401-7404.
138. Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA: **Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer**. *Clin Cancer Res* 2009, **15**(19):6008-6017.
139. Hurst CD, Zuiverloon TC, Hafner C, Zwarthoff EC, Knowles MA: **A SNaPshot assay for the rapid and simple detection of four common hotspot codon mutations in the PIK3CA gene**. *BMC Res Notes* 2009, **2**:66.
140. Adachi H, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Shigeno K, Hino O: **Human bladder tumors with 2-hit mutations of tumor suppressor gene TSC1 and decreased expression of p27**. *J Urol* 2003, **170**(2 Pt 1):601-604.

141. Hornigold N, Devlin J, Davies AM, Aveyard JS, Habuchi T, Knowles MA: **Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer**. *Oncogene* 1999, **18**(16):2657-2661.
142. Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA: **Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci**. *Oncogene* 1995, **11**(8):1671-1674.
143. Knowles MA, Habuchi T, Kennedy W, Cuthbert-Heavens D: **Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder**. *Cancer Res* 2003, **63**(22):7652-7656.
144. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S *et al*: **A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer**. *Nature* 2007, **448**(7152):439-444.
145. Askham JM, Platt F, Chambers PA, Snowden H, Taylor CF, Knowles MA: **AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K**. *Oncogene*, **29**(1):150-155.
146. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA: **Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma**. *Br J Cancer* 1999, **80**(5-6):904-908.
147. Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH, Katz RL: **Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer**. *Oncogene* 1998, **16**(7):909-913.
148. Gildea JJ, Herlevsen M, Harding MA, Gulding KM, Moskaluk CA, Frierson HF, Theodorescu D: **PTEN can inhibit in vitro organotypic and in vivo orthotopic invasion of human bladder cancer cells even in the absence of its lipid phosphatase activity**. *Oncogene* 2004, **23**(40):6788-6797.
149. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: **Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma**. *N Engl J Med* 1991, **324**(1):1-8.
150. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL: **Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer**. *Cancer Res* 1997, **57**(23):5281-5285.
151. Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G, Bittard H: **Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer**. *J Urol* 2001, **166**(4):1275-1279.
152. Brown NS, Jones A, Fujiyama C, Harris AL, Bicknell R: **Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors**. *Cancer Res* 2000, **60**(22):6298-6302.
153. Nutt JE, Mellon JK, Qureshi K, Lunec J: **Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours**. *Br J Cancer* 1998, **78**(2):215-220.
154. Elkin M, Ariel I, Miao HQ, Nagler A, Pines M, de-Groot N, Hochberg A, Vlodavsky I: **Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone**. *Cancer Res* 1999, **59**(16):4111-4118.
155. Vaishampayan U: **Systemic therapy of advanced urothelial cancer**. *Curr Treat Options Oncol* 2009, **10**(3-4):256-266.
156. Wallerand H, Robert G, Bernhard JC, Ravaud A, Ferriere JM: **[Targeted therapy for locally advanced and/or metastatic bladder cancer]**. *Prog Urol* 2008, **18**(7):407-417.
157. Lerner SP: **Bladder cancer clinical trials**. *Urol Oncol* 2005, **23**(4):275-279.
158. Galsky MD: **The role of taxanes in the management of bladder cancer**. *Oncologist* 2005, **10**(10):792-798.
159. Stravopodis DJ, Margaritis LH, Voutsinas GE: **Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex**. *Curr Med Chem* 2007, **14**(29):3122-3138.

160. Winquist E, Kirchner TS, Segal R, Chin J, Lukka H: **Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis**. *J Urol* 2004, **171**(2 Pt 1):561-569.
161. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG: **p53 and treatment of bladder cancer**. *Nature* 1997, **385**(6612):123-125.
162. Carter CA, Chen C, Brink C, Vincent P, Maxuitenko YY, Gilbert KS, Waud WR, Zhang X: **Sorafenib is efficacious and tolerated in combination with cytotoxic or cytostatic agents in preclinical models of human non-small cell lung carcinoma**. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007, **59**(2):183-195.
163. Nutt JE, Lazarowicz HP, Mellon JK, Lunec J: **Gefitinib ('Iressa', ZD1839) inhibits the growth response of bladder tumour cell lines to epidermal growth factor and induces TIMP2**. *Br J Cancer* 2004, **90**(8):1679-1685.
164. Lindsey H: **Bevacizumab and erlotinib show promise for kidney cancer**. *Lancet Oncol* 2006, **7**(1):15.
165. Inoue K, Slaton JW, Perrotte P, Davis DW, Bruns CJ, Hicklin DJ, McConkey DJ, Sweeney P, Radinsky R, Dinney CP: **Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma**. *Clin Cancer Res* 2000, **6**(12):4874-4884.
166. Sachs MD, Ramamurthy M, Poel H, Wickham TJ, Lamfers M, Gerritsen W, Chowdhury W, Li Y, Schoenberg MP, Rodriguez R: **Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the coxsackie adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells**. *Cancer Gene Ther* 2004, **11**(7):477-486.
167. Demma MJ, Wong S, Maxwell E, Dasmahapatra B: **CP-31398 restores DNA-binding activity to mutant p53 in vitro but does not affect p53 homologs p63 and p73**. *J Biol Chem* 2004, **279**(44):45887-45896.
168. Senderowicz AM: **Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms**. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003, **52 Suppl 1**:S61-73.
169. Senderowicz AM: **Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials**. *Cancer Biol Ther* 2003, **2**(4 Suppl 1):S84-95.
170. Du Z, Hou S: **The anti-angiogenic activity of human endostatin inhibits bladder cancer growth and its mechanism**. *J Urol* 2003, **170**(5):2000-2003.
171. Mizuarai S, Irie H, Schmatz DM, Kotani H: **Integrated genomic and pharmacological approaches to identify synthetic lethal genes as cancer therapeutic targets**. *Curr Mol Med* 2008, **8**(8):774-783.
172. Weinstein IB, Begemann M, Zhou P, Han EK, Sgambato A, Doki Y, Arber N, Ciaparrone M, Yamamoto H: **Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy**. *Clin Cancer Res* 1997, **3**(12 Pt 2):2696-2702.
173. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N *et al*: **The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers**. *Science* 2006, **314**(5797):268-274.
174. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C *et al*: **Patterns of somatic mutation in human cancer genomes**. *Nature* 2007, **446**(7132):153-158.
175. Weinstein IB: **Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis**. *Carcinogenesis* 2000, **21**(5):857-864.
176. Weinstein IB: **Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer**. *Science* 2002, **297**(5578):63-64.
177. Weinstein IB, Joe A: **Oncogene addiction**. *Cancer Res* 2008, **68**(9):3077-3080; discussion 3080.
178. Weinstein IB, Joe AK: **Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy**. *Nat Clin Pract Oncol* 2006, **3**(8):448-457.

179. Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, Classon M, Haber DA, Settleman J: **A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes**. *Cancer Cell* 2006, **10**(5):425-435.
180. Ritossa F: **Discovery of the heat shock response**. *Cell Stress Chaperones* 1996, **1**(2):97-98.
181. Frydman J: **Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones**. *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:603-647.
182. Whitesell L, Lindquist SL: **HSP90 and the chaperoning of cancer**. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(10):761-772.
183. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR: **Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis**. *Trends Biochem Sci* 2006, **31**(3):164-172.
184. Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA: **Molecular chaperones and protein kinase quality control**. *Trends Cell Biol* 2007, **17**(2):87-92.
185. Buchner J: **Hsp90 & Co. - a holding for folding**. *Trends Biochem Sci* 1999, **24**(4):136-141.
186. Picard D: **Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation**. *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**(10):1640-1648.
187. Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ: **Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation**. *Trends Mol Med* 2004, **10**(6):283-290.
188. Lindquist S, Craig EA: **The heat-shock proteins**. *Annu Rev Genet* 1988, **22**:631-677.
189. Kimmins S, MacRae TH: **Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins**. *Cell Stress Chaperones* 2000, **5**(2):76-86.
190. Young JC, Moarefi I, Hartl FU: **Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool**. *J Cell Biol* 2001, **154**(2):267-273.
191. Pearl LH, Prodromou C: **Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery**. *Annu Rev Biochem* 2006, **75**:271-294.
192. Terasawa K, Minami M, Minami Y: **Constantly updated knowledge of Hsp90**. *J Biochem* 2005, **137**(4):443-447.
193. Pearl LH, Prodromou C: **Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone**. *Adv Protein Chem* 2001, **59**:157-186.
194. Chiosis G, Neckers L: **Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive**. *ACS Chem Biol* 2006, **1**(5):279-284.
195. Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Thanasopoulou A, Aravantinos G, Margaritis LH, Anastasiadou E, Voutsinas GE: **Thymidylate synthase inhibition induces p53-dependent and p53-independent apoptotic responses in human urinary bladder cancer cells**. *J Cancer Res Clin Oncol*.
196. Pearl LH, Prodromou C: **Structure and in vivo function of Hsp90**. *Curr Opin Struct Biol* 2000, **10**(1):46-51.
197. Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH: **Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex**. *Nature* 2006, **440**(7087):1013-1017.
198. Neckers L: **Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents**. *Trends Mol Med* 2002, **8**(4 Suppl):S55-61.
199. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone**. *Cell* 1997, **90**(1):65-75.
200. Prodromou C, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: **A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone**. *Nat Struct Biol* 1997, **4**(6):477-482.
201. Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo**. *Embo J* 1998, **17**(16):4829-4836.
202. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU: **In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis**. *J Cell Biol* 1998, **143**(4):901-910.

203. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP: **Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent**. *Cell* 1997, **89**(2):239-250.
204. Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K: **Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein**. *Eur J Biochem* 1995, **233**(1):1-8.
205. Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM: **The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone**. *J Biol Chem* 2000, **275**(47):37181-37186.
206. Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, Gergely P, Jr., Soti C, Mihaly K, Somogyi J: **ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90)**. *J Biol Chem* 1993, **268**(3):1901-1907.
207. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: **The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains**. *Embo J* 2000, **19**(16):4383-4392.
208. Powers MV, Workman P: **Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors**. *Endocr Relat Cancer* 2006, **13 Suppl 1**:S125-135.
209. Powers MV, Workman P: **Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology**. *FEBS Lett* 2007, **581**(19):3758-3769.
210. Biamonte MA, Van de Water R, Arndt JW, Scannevin RH, Perret D, Lee WC: **Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials**. *J Med Chem*, **53**(1):3-17.
211. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R *et al*: **Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1**. *Mol Cell* 2002, **10**(6):1307-1318.
212. Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C: **Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37**. *J Biol Chem* 2002, **277**(23):20151-20159.
213. Young JC, Obermann WM, Hartl FU: **Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90**. *J Biol Chem* 1998, **273**(29):18007-18010.
214. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I: **Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine**. *Cell* 2000, **101**(2):199-210.
215. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones**. *Embo J* 1999, **18**(3):754-762.
216. MacLean M, Picard D: **Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases**. *Cell Stress Chaperones* 2003, **8**(2):114-119.
217. Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW: **Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4**. *Genes Dev* 1996, **10**(12):1491-1502.
218. Grammatikakis N, Lin JH, Grammatikakis A, Tsichlis PN, Cochran BH: **p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function**. *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):1661-1672.
219. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH: **The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37)**. *Cell* 2004, **116**(1):87-98.
220. Hartson SD, Irwin AD, Shao J, Scroggins BT, Volk L, Huang W, Matts RL: **p50(cdc37) is a nonexclusive Hsp90 cohort which participates intimately in Hsp90-mediated folding of immature kinase molecules**. *Biochemistry* 2000, **39**(25):7631-7644.
221. Lee P, Shabbir A, Cardozo C, Caplan AJ: **Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase**. *Mol Biol Cell* 2004, **15**(4):1785-1792.

222. Pearl LH: **Hsp90 and Cdc37 -- a chaperone cancer conspiracy**. *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**(1):55-61.
223. Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Mark Roe S, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH: **Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery**. *Embo J* 2004, **23**(3):511-519.
224. Grenert JP, Johnson BD, Toft DO: **The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes**. *J Biol Chem* 1999, **274**(25):17525-17533.
225. Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO: **The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex**. *J Biol Chem* 2002, **277**(41):38294-38304.
226. Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J: **Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle**. *J Biol Chem* 2003, **278**(12):10328-10333.
227. Grad I, Picard D: **The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones**. *Mol Cell Endocrinol* 2007, **275**(1-2):2-12.
228. Neckers L: **Heat shock protein 90: the cancer chaperone**. *J Biosci* 2007, **32**(3):517-530.
229. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U *et al*: **Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene**. *Science* 1985, **230**(4730):1132-1139.
230. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E: **HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer**. *Ann Oncol* 2001, **12 Suppl 1**:S15-19.
231. Citri A, Gan J, Mosesson Y, Vereb G, Szollosi J, Yarden Y: **Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation**. *EMBO Rep* 2004, **5**(12):1165-1170.
232. Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y: **The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention**. *Cell Cycle* 2004, **3**(1):51-60.
233. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL *et al*: **International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors**. *Pharmacol Rev* 2006, **58**(4):782-797.
234. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE: **Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women**. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**(19):1406-1415.
235. Attard G, Kitzen J, Blagden SP, Fong PC, Pronk LC, Zhi J, Zugmaier G, Verweij J, de Bono JS, de Jonge M: **A phase Ib study of pertuzumab, a recombinant humanised antibody to HER2, and docetaxel in patients with advanced solid tumours**. *Br J Cancer* 2007, **97**(10):1338-1343.
236. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ *et al*: **Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer**. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**(16):1127-1135.
237. Staal SP, Hartley JW, Rowe WP: **Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(7):3065-3067.
238. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR *et al*: **Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta**. *J Clin Invest* 2003, **112**(2):197-208.
239. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA: **Physiological functions of protein kinase B/Akt**. *Biochem Soc Trans* 2004, **32**(Pt 2):350-354.

240. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N: **Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2**. *Oncogene* 2002, **21**(8):1159-1166.
241. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N: **Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol**. *Cancer Res* 2003, **63**(9):2139-2144.
242. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W *et al*: **Mutations of the BRAF gene in human cancer**. *Nature* 2002, **417**(6892):949-954.
243. Garnett MJ, Marais R: **Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene**. *Cancer Cell* 2004, **6**(4):313-319.
244. Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M: **BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies**. *Cancer Cell* 2003, **4**(2):95-98.
245. Betticher DC, White GR, Vonlanthen S, Liu X, Kappeler A, Altermatt HJ, Thatcher N, Heighway J: **G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer**. *Int J Cancer* 1997, **74**(5):556-562.
246. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN: **Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas**. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998, **57**(2):122-130.
247. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW: **Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation**. *Mol Biol Cell* 1997, **8**(2):287-301.
248. Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A: **Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death**. *Embo J* 1996, **15**(1):46-54.
249. Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, Henglein B: **Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(24):11264-11268.
250. Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M, Asp J, Magagnoli G, Balladelli A, Bertoni F *et al*: **Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma**. *Int J Cancer* 1999, **84**(5):489-493.
251. Ito Y, Kobayashi T, Takeda T, Nakano Y, Tamaki Y, Komoike Y, Wakasugi E, Shin E, Takatsuka Y, Kikkawa N *et al*: **Expression of p16 and cyclin-dependent kinase 4 proteins in primary breast carcinomas**. *Oncology* 1997, **54**(6):508-515.
252. Merli M, Benassi MS, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Molendini L, Magagnoli G, Ferrari C, Maltarello MC, Picci P: **Expression of G1 phase regulators in MG-63 osteosarcoma cell line**. *Int J Oncol* 1999, **14**(6):1117-1121.
253. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R: **pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis**. *Oral Oncol* 1998, **34**(5):396-403.
254. Hacker H, Karin M: **Regulation and function of IKK and IKK-related kinases**. *Sci STKE* 2006, **2006**(357):re13.
255. Jacobs MD, Harrison SC: **Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex**. *Cell* 1998, **95**(6):749-758.
256. Karin M: **How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex**. *Oncogene* 1999, **18**(49):6867-6874.
257. Shen RR, Hahn WC: **Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer**. *Oncogene*, **30**(6):631-641.
258. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E *et al*: **Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias**. *N Engl J Med* 2006, **354**(24):2531-2541.
259. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C: **The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy**. *Ann Oncol* 2003, **14**(8):1169-1176.
260. May P, May E: **Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein**. *Oncogene* 1999, **18**(53):7621-7636.
261. Eizenberg O, Faber-Elman A, Gottlieb E, Oren M, Rotter V, Schwartz M: **p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells**. *Mol Cell Biol* 1996, **16**(9):5178-5185.

262. Gottlieb TM, Oren M: **p53 in growth control and neoplasia**. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1287**(2-3):77-102.
263. Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohen S, Neckers L: **Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(16):8379-8383.
264. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M: **Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins**. *Nature* 1986, **320**(6058):182-184.
265. Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jurgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Loning SA *et al*: **Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas**. *Cancer Res* 2001, **61**(13):5215-5222.
266. Harris AL: **Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth**. *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(1):38-47.
267. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis**. *Nature* 1999, **399**(6733):271-275.
268. Pratt WB, Toft DO: **Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003, **228**(2):111-133.
269. Maloney A, Workman P: **HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds**. *Expert Opin Biol Ther* 2002, **2**(1):3-24.
270. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C: **Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells**. *Int J Cancer* 1992, **51**(4):613-619.
271. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW: **Hsp90--from signal transduction to cell transformation**. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**(2):241-246.
272. Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D: **Hsp90: the vulnerable chaperone**. *Drug Discov Today* 2004, **9**(20):881-888.
273. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
274. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell*, **144**(5):646-674.
275. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF: **Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance**. *FEBS Lett* 2004, **562**(1-3):11-15.
276. Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N: **Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress**. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1113**:202-216.
277. Sharp S, Workman P: **Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status**. *Adv Cancer Res* 2006, **95**:323-348.
278. Xu W, Neckers L: **Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells**. *Clin Cancer Res* 2007, **13**(6):1625-1629.
279. Janin YL: **Heat shock protein 90 inhibitors. A text book example of medicinal chemistry?** *J Med Chem* 2005, **48**(24):7503-7512.
280. Blagg BS, Kerr TD: **Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation**. *Med Res Rev* 2006, **26**(3):310-338.
281. DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH: **Geldanamycin, a new antibiotic**. *J Antibiot (Tokyo)* 1970, **23**(9):442-447.
282. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E *et al*: **The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation**. *J Biol Chem* 1997, **272**(38):23843-23850.

283. Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: **Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin**. *J Med Chem* 1999, **42**(2):260-266.
284. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ: **A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors**. *Nature* 2003, **425**(6956):407-410.
285. Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L: **Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent**. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995, **36**(4):305-315.
286. Dikalov SI, Rumyantseva GV, Piskunov AV, Weiner LM: **Role of quinone-iron(III) interaction in NADPH-dependent enzymatic generation of hydroxyl radicals**. *Biochemistry* 1992, **31**(37):8947-8953.
287. Dikalov S, Landmesser U, Harrison DG: **Geldanamycin leads to superoxide formation by enzymatic and non-enzymatic redox cycling. Implications for studies of Hsp90 and endothelial cell nitric-oxide synthase**. *J Biol Chem* 2002, **277**(28):25480-25485.
288. Zhang H, Burrows F: **Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90**. *J Mol Med* 2004, **82**(8):488-499.
289. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA: **Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis**. *Cancer Res* 2001, **61**(10):4003-4009.
290. Williams CR, Tabios R, Linehan WM, Neckers L: **Intratumor injection of the Hsp90 inhibitor 17AAG decreases tumor growth and induces apoptosis in a prostate cancer xenograft model**. *J Urol* 2007, **178**(4 Pt 1):1528-1532.
291. Workman P: **Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone**. *Cancer Lett* 2004, **206**(2):149-157.
292. Egorin MJ, Lagattuta TF, Hamburger DR, Covey JM, White KD, Musser SM, Eiseman JL: **Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats**. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002, **49**(1):7-19.
293. Kelland LR, Sharp SY, Rogers PM, Myers TG, Workman P: **DT-Diaphorase expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90**. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(22):1940-1949.
294. Sydor JR, Normant E, Pien CS, Porter JR, Ge J, Grenier L, Pak RH, Ali JA, Dembski MS, Hudak J *et al*: **Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(46):17408-17413.
295. Isaacs JS, Xu W, Neckers L: **Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics**. *Cancer Cell* 2003, **3**(3):213-217.
296. Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Voutsinas GE: **17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells**. *BMC Cancer*, **10**:481.
297. Hayflick L, Moorhead PS: **The serial cultivation of human diploid cell strains**. *Exp Cell Res* 1961, **25**:585-621.
298. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**:263-273.
299. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. *Science* 1985, **230**(4732):1350-1354.

300. Weinberg RA: **The retinoblastoma protein and cell cycle control**. *Cell* 1995, **81**(3):323-330.
301. Sherr CJ, Roberts JM: **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression**. *Genes Dev* 1999, **13**(12):1501-1512.
302. DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR: **Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(14):7245-7250.
303. Nicholson DW: **Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death**. *Cell Death Differ* 1999, **6**(11):1028-1042.
304. Green D, Kroemer G: **The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?** *Trends Cell Biol* 1998, **8**(7):267-271.
305. Green DR, Amarante-Mendes GP: **The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death**. *Results Probl Cell Differ* 1998, **24**:45-61.
306. Salvesen GS, Dixit VM: **Caspases: intracellular signaling by proteolysis**. *Cell* 1997, **91**(4):443-446.
307. Kundrat L, Regan L: **Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP**. *J Mol Biol*, **395**(3):587-594.
308. Morales JL, Perdew GH: **Carboxyl terminus of hsc70-interacting protein (CHIP) can remodel mature aryl hydrocarbon receptor (AhR) complexes and mediate ubiquitination of both the AhR and the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in vitro**. *Biochemistry* 2007, **46**(2):610-621.
309. Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C: **CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation**. *J Biol Chem* 2001, **276**(46):42938-42944.
310. Giustiniani J, Daire V, Cantaloube I, Durand G, Pous C, Perdiz D, Baillet A: **Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53**. *Cell Signal* 2009, **21**(4):529-539.
311. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsichlis P, Rosen N: **Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function**. *J Biol Chem* 2002, **277**(42):39858-39866.
312. Nicholson KM, Anderson NG: **The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy**. *Cell Signal* 2002, **14**(5):381-395.
313. Testa JR, Tsichlis PN: **AKT signaling in normal and malignant cells**. *Oncogene* 2005, **24**(50):7391-7393.
314. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A: **Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation**. *Trends Biochem Sci* 2005, **30**(1):43-52.
315. Xiao G, Rabson AB, Young W, Qing G, Qu Z: **Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease**. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**(4):281-293.
316. Karin M: **Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression**. *Nature* 2006, **441**(7092):431-436.
317. Huang H, Tindall DJ: **FOXO factors: a matter of life and death**. *Future Oncol* 2006, **2**(1):83-89.
318. Lam EW, Francis RE, Petkovic M: **FOXO transcription factors: key regulators of cell fate**. *Biochem Soc Trans* 2006, **34**(Pt 5):722-726.
319. Liu Y, Lehmann M: **FOXO-independent suppression of programmed cell death by the PI3K/Akt signaling pathway in Drosophila**. *Dev Genes Evol* 2006, **216**(9):531-535.
320. Rubinfeld H, Seger R: **The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling**. *Mol Biotechnol* 2005, **31**(2):151-174.
321. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW: **Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma**. *Clin Cancer Res* 2006, **12**(7 Pt 2):2371s-2375s.

322. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y: **The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells**. *J Exp Med* 2006, **203**(7):1651-1656.
323. Dormond-Meuwly A, Roulin D, Dufour M, Benoit M, Demartines N, Dormond O: **The inhibition of MAPK potentiates the anti-angiogenic efficacy of mTOR inhibitors**. *Biochem Biophys Res Commun*, **407**(4):714-719.
324. Park WH: **MAPK inhibitors differentially affect gallic acid-induced human pulmonary fibroblast cell growth inhibition**. *Mol Med Report*, **4**(1):193-104.
325. Roy SK, Srivastava RK, Shankar S: **Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer**. *J Mol Signal*, **5**:10.
326. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS, Brugge JS: **Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338**. *Curr Biol* 2000, **10**(9):551-554.
327. Benvenuti S, Comoglio PM: **The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis**. *J Cell Physiol* 2007, **213**(2):316-325.
328. Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM: **The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met**. *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9):720-724.
329. Lallemand D, Arpin M: **Moesin/ezrin: a specific role in cell metastasis?** *Pigment Cell Melanoma Res*, **23**(1):6-7.
330. Hu L, Lau SH, Tzang CH, Wen JM, Wang W, Xie D, Huang M, Wang Y, Wu MC, Huang JF *et al*: **Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis**. *Oncogene* 2004, **23**(1):298-302.
331. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J: **Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients**. *Radiother Oncol*.
332. Pan Y, Han J, Zhang Y, Li XJ: **[Role of vimentin in tumor metastasis and drug research]**. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **41**(6):413-416.
333. Wei J, Xu G, Wu M, Zhang Y, Li Q, Liu P, Zhu T, Song A, Zhao L, Han Z *et al*: **Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation**. *Anticancer Res* 2008, **28**(1A):327-334.
334. Cormio L, Tolve I, Annese P, Saracino A, Zamparese R, Sanguedolce F, Bufo P, Battaglia M, Selvaggi FP, Carrieri G: **Altered p53 and pRb expression is predictive of response to BCG treatment in T1G3 bladder cancer**. *Anticancer Res* 2009, **29**(10):4201-4204.
335. Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, Alavi-Tafreshi M, Shi SR, Fung YK, Jones PA, Cordon-Cardo C, Datar RH, Cote RJ: **Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer**. *J Pathol* 2004, **203**(3):762-770.
336. Majeski AE, Dice JF: **Mechanisms of chaperone-mediated autophagy**. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(12):2435-2444.
337. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM: **Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy**. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(12):2420-2434.
338. Dice JF: **Chaperone-mediated autophagy**. *Autophagy* 2007, **3**(4):295-299.
339. Kaushik S, Cuervo AM: **Chaperone-mediated autophagy**. *Methods Mol Biol* 2008, **445**:227-244.
340. Li W, Yang Q, Mao Z: **Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences**. *Cell Mol Life Sci*, **68**(5):749-763.
341. McDonough H, Patterson C: **CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems**. *Cell Stress Chaperones* 2003, **8**(4):303-308.
342. Sato S, Fujita N, Tsuruo T: **Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(20):10832-10837.
343. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J: **Cell migration in tumors**. *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**(5):559-564.

344. Yang J, Weinberg RA: **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis**. *Dev Cell* 2008, **14**(6):818-829.
345. Machesky LM, Cooper JA: **Cell motility. Bare bones of the cytoskeleton**. *Nature* 1999, **401**(6753):542-543.
346. Olson MF, Sahai E: **The actin cytoskeleton in cancer cell motility**. *Clin Exp Metastasis* 2009, **26**(4):273-287.
347. Small JV, Kaverina I, Krylyshkina O, Rottner K: **Cytoskeleton cross-talk during cell motility**. *FEBS Lett* 1999, **452**(1-2):96-99.
348. Janke C, Kneussel M: **Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton**. *Trends Neurosci*, **33**(8):362-372.
349. Drake PJ, Griffiths GJ, Shaw L, Benson RP, Corfe BM: **Application of high-content analysis to the study of post-translational modifications of the cytoskeleton**. *J Proteome Res* 2009, **8**(1):28-34.
350. Carraway KL, Carraway CA: **Signaling, mitogenesis and the cytoskeleton: where the action is**. *Bioessays* 1995, **17**(2):171-175.
351. Gardiner J, Overall R, Marc J: **The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling**. *Synapse*, **65**(3):249-256.
352. Janmey PA: **The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling**. *Physiol Rev* 1998, **78**(3):763-781.
353. Kutay U, Stournaras C: **Nuclear dynamics and cytoskeleton signaling**. *FEBS Lett* 2008, **582**(14):1935-1936.
354. Kyozuka K, Chun JT, Puppo A, Gragnaniello G, Garante E, Santella L: **Actin cytoskeleton modulates calcium signaling during maturation of starfish oocytes**. *Dev Biol* 2008, **320**(2):426-435.
355. Nagashima H, Okada M, Hidai C, Hosoda S, Kasanuki H, Kawana M: **The role of cadherin-catenin-cytoskeleton complex in angiogenesis: antisense oligonucleotide of plakoglobin promotes angiogenesis in vitro, and protein kinase C (PKC) enhances angiogenesis through the plakoglobin signaling pathway**. *Heart Vessels* 1997, **Suppl 12**:110-112.
356. Niggli V, Rossy J: **Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton**. *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(3):344-349.
357. Black MM, Keyser P: **Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor**. *J Neurosci* 1987, **7**(6):1833-1842.
358. Bulinski JC, Richards JE, Piperno G: **Posttranslational modifications of alpha tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells**. *J Cell Biol* 1988, **106**(4):1213-1220.
359. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, Laguesse S, Cornez I, Rahmouni S, Ormenese S *et al*: **Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin**. *Cell* 2009, **136**(3):551-564.
360. Gardiner J, Barton D, Marc J, Overall R: **Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia**. *Traffic* 2007, **8**(9):1145-1149.
361. Geiger RC, Kaufman CD, Lam AP, Budinger GR, Dean DA: **Tubulin acetylation and histone deacetylase 6 activity in the lung under cyclic load**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, **40**(1):76-82.
362. Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL: **The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules**. *J Cell Biol* 1986, **103**(2):571-579.
363. Palazzo A, Ackerman B, Gundersen GG: **Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility**. *Nature* 2003, **421**(6920):230.
364. Shea TB, Beermann ML, Nixon RA: **Post-translational modification of alpha-tubulin by acetylation and detyrosination in NB2a/d1 neuroblastoma cells**. *Brain Res Dev Brain Res* 1990, **51**(2):195-204.

365. Bobrowska A, Paganetti P, Matthias P, Bates GP: **Hdac6 Knock-Out Increases Tubulin Acetylation but Does Not Modify Disease Progression in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease**. *PLoS One*, **6**(6):e20696.
366. Catalano MG, Poli R, Pugliese M, Fortunati N, Boccuzzi G: **Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines**. *Endocr Relat Cancer* 2007, **14**(3):839-845.
367. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F: **Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation**. *J Neurosci* 2007, **27**(13):3571-3583.
368. Ryhanen T, Viiri J, Hyttinen JM, Uusitalo H, Salminen A, Kaarniranta K: **Influence of Hsp90 and HDAC inhibition and tubulin acetylation on perinuclear protein aggregation in human retinal pigment epithelial cells**. *J Biomed Biotechnol*, **2011**:798052.
369. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH, Garrido C, Yao TP, Vourc'h C, Matthias P *et al*: **HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates**. *Genes Dev* 2007, **21**(17):2172-2181.
370. Brush MH, Guardiola A, Connor JH, Yao TP, Shenolikar S: **Deactylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases**. *J Biol Chem* 2004, **279**(9):7685-7691.
371. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP: **HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase**. *Nature* 2002, **417**(6887):455-458.
372. Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M *et al*: **Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer**. *Oncogene* 2005, **24**(28):4531-4539.
373. Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F: **HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization**. *Immunity* 2004, **20**(4):417-428.
374. Tran AD, Marmo TP, Salam AA, Che S, Finkelstein E, Kabarriti R, Xenias HS, Mazitschek R, Hubbert C, Kawaguchi Y *et al*: **HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions**. *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 8):1469-1479.
375. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR *et al*: **HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin**. *Mol Cell* 2007, **27**(2):197-213.
376. Neckers L, Ivy SP: **Heat shock protein 90**. *Curr Opin Oncol* 2003, **15**(6):419-424.
377. Sherman M, Multhoff G: **Heat shock proteins in cancer**. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1113**:192-201.
378. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L: **Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer**. *Nat Rev Cancer*, **10**(8):537-549.
379. Burrows F, Zhang H, Kamal A: **Hsp90 activation and cell cycle regulation**. *Cell Cycle* 2004, **3**(12):1530-1536.
380. Proctor I, Stoeber K, Williams GH: **Biomarkers in bladder cancer**. *Histopathology*, **57**(1):1-13.
381. Okamoto J, Mikami I, Tominaga Y, Kuchenbecker KM, Lin YC, Bravo DT, Clement G, Yagui-Beltran A, Ray MR, Koizumi K *et al*: **Inhibition of Hsp90 leads to cell cycle arrest and apoptosis in human malignant pleural mesothelioma**. *J Thorac Oncol* 2008, **3**(10):1089-1095.
382. Byun JY, Kim MJ, Yoon CH, Cha H, Yoon G, Lee SJ: **Oncogenic Ras signals through activation of both phosphoinositide 3-kinase and Rac1 to induce c-Jun NH2-terminal kinase-mediated, caspase-independent cell death**. *Mol Cancer Res* 2009, **7**(9):1534-1542.
383. Mediavilla-Varela M, Pacheco FJ, Almaguel F, Perez J, Sahakian E, Daniels TR, Leoh LS, Padilla A, Wall NR, Lilly MB *et al*: **Docetaxel-induced prostate cancer cell**

death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75. *Mol Cancer* 2009, **8**(1):68.

384. Garcia-Morales P, Carrasco-Garcia E, Ruiz-Rico P, Martinez-Mira R, Menendez-Gutierrez MP, Ferragut JA, Saceda M, Martinez-Lacaci I: **Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines**. *Oncogene* 2007, **26**(51):7185-7193.
385. Cardillo MR, Sale P, Di Silverio F: **Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer**. *Anticancer Res* 2000, **20**(6B):4579-4583.
386. Lebret T, Watson RW, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H: **Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma**. *Cancer* 2003, **98**(5):970-977.
387. Lebret T, Watson RW, Molinie V, Poulain JE, O'Neill A, Fitzpatrick JM, Botto H: **HSP90 expression: a new predictive factor for BCG response in stage Ta-T1 grade 3 bladder tumours**. *Eur Urol* 2007, **51**(1):161-166; discussion 166-167.
388. Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ: **Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses**. *Int J Oncol* 2009, **35**(2):401-416.
389. Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Lampidonis AD, Anastasiou D, Kachrilas S, Messini-Nikolaki N, Papassideri IS, Aravantinos G *et al*: **Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines**. *Int J Oncol* 2009, **34**(1):137-160.
390. Clarke PA, Hostein I, Banerji U, Stefano FD, Maloney A, Walton M, Judson I, Workman P: **Gene expression profiling of human colon cancer cells following inhibition of signal transduction by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of the hsp90 molecular chaperone**. *Oncogene* 2000, **19**(36):4125-4133.
391. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C: **Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism**. *Cancer Res* 2006, **66**(22):10967-10975.
392. Orenstein SJ, Cuervo AM: **Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance**. *Semin Cell Dev Biol*, **21**(7):719-726.
393. Beck R, Verrax J, Gonze T, Zappone M, Pedrosa RC, Taper H, Feron O, Calderon PB: **Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death**. *Biochem Pharmacol* 2009, **77**(3):375-383.
394. Shen SC, Yang LY, Lin HY, Wu CY, Su TH, Chen YC: **Reactive oxygen species-dependent HSP90 protein cleavage participates in arsenical As(+3)- and MMA(+3)-induced apoptosis through inhibition of telomerase activity via JNK activation**. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **229**(2):239-251.
395. Fan M, Park A, Nephew KP: **CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor-alpha**. *Mol Endocrinol* 2005, **19**(12):2901-2914.
396. McClellan AJ, Scott MD, Frydman J: **Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways**. *Cell* 2005, **121**(5):739-748.
397. Hovelmann S, Beckers TL, Schmidt M: **Molecular alterations in apoptotic pathways after PKB/Akt-mediated chemoresistance in NCI H460 cells**. *Br J Cancer* 2004, **90**(12):2370-2377.
398. Brader S, Eccles SA: **Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis**. *Tumori* 2004, **90**(1):2-8.
399. Gazitt Y, Kolaparthi V, Moncada K, Thomas C, Freeman J: **Targeted therapy of human osteosarcoma with 17AAG or rapamycin: characterization of induced apoptosis and inhibition of mTOR and Akt/MAPK/Wnt pathways**. *Int J Oncol* 2009, **34**(2):551-561.

400. Lang SA, Klein D, Moser C, Gaumann A, Glockzin G, Dahlke MH, Dietmaier W, Bolder U, Schlitt HJ, Geissler EK *et al*: **Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo**. *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(3):1123-1132.
401. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A: **Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death**. *Clin Cancer Res* 2006, **12**(2):584-590.
402. Jia W, Yu C, Rahmani M, Krystal G, Sausville EA, Dent P, Grant S: **Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways**. *Blood* 2003, **102**(5):1824-1832.
403. Xie Q, Gao CF, Shinomiya N, Sausville E, Hay R, Gustafson M, Shen Y, Wenkert D, Vande Woude GF: **Geldanamycins exquisitely inhibit HGF/SF-mediated tumor cell invasion**. *Oncogene* 2005, **24**(23):3697-3707.
404. Wang S, Pashtan I, Tsutsumi S, Xu W, Neckers L: **Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors**. *Cell Cycle* 2009, **8**(13):2050-2056.
405. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P *et al*: **Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors**. *J Biol Chem* 2005, **280**(29):26729-26734.
406. Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Fu C, Sakamoto KM: **Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation**. *Cancer Res* 2008, **68**(8):2557-2560.
407. Simms-Waldrip T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, Fu C, Sakamoto KM: **The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies**. *Mol Genet Metab* 2008, **94**(3):283-286.
408. Jez JM, Chen JC, Rastelli G, Stroud RM, Santi DV: **Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90**. *Chem Biol* 2003, **10**(4):361-368.
409. Ramanathan RK, Egorin MJ, Erlichman C, Remick SC, Ramalingam SS, Naret C, Holleran JL, TenEyck CJ, Ivy SP, Belani CP: **Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors**. *J Clin Oncol*, **28**(9):1520-1526.
410. Solit DB, Osman I, Polsky D, Panageas KS, Daud A, Goydos JS, Teitcher J, Wolchok JD, Germino FJ, Krown SE *et al*: **Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma**. *Clin Cancer Res* 2008, **14**(24):8302-8307.
411. Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R, Ma W, Wheler J, Rosen N, Norton L *et al*: **Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study**. *J Clin Oncol* 2007, **25**(34):5410-5417.
412. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Alsina M, Albitar M, Berman D, Messina M, Mitsiades CS, Anderson KC: **Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study**. *Br J Haematol*, **150**(4):438-445.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

7. Περίληψη διδακτορικής διατριβής

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα νεοπλασματική ασθένεια του ουροποιητικού συστήματος, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 5% του συνόλου των κακοηθειών παγκοσμίως (6% στους άνδρες και 3% στις γυναίκες), ενώ παράλληλα ευθύνεται για περίπου 4% των θανάτων που προκαλούνται από καρκίνο, σε ετήσια βάση. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Heat shock protein 90, Hsp90) αποτελεί μια μοριακή συνοδό, η οποία διατηρεί τη δομική ακεραιότητα και λειτουργική ενεργότητα των πολυάριθμων πρωτεϊνών-«πελατών» της, οι οποίοι εμπλέκονται σε όλες τις παραμέτρους της κυτταρικής φυσιολογίας. Επιπλέον, η Hsp90 συνδέεται με την έναρξη και την προώθηση της καρκινικής εξαλλαγής. Οι ανσαμυκίνες τύπου βενζοκινόνης (benzoquinone ansamycins, BA) αποτελούν μια ομάδα αντιβιοτικών παραγόντων, οι οποίοι στοχεύουν επιλεκτικά την Hsp90. Εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα και συγγένεια σύνδεσης για την αμινοτελική περιοχή της μοριακής συνοδού, καταστέλλοντας την ενδογενή ενεργότητα ΑΤΡάσης που φέρει αυτή. Ο λειτουργικός ακρωτηριασμός της Hsp90 έχει δειχθεί πως δεν επιτρέπει την απόκτηση της φυσιολογικής, τρισδιάστατης στερεοδιάταξης των πρωτεϊνών-«πελατών» της, γεγονός που οδηγεί στην αποικοδόμηση των εν λόγω πρωτεϊνικών μορίων μέσω πρωτεασώματος και λυσοσώματος, καθώς και στον τελικό περιορισμό της ογκογονικής ενεργότητάς τους.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η αντι-νεοπλασματική επίδραση συγκεκριμένων μελών της οικογένειας των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινης ουροδόχου κύστης RT4 (βαθμού κακοήθειας I), RT112 (βαθμού κακοήθειας I-II), T24 (βαθμού κακοήθειας III) και TCCSUP (βαθμού κακοήθειας IV). Τα αντιβιοτικά ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η τζελνταναμυκίνη και τα ημισυνθετικά, χημικά ανάλογά της, 17-AAG (17-αλλυλάμινο-17-διμεθοξυτζελνταναμυκίνη) και 17-DMAG (17-διμεθυλαμινοαιθυλαμινο-17-διμεθοξυτζελνταναμυκίνη). Οι μοριακοί χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν για

την ανάλυση της επίδρασης των συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε *in vitro* καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης περιελάμβαναν: εξειδικευμένες αντιδράσεις κυτταρομετρίας ροής (FACS), δοκιμασίες προσδιορισμού κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT), αναλύσεις πρωτεΐνών με ανοσοστυπώματα Western, ημι-ποσοτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (RT-PCR), δοκιμασίες μεταβολής ηλεκτροφορητικής ικανότητας λόγω πρόσδεσης (EMSA), ανοσοκυτταροχημεία και παρατήρηση κάτω από συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser, δοκιμασίες επούλωσης ανοιχτής πληγής, δοκιμασίες προσδιορισμού λυσοσωμικής ενεργότητας και ολική πρωτεωμική ανάλυση.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν την ισχυρή κυτταροστατική δράση των ανσαμυκινών στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των RT4, RT112, T24 και TCCSUP κυτταρικών σειρών, με συσσώρευση των κυττάρων στη G1 και τη G2 φάση της κυτταρικής διαίρεσης σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκίνης, η οποία συνοδεύτηκε με δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, όπως η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1, η κυκλίνη D1 και η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 4 (Cdk4).

Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης της τζελνταναμυκίνης και των ημισυνθετικών αναλόγων της, στις κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες MTT σε χρονικά διαστήματα 24- και 48- ωρών, οι οποίες αποκάλυψαν ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας, σε απόκριση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανσαμυκίνης. Το πρότυπο μείωσης της κυτταρικής επιβίωσης επέδειξε κυτταρο-ειδικό (cell-type specific) μοτίβο, με τις καρκινικές σειρές υψηλής κακοήθειας να εμφανίζονται λιγότερο ανθεκτικές στην κυτταροτοξική επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Στη συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών και στοχεύοντας την επεξήγηση των βιολογικών μηχανισμών που οδήγησαν στην μείωση της βιωσιμότητας,

μελετήθηκε η ενεργοποίηση μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση και η αυτοφαγία. Με αναλύσεις ανοσοστυπώματος Western, δείχθηκε η δοσο-εξαρτώμενη μειορύθμιση των πρόδρομων κασπασών, η οποία συνδυάστηκε με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση και την παραγωγή των πρωτεολυτικών θραυσμάτων τους (κασπάσες -8, -9 και -3), οδηγώντας στην επακόλουθη ανάπτυξη αποπτωτικού φαινοτύπου. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την ανίχνευση της ισχυρής πρωτεολυτικής επεξεργασίας των ομοειδών υποστρωμάτων των κασπασών, των λαμινών A/C και του πυρηνικού αντιγόνου PARP. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία και η πρωτεόλυση μέσω λυσοσωμάτων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στη δομική ακεραιότητα της Hsp90 και της συν-συνοδού πρωτεΐνης Hsp70, για όλες τις κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης. Με αναλύσεις ανοσοστυπώματος Western, δείχθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, η ανάπτυξη ενός δοσο-εξαρτώμενου και κυτταρο-ειδικού προτύπου αυξομείωσης των επιπέδων της Hsp90, το οποίο αναδεικνύει την μειωμένη ικανότητα της Hsp90 να εκπληρώσει το ρόλο της ως μοριακής συνοδού, κάτω από την επίδραση ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης. Το μοτίβο της μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp90 συνοδεύτηκε από την ταυτόχρονη παραγωγή ενός προϊόντος κατακερματισμού με μοριακό βάρος ~65 kDa. Επιπλέον, η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδήγησε στην επακόλουθη, αντιρροπιστική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Hsp70 σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

Κάτω από την επίδραση ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, μια ποικιλία πρωτεϊνών-«πελατών» της Hsp90, κατά κύριο λόγο κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες, επέδειξαν ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορύθμισης σε όλες τις κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης που εξετάστηκαν. Μέλη του σηματοδοτικού άξονα IGF-IR/Akt/IKK, όπως ο υποδοχέας IFG-IR, η κινάση Akt, οι κινάσες IKKα και IKKβ παρουσίασαν ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μείωση τόσο των συνολικών, όσο και των ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών τους

επιπέδων, σε απόκριση αυξανόμενων δόσεων του εκάστοτε παράγοντα. Η ισχυρή ανάσχεση της Akt σηματοδότησης οδήγησε στην αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας μιας ομάδας γονιδίων που συνδέονται με την επιβίωση και την αύξηση των καρκινικών κυττάρων (IAP's). Η λειτουργική μειορύθμιση της Akt σηματοδότησης επαληθεύτηκε περαιτέρω με τη βοήθεια συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser και δοκιμασιών EMSA. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραματικών διατάξεων κατέδειξαν την ισχυρή φαρμακο-επαγόμενη απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, λόγω μεταβολής της υποκυτταρικής τοπολογίας του, με τον εγκλωβισμό του στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 στην υποκυτταρική συμπεριφορά των FOXO μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίο αποτελούν μια ομάδα κατωρροϊκών στόχων της Akt σηματοδότησης που εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου. Όπως παρουσιάστηκε εδώ, η φαρμακο-επαγόμενη αναστολή της Hsp90 οδήγησε στη λειτουργική ανάσχεση της FOXO σηματοδότησης, αναδεικνύοντας ένα πρότυπο απο-φωσφορυλίωσής τους, που οδηγεί στην μεταφορά τους εντός πυρήνα και την επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών γονιδίων-«στόχων». Σε συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης στο Ras-Raf-MEK-Erk σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο βρίσκεται σε διασύνδεση (cross-talk) με τον άξονα σηματοδότησης του υποδοχέα IGF-I. Τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται εδώ καταδεικνύουν την ισχυρή ανασταλτική επίδραση των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης στην MAPK σηματοδότηση, η οποία συνοδεύεται από σημαντική μειορύθμιση των επιπέδων των ενεργών Erk1/2 κινασών, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, προωθώντας την μειορύθμιση πολλαπλών κατωρροϊκών-«στόχων», οι οποίοι εμπλέκονται κυρίως στην κυτταρική επιβίωση και την ανάπτυξη.

Σε συνέχεια της αποκάλυψης της επίδρασης των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης στον κυτταρικό κύκλο, τη βιωσιμότητα και την υποκυτταρική σηματοδότηση, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ανασταλτικής επίδρασης της συγκεκριμένης κατηγορίας στην κυτταρική

πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν την ισχυρή αναστολή της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας, σε συνδυασμό με την ανάσχεση της c-Met ογκογονικής σηματοδότησης, καθώς και το μοριακό «πάγωμα» μελών του κυτταροσκελετού (π.χ. α-τουμπουλίνη και ακτίνη), λόγω ενδεχόμενης αναστολής κρίσιμων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεών τους, όπως η ακετυλίωση λόγω αναστολής της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC6.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης στο ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των καρκινικών κυττάρων υψηλής κακοήθειας T24, με την χρήση πρωτεωμικής ανάλυσης, μέσω ηλεκτροφόρησης δύο (2) διαστάσεων και ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων με φασματογράφο μάζας, καθώς και ανοσοστυπώματα Western. Τα πειραματικά αποτελέσματα αποκάλυψαν τον πολυδιάστατο, κρίσιμο ρόλο της Hsp90 στην κυτταρική φυσιολογία, καθώς η λειτουργική αναστολή της ανέδειξε πολλαπλασιαστικές επιπτώσεις σε όλο το φάσμα του πρωτεώματος (proteome-wide ripple effect).

Συνοπτικά, στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής:

- Αναδείχθηκαν οι μηχανισμοί απόκρισης των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης στην επίδραση των αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης. Παρουσιάστηκαν πειραματικά δεδομένα που κατέδειξαν την επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης αναστολής της Hsp90 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας και γενετικού υποβάθρου (π.χ. γενετικού τόπου *p53*). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική σύγκριση της δράσης των τριών (3) συγκεκριμένων αντιβιοτικών ανσαμυκίνης τύπου βενζοκινόνης (τζελνταναμυκίνη, 17-AAG και 17-DMAG) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης διαφορετικού βαθμού κακοήθειας.
- Αποκαλύφθηκε η πολυδιάστατη επίδραση της φαρμακο-επαγόμενης Hsp90 αναστολής σε ολόκληρο το φάσμα της κυτταρικής φυσιολογίας, με την αναστολή πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, που οδηγούν σε καταστολή όλων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του καρκίνου

παράγοντες, η έλλειψη ευαισθησίας σε σήματα που αναστέλλουν την αύξηση, η αποφυγή των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), η ανάπτυξη μηχανισμών διήθησης και μετάστασης, η προώθηση της αγγειογένεσης κ.λπ.

- Πραγματοποιήθηκε η αποκάλυψη και αξιολόγηση νέων βιολογικών δεικτών [π.χ. phospho-Akt (Ser473), phospho-IGF-IR (Tyr1131), phospho-Rb, c-Met, phospho-c-Met (Tyr1234/Tyr1235), phospho-FOXO3 (Thr32), phospho-FOXO3 (Thr24) και *Bok*], οι οποίοι φέρουν πιθανή προ-κλινική αξία, καθώς δύναται να χρησιμοποιηθούν στη σταδιοποίηση, την πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης σε ασθενείς που πάσχουν από κακοήθειες της ουροδόχου κύστης.
- Παρουσιάστηκαν πειραματικά στοιχεία τα οποία αντικατοπτρίζουν την υψηλή θεραπευτική αξία και την ενδεχόμενη κλινική σπουδαιότητα των ανσαμυκινών τύπου βενζοκινόνης, καθώς φέρουν ισχυρό «δυναμικό» αντιμετώπισης των κακοηθειών της ουροδόχου κύστης, αναστρέφοντας όλα τα κρίσιμα ογκογονικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων νεοπλαστικών κυττάρων, αναδεικνύοντας τον πιθανό κεντρικό ρόλο τους στη σύγχρονη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, και ενδεχομένως άλλων τύπων ανθρώπινης νεοπλασματικής εξαλλαγής.

7.1 SUMMARY

Bladder cancer is ranked second among neoplastic diseases of the urinary tract, accounting for more than 5% of all malignancies worldwide (6% in men and 3% in women), while it is responsible for more than 4% of the total number of cancer-related deaths, on a yearly basis. Hsp90 is a molecular chaperone, maintaining the structural and functional integrity of its multiple protein-clients that participate in all the diverse aspects of cellular physiology. Moreover, it has been implicated in the initiation and progression of oncogenesis. Benzoquinone ansamycins are a group of antibiotics that specifically target Hsp90. They present high affinity for the amino-terminal (NH_2-) sequence of the molecular chaperone, thus repressing its intrinsic ATPase activity. Hsp90 functional amputation has been shown to result in abnormal folding of its various protein-clients, a fact that leads to proteasomal and lysosomal degradation with final containment of their oncogenic properties.

In the context of this *PhD* thesis, we have investigated the anti-oncogenic properties of specific members of the benzoquinone ansamycin family of antibiotics in human bladder cancer cell lines RT4 (grade I), RT112 (grade I-II), T24 (grade III) and TCCSUP (grade IV). The benzoquinone ansamycins used herein were geldanamycin and its chemically engineered analogues 17-AAG (17-alylamino-17-demethoxygeldanamycin) and 17-DMAG (17-dimethylamino-ethylamino-17demethoxygeldanamycin). The molecular techniques used in order to assess the biological effects of ansamycins on bladder cancer cell cultures *in vitro* were: Fluorescence activated cell sorting (FACS) experiments, MTT tests, Western blotting, semi-quantitative RT-PCRs, electrophoretic mobility shift assays (EMSA), immunofluorescence and confocal microscopy, scratch wound assays, autophagy detection and 2DGE (2 dimensional gel electrophoresis), followed by proteomic analysis.

In this thesis, we have first studied the effect of increasing concentrations of ansamycins on cell cycle progression of human bladder cancer cell lines. The experimental data presented herein display a prominent

cell cycle arrest at both the G1 and G2 checkpoints (G1/S and G2/M block) in RT4, RT112, T24 and TCCSUP cell lines, in response to increasing concentrations of benzoquinone ansamycins, accompanied by a dose-dependent downregulation of several molecules involved in cell-cycle control, such as the retinoblastoma protein (pRb), E2F1 transcription factor, cyclin D1 and cyclin dependent kinase 4 (Cdk4).

Furthermore, we have examined the existence of a probable cytotoxic effect of geldanamycin and its analogues in bladder cancer cell lines. MTT assays were performed at 24- and 48-hour intervals, displaying a prominent dose-dependent decrease of cell viability in response to increasing concentrations of each agent. The general profile of cell survival reduction followed a cell-type specific pattern, with highly malignant and aggressive cell lines showing a more prominent vulnerability to the cytotoxic effect of the ansamycins used herein. In our effort to unravel the mechanisms underlying the reduction in cell viability, we have studied the ansamycin-induced activation of programmed cell death cascades, such as apoptosis and autophagy. Using a Western blot approach, we have evinced a severe downregulation of precursor caspase protein levels, combined with dose-dependent increase in proteolytic cleavage products of all the caspases tested (caspase-8, -9, -3), followed by induction of a clear apoptotic phenotype. The latter was also certified by the detection of strong cleavage processing of the critical caspase repertoire substrates Lamin A/C and PARP. In addition, we have detected the activation of alternative cell death cascades, such as autophagy and lysosome-mediated proteolysis.

Following to the above, the effects of benzoquinone ansamycins on Hsp90 and co-chaperone Hsp70 structural integrities have been determined by Western immunoblotting, in all the human bladder cancer cell lines examined. As presented herein, Hsp90 protein levels displayed an intriguing cell-type specific and dose-dependent pattern of response, which we have assigned to a putative enhanced inability of Hsp90 in fulfilling its chaperone duties, due to the action of the benzoquinone ansamycins. This pattern was accompanied by the generation of a proteolytic cleavage fragment, with a

molecular weight of ~65 kDa, which could also well have a dominant negative effect on the chaperone functionality. Furthermore, drug-induced Hsp90 inhibition was found to be accompanied by a concomitant counterbalancing induction of total Hsp70 protein levels, in all cell lines tested.

Upon exposure to benzoquinone ansamycins, a variety of Hsp90 protein clients, mainly kinases and transcription factors, have been proved to be notably downregulated in bladder cancer cells. In response to the drugs, members of the IGF-IR signaling axis, such as IGF-IR, Akt, IKKα and IKKβ kinases, demonstrated a prominent dose-dependent reduction of both total and activated protein levels. Severe disruption of Akt signaling was found to lead to transcriptional repression of a group of genes linked to cancer cell survival and proliferation (i.e. the IAP's). Functional downregulation of the Akt signaling cascade was verified by immunofluorescence assays followed by confocal microscopy. These assays have revealed a significant drug-induced NF-κB inactivation, due to sequestration and compartmentalization of the factor into the cytoplasm. In addition, we have examined the behavior of the Forkhead family of transcription factors (Forkhead box O, FOXO), a critical group of Akt downstream targets tightly associated with cell death inhibition signaling. As presented herein, Hsp90 drug-induced inhibition lead to the functional impairment of FOXO signaling, strongly suggesting the induction of a dephosphorylation-mediated nuclear sequestration, with subsequent activation of critical pro-apoptotic genes. Furthermore, we have investigated the effect of benzoquinone ansamycins on the Ras-Raf-MEK-Erk pathway, which is known to cross-talk with the IGF-IR axis. The experimental evidence presented herein suggests that benzoquinone ansamycins induce a prominent inhibitory effect on MAPK signaling, characterized by severe dose-dependent reduction of active Erk1/2, in all the cell lines examined, therefore promoting downregulation of a variety of downstream targets, mainly involved in cell proliferation and survival.

Following investigation of the effects of Hsp90 inhibition on cell cycle progression, survival and signaling, we have analyzed the impact of the Hsp90 inhibitory effect of benzoquinone ansamycins on bladder cancer cell

motility. Our experimental results undoubtedly demonstrated a prominent impairment of malignant bladder cancer cell motility, combined with strong reduction of c-Met tumorigenic signaling potential and molecular "freezing" of members of the cytoskeleton network (i.e. α-tubulin and actin), likely through blockage of essential post-translational modifications, such as acetylation, due to HDAC6 downregulation.

Finally, we have studied the effect of benzoquinone ansamycins on the total protein content of malignant bladder cancer cells (T24), using proteomic analysis (two-dimensional gel electrophoresis, mass spectroscopy, Western blotting). The experimental data presented herein have underlined the "hubby" and multidimensional critical role of Hsp90 in cellular physiology, as its functional impairment was found to lead to a diverse series of sub-cellular defects, in a proteome-wide ripple effect fashion.

To summarize, the experimental data presented in the context of this *PhD* thesis:

- Revealed the diverse response mechanisms of human urinary bladder cancer cells due to the inhibitory effect of benzoquinone ansamycins. The experimental data that we have presented herein display the effects of drug-induced Hsp90 inhibition in human urinary bladder cancer cell lines of various malignancy grade and genetic background (i.e. *p53* status). Furthermore, we have showed a comparative study of the anti-neoplastic potential of all three (3) benzoquinone ansamycins examined (geldanamycin, 17-AAG and 17-DMAG), against human urinary bladder cancer cells.
- Unveiled the multidimensional effect of Hsp90 inhibition on cellular physiology by suppressing various signaling pathways, leading to prominent disruption of the hallmark traits of cancer, such as self-sufficiency to growth signals, evasion of apoptosis, insensitivity to anti-growth signals, sustained angiogenesis, invasion and metastasis.
- Revealed the existence of significant biomarkers in human urinary bladder cancer [i.e. phospho-Akt (Ser473), phospho-IGF-IR (Tyr1131), phospho-Rb, c-Met, phospho-c-Met (Tyr1234/Tyr1235), phospho-

FOXO3 (Thr32), phospho-FOXO3 (Thr24) and *Bok*], that could prove to hold a prominent role in bladder cancer staging, prognosis and selection of effective therapeutic approaches.

- Suggested the prominent therapeutic value and clinical importance of benzoquinone ansamycins, as they have proved to carry promising pre-clinical "battling" capacity against human urinary bladder cancer, reversing critical tumorigenic characteristics of human neoplastic cells.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

8. Παράρτημα

8.1 Δημοσιεύσεις εργασιών

Τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελούν αντικείμενο δημοσιεύσεων σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E.** "17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells". *BMC Cancer*. 2010 Sep 9; 10:481.
- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Konstantakou E.G., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E.** "Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cells" (in preparation).
- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Velentzas A.D. and Voutsinas G.E.** "17-DMAG induces heat shock protein 90 functional impairment in human urinary bladder cancer cells; taking out pathological hallmark traits of malignancy" (in preparation).
- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Konstantakou E.G., Anastasiadou E., Tsangaris G.Th. and Voutsinas G.E.** "The ripple effect paradigm: a proteome-wide approach of Hsp90 inhibition in human urinary bladder cancer cells" (in preparation).

8.2 Συμμετοχή σε συνέδρια

8.2.1 Εθνικά συνέδρια

- **Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Κωνσταντάκου Ε.Γ., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε.** «Η 17-AAG επάγει αναστολή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης λόγω μειορύθμισης πολλαπλών «πελατών» της Hsp90 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Akt». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31^{ο} Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα 2009 (Πρακτικά συνεδρίου σελ. 124-125).
- **Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε.** «Αναστολή πολλαπλών σηματοδοτικών μηχανισμών από το 17-AAG σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης». Συνεδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα (2009).

8.2.2 Διεθνή συνέδρια

- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Konstantakou E.G., Melachroinou S., Anastasiou D., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E**. "Hsp90 drug targeting in bladder cancer cells". 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki (2009).
- **Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E.** "Pharmacological targeting of Hsp90 molecular chaperone in human urinary bladder cancer cells". 1st International Conference on Molecular Cancer Research, Athens, Greece (2009).

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells

Panagiotis K Karkoulis[1], Dimitrios J Stravopodis[2], Lukas H Margaritis[2], Gerassimos E Voutsinas[1,3*]

Abstract

Background: 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), a benzoquinone ansamycin antibiotic, specifically targets heat shock protein 90 (Hsp90) and interferes with its function as a molecular chaperone that maintains the structural and functional integrity of various protein clients involved in cellular signaling. In this study, we have investigated the effect of 17-AAG on the regulation of Hsp90-dependent signaling pathways directly implicated in cell cycle progression, survival and motility of human urinary bladder cancer cell lines.

Methods: We have used MTT-based assays, FACS analysis, Western blotting, semi-quantitative RT-PCR, immunocytochemistry and scratch-wound assay in RT4, RT112 and T24 human urinary bladder cancer cell lines.

Results: We have demonstrated that, upon 17-AAG treatment, bladder cancer cells are arrested in the G1 phase of the cell cycle and eventually undergo apoptotic cell death in a dose-dependent manner. Furthermore, 17-AAG administration was shown to induce a pronounced downregulation of multiple Hsp90 protein clients and other downstream effectors, such as IGF-IR, Akt, IKK-α, IKK-β, FOXO1, ERK1/2 and c-Met, resulting in sequestration-mediated inactivation of NF-κB, reduced cell proliferation and decline of cell motility.

Conclusions: In total, we have clearly evinced a dose-dependent and cell type-specific effect of 17-AAG on cell cycle progression, survival and motility of human bladder cancer cells, due to downregulation of multiple Hsp90 clients and subsequent disruption of signaling integrity.

Background

Urinary bladder cancer is the fifth most common malignancy in the industrialized world and the second most frequent malignancy of the genitourinary tract, demonstrating high heterogeneity and differential response to clinical treatment [1,2]. Bladder cancer incidence, morbidity and mortality rates vary by genetic background, country, gender and age [3]. The most prevalent type of bladder cancer in the developed world is urothelial carcinoma (UC), representing over 90% of all bladder cancers, followed by squamous cell carcinoma (5%) and adenocarcinoma (2%) [4]. A high percentage of bladder cancer patients (20-30%) present with an aggressive muscle-invasive tumor of low differentiation, whereas the rest develop superficial, highly differentiated, non-invasive papillary tumors, 30% of which, nevertheless, are estimated to recur to invasive. Unfortunately, more than half of the patients with invasive tumors will develop distant metastases over a time period of two years [5], while the five-year survival rate for metastatic disease is as low as 6%. This apparent heterogeneity in bladder cancer is thought to be mainly due to discrete genetic alterations involved in tumor development and progression. Thus, since established systemic chemotherapy protocols for metastatic urothelial carcinoma are associated with significant toxicities, new clinical protocols designed for higher efficiency, while reducing the adverse side effects, are urgently needed.

* Correspondence: mvoutsin@bio.demokritos.gr
[1]Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", 15310 Athens, Greece
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2010 Karkoulis et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Relatively recently, heat shock protein 90 (Hsp90) has emerged as an important target in cancer therapy. Hsp90 normally accounts for approximately 1-2% of the total cytosolic protein content, while under stress conditions, its levels increase up to 4-6% of the whole proteomic load of the cell [6-8]. The Hsp90 chaperone activity relies on its transient NH_2-terminal dimerization, which facilitates its intrinsic ATPase activity [9]. The Hsp90 chaperone complex maintains the correct folding, cellular localization and activity of a broad range of protein clients that are implicated in various signal transduction pathways involved, among others, in cell proliferation, differentiation and survival [7,10]. There is evidence that Hsp90 is a major facilitator of cellular response to extracellular signals, particularly required for normal cell growth, proliferation and development [11]. On the other hand, over-expression and/or presence of mutations in a variety of Hsp90 protein clients during cancer initiation is associated with a requirement for increased Hsp90 levels in order to maintain the active conformations and thus functional integrities of these oncogenic molecules. In this frame, Hsp90 is a key molecule in the conformational maturation of several *bona fide* oncogenic signaling proteins, such as HER2/ErbB2, Akt, Met, Raf1, p53 and HIF-1α [10,12]. Therefore, due to the dependence of cancer cells upon specific Hsp90 oncogenic protein clients, inhibition of Hsp90 was shown to be able to negatively interfere with a number of important signaling pathways involved in cell development, proliferation, survival and motility, arousing significant interest in the field of cancer therapeutics [13].

Thus, a diverse group of molecules that target Hsp90 have been discovered or synthesized over the past several years. These include natural products, such as geldanamycin, radicicol and derivatives; synthetic purine-based inhibitors, such as PU3, PU24FCI and PU29FCI; and compounds that bind to Hsp90 on a secondary ATP-binding site, such as novobiocin and cisplatin [6]. The geldanamycin derivative 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) possesses an allylamino group at position 17 of the scaffold structure of geldanamycin [6]. Compared to the parental compound, 17-AAG demonstrates reduced toxicity, with enhanced biological activity and metabolic stability, retaining the Hsp90-related therapeutic characteristics. 17-AAG exerts its anti-tumor potency through its high affinity binding to the NH_2-terminal ATP-interacting domain of Hsp90, thus inhibiting its ability to form transient, active homodimers, and to consequently participate in chaperone-client complexes, with a subsequent hindering of client maturation and stabilization.

In this context, here, we have thoroughly studied the effects of Hsp90 inhibition by 17-AAG on the Hsp90-assisted signaling repertoire associated with cell cycle progression, apoptosis and motility in three human urinary bladder cancer cell lines of different malignancy grade, namely RT4 (grade I), RT112 (grade I-II) and T24 (grade III).

Methods

Drugs and reagents

17-AAG chemotherapeutic reagent was obtained from InvivoGen (San Diego, California, USA). Polyclonal and monoclonal antibodies against Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, PARP, Lamin A/C, phospho-Akt (Ser473), phospho-Akt (Thr308), Akt, phospho-IGF-IRβ (Tyr1131), IGF-IRα, FOXO, phospho-FOXO, phospho-IKKα/β (Ser180/Ser181), IKKα, IKKβ, phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204), p44/42, α-tubulin, phospho-c-Met (Tyr1234/Tyr1235), c-Met, CHIP and pan-actin were purchased from Cell Signaling Technology Inc. (Hertfordshire, UK), whereas antibodies against Hsp90α/β, Hsp70, Cdk4, pRb, E2F1 and NF-κB (p65) were supplied by Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA). Enhanced Chemilluminescence (ECL) Western blot detection reagents were obtained from GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Oligonucleotide primers were synthesized by Operon (California, USA). All other chemicals were of analytical grade from Sigma-Aldrich (Missouri, USA), Fluka (Hannover, Germany) and AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany).

Cell lines and culture conditions

The present study was performed on three human urinary bladder cancer cell lines, namely RT4, RT112 and T24, all originating from urothelial carcinomas. RT4 cells are derived from grade I tumor and were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK); RT112 cells are derived from a grade I→II tumor, whereas T24 cells are derived from a grade III tumor. RT112 and T24 cells were a generous gift from Professor J. R. Masters (Prostate Cancer Research Centre, Institute of Urology, University College London, UK). Cells were maintained in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated FBS, at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. All cell culture media and reagents were supplied by Biochrom AG (Berlin, Germany).

Cell viability assay

Urinary bladder cancer cells were seeded at a density of 15-20 × 10^3 per well into 48-well plates and treated with various drug concentrations for 24 h. The next day, cells were incubated in methylthiazole tetrazolium (MTT) solution. The spectrophotometric absorbance was measured in an ELISA microtiter plate reader (Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories, Virginia, USA) at 550 nm, using measurement at 630 nm as reference. Absorbance rates obtained by untreated cells

were considered as 100% cell survival. Each assay was repeated at least three times, using three wells per drug concentration in each experimental condition.

Cell cycle analysis

Bladder cancer cells were seeded at a density of approximately 5×10^5 in 100 mm plates and drug treatments of different concentrations of 17-AAG were applied for 24 h. Cells were collected, fixed in 1% methanol-free formaldehyde for 20 min and subsequently suspended in a 70% ethanol solution and stored at -20°C to dehydrate. Twenty four hours later, cells were suspended in 1 ml of 0.1% Triton X-100 solution and incubated in 500 μl of propidium iodide solution (50 μg/ml) containing 250 μg of DNase-free RNase A. Cells were analyzed with a Beckton Dickinson's FACScalibur (California, USA) at 542 nm and results were processed with the Modfit software program. Each assay was repeated three times.

Immunoblotting

Whole cell protein extracts were prepared as previously described [14]. Approximately 30 μg of total protein preparations were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subsequently electro-transferred overnight onto nitrocellulose membranes of 0.45 μm pore size (Schleicher and Schuell GmbH, Dassel, Germany). Membrane blocking was performed in TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5% non-fat dry milk (or 5% BSA grade V, where appropriate) and membranes were incubated with the appropriate antibodies at room temperature for 90 min, followed by an overnight incubation at 4°C. The next day, membranes were incubated with the suitable anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody and immunoreacting proteins were detected using an ECL Western blotting kit according to the manufacturer's instructions. All immunoblotting experiments were repeated three times.

RT-PCR analysis

Total RNA from both control and treated cells was extracted as previously described [14]. 1 μl of cDNA solution was amplified by PCR in a total volume of 25 μl, using cDNA-specific primers corresponding to the various mRNA species examined in the present study. Most gene-specific cDNA primer sequences and associated PCR information have been previously described [14,15], whereas additional genes amplified for the purpose of this study were: *Cyclin D1* (forward: 5′-GTGTCCTACTTCAAATGTGTGC-3′, reverse: 5′-GGAGTTGTCGGTGTAGATGC-3′, Ta: 57°C, 30 cycles), *Hsp90α* (forward: 5′-CCAAGATGCCTGAGGAAAC-3′, reverse: 5′-TCATACCGGATTTTGTCCAAT-3′ Ta: 53°C, 30 cycles) and *Hsp90β* (forward: 5′-TCCTTTTCTTTTCAAGATGCC-3′, reverse: 5′-TGTCCAACTTCGAAGGGTCT-3′, Ta: 54°C, 30 cycles). The obtained PCR fragments were resolved in 2% agarose gels, according to standard procedures. All RT-PCR experiments were repeated three times.

Immunofluorescence

T24 urinary bladder cancer cells were seeded on poly-L-lysine coated slides (Thermo Fisher Scientific Inc., Minnesota, USA) and treated with a 17-AAG concentration of 10 μM for 24 h. After treatment, slides were fixed with a paraformaldehyde solution (3% in 1 × PBS) for 15 min at room temperature. Cell permeabilization was achieved by administration of a Triton X-100 solution (0.5% in 1 × PBS) for 20 min. Subsequently, slides were blocked with a 1% BSA solution for 60 min and then incubated with an NF-κB anti-p65 antibody overnight at 4°C. The next day, slides were incubated with a FITC-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pennsylvania, USA), while nuclear staining of cells was obtained by incubation with propidium iodide solution (1 μg/ml in 1 × PBS containing RNase A). Finally, cells were observed under a Nikon EZ-C1 confocal microscope (Nikon Instruments Inc., Japan). Images taken were processed with the support of the Nikon EZ-C1 software program. Immunofluorescence experiments were repeated three times.

Scratch-wound assay

Human urinary bladder cancer cells were seeded at a density of 5×10^5 per 100 mm diameter Petri dish and incubated overnight. The day after, the surfaces of the dishes were mildly scratched with a sterile Pasteur pipette and images were taken under a Carl Zeiss Axiovert 25 (Thornwood New York, USA) inverted microscope with the use of a Cannon Powershot G9 digital camera and a PS-Remote software program. Then, cells were treated with a 10 μM 17-AAG solution and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Twenty four hours later, treated and untreated cells were observed under the inverted microscope at the scratch-wounded areas. Scratch-wound assays were repeated three times.

Results

17-AAG displays an inhibitory effect on cell cycle progression of human urinary bladder cancer cells. We have studied the effect of 24-hours 17-AAG treatment on the course of the cell cycle of RT4, RT112 and T24 human urinary bladder cancer cells using flow cytometry (Figure 1). As presented herein, RT4 cancer cells displayed a G1 arrest (from 54.5% in the control to 69.4% at 10 μM), while a G2-phase inhibition was also observed (from 14% in the control to 30.6% at 10 μM),

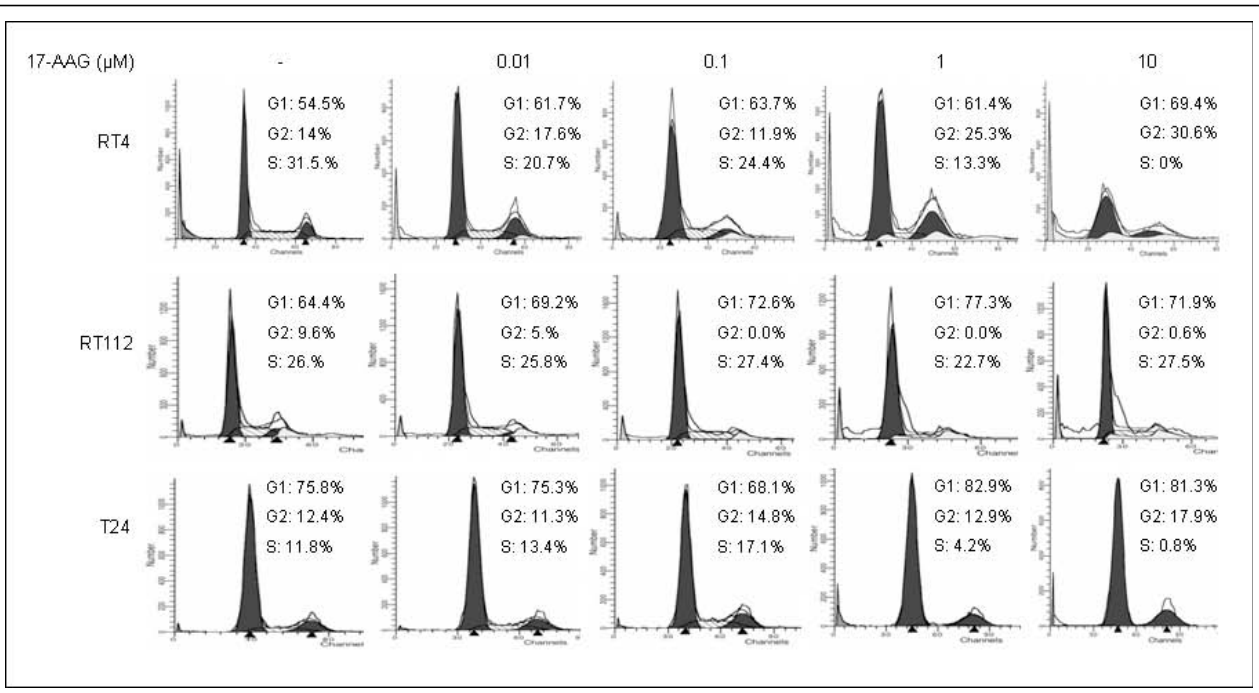


Figure 1 Cell cycle progression analysis of human bladder cancer cells treated with 17-AAG for 24 hours. Representative FACS analysis of RT4, RT112 and T24 bladder cancer cells and percentage of total cell content in distinct phases of the mitotic course are displayed. The cell cycle experiments were repeated three times.

both at higher concentrations of the drug. Upon treatment with 17-AAG, RT112 presented an increase in the percentage of cells accumulating in G1 phase (from 64.4% in the control reaching a peak value of 77.3% at the 1 μM dosage), accompanied by a possible S block, since the percentage of cells in the S phase remained practically unchanged (from 26% to 27.5%), whereas the number of cells in phase G2 was constantly decreasing (from 9.6% to 0%). Treatment of T24 cells with 17-AAG was able to induce a moderate G1 block (from 75.8% in the control to 81.3% at 10 μM), while it was also found to cause an additional mild arrest of the cell cycle in phase G2 (from 12.4% in the control to 17.9% at 10 μM).

In order to further illuminate the G1 block observed, we examined the effect of 17-AAG on Cyclin/Cyclin-dependent kinase (Cdk) complex components, which assist dividing cells to overcome the G1-phase checkpoint (Figure 2A). We have found that Cdk4 protein levels display a dose-dependent and cell type-specific decrease, with Cdk4 downregulation being more prominent in RT112 than RT4 cells, whereas in T24 this was kept to a minimum. A similar pattern of downregulation in all the cell lines was demonstrated when studying the expression levels of *Cyclin D1* mRNA, with T24 exposed to the higher drug dose manifesting the most severe response, hence suggesting a possible Cyclin D1 and Cdk4 involvement in the observed 17-AAG-induced G1 cell cycle block (Figure 2A). Furthermore, the expression and activation of other downstream significant modulators of cell cycle progression, such as pRb protein and its interacting partner transcription factor E2F1 were examined (Figure 2B). After treatment with 17-AAG, pRb protein levels were shown to display a dose-dependent downregulation in all three cell lines examined in this study. Interestingly, in RT4 cells pRb protein is not phosphorylated either in the control or after drug exposure, whereas phosphorylation in RT112 and T24 was found to decrease with increasing 17-AAG doses, in a cell type-specific manner. In relation to this, E2F1 protein levels also displayed a clear downregulation pattern in all three cell lines, rendering this transcription factor practically undetectable in the higher doses (1 and 10 μM), also suggesting a possible E2F1 involvement in the observed 17-AAG-induced G1 cell cycle block.

17-AAG manifests a cytotoxic effect on human bladder cancer cell lines. To assess the biological effect of 17-AAG on bladder cancer cell survival, we performed MTT assays on RT4, RT112 and T24 cells, incubated with increasing concentrations of the drug for 24 and 48 hours (Figures 3 and 4). All three cell lines showed a dose-dependent decrease in cell viability. It seems that RT112 cells are more sensitive than RT4 to the cytotoxic activity of 17-AAG after 24 hours of treatment,

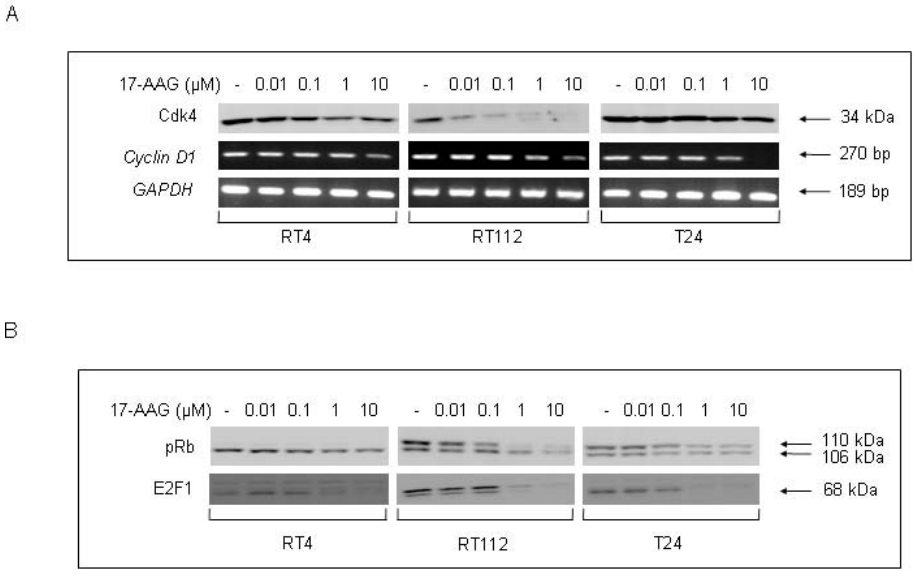


Figure 2 17-AAG-induced G1 cell cycle block is due to downregulation of specific Hsp90 clients. (A) Detection of Cdk4 protein (Western blotting) and *Cyclin D1* gene (RT-PCR), both critically implicated in the G1 to S phase transition, over a 24-hours treatment period of human bladder cancer cells with 17-AAG. The mRNA expression levels of the internal control gene *GAPDH* were also quantified by an RT-PCR approach. (B) Western blotting of the cell cycle regulatory proteins pRb and E2F1, after exposure of RT4, RT112 and T24 cells to different 17-AAG doses. Immunoblotting and RT-PCR experiments were repeated three times.

while T24 are slightly more resistant. Significant numbers of cells, alive but committed to apoptosis at 24 hours, were dead after 48-hours treatment, so the percentage in cell survival was dramatically decreased and almost equal in all three bladder cancer cell lines.

17-AAG induces activation of Caspase-dependent death processes in bladder cancer cells. 17-AAG-induced reduction of cell survival was found to be associated with proteolytic cleavage of critical members of the Caspase family (Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3) and characteristics of apoptotic death. Protein expression levels and activation of Caspase proteases are shown in Figure 5. The downregulation patterns of precursor Caspase protein levels were more pronounced in RT112 cells, combined with dose-dependent increases in proteolytic cleavage products of Caspase-8 (43, 41 and 18 kDa), Caspase-9 (37 and 35 kDa) and Caspase-3 (19 and 17 kDa). These data clearly demonstrate the ability of 17-AAG to induce Caspase-dependent death in all three bladder cancer cell lines studied here. This fact was

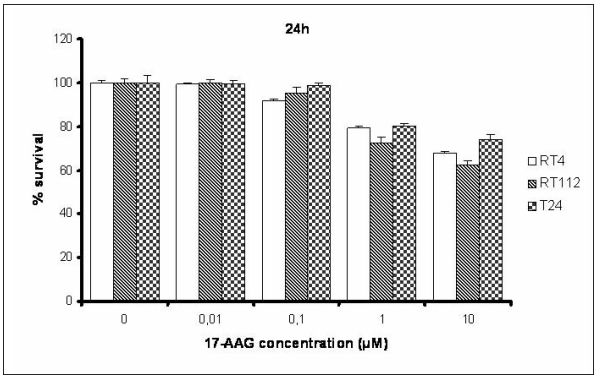


Figure 3 MTT cytotoxicity assays performed on RT4, RT112 and T24 bladder cancer cells, upon 24 hours of treatment with 17-AAG. All assays were implemented three times, while the obtained standard deviations (error bars) are depicted on the top of each value bar.

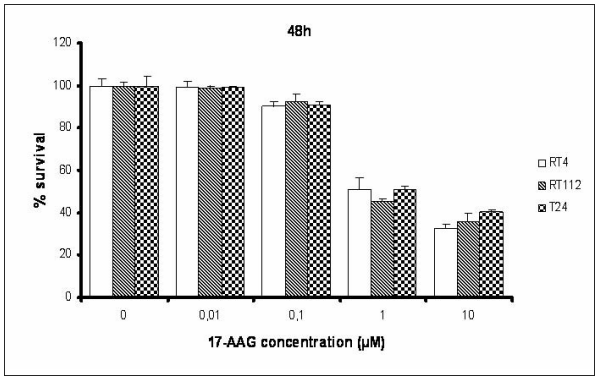


Figure 4 MTT cytotoxicity assays performed on RT4, RT112 and T24 bladder cancer cells, upon 48 hours of treatment with 17-AAG. All assays were implemented three times, while the obtained standard deviations (error bars) are depicted on the top of each value bar.

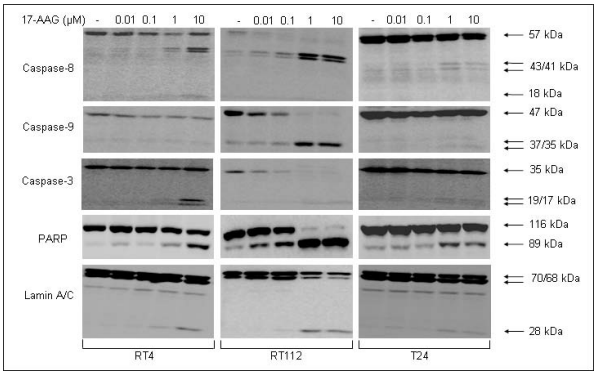


Figure 5 17-AAG activates Caspase-dependent death processes in bladder cancer cells. Apoptotic death induced by 17-AAG administration in human urinary bladder cancer cells was characterized by reduced expression and proteolytic cleavage profiles of apoptosis-related proteins, in response to various drug concentrations, for 24-hours exposure period. Treatment of RT4, RT112 and T24 cells with 17-AAG resulted in prominent cleavage and activation of critical members of the Caspase apoptotic machinery in all three cell lines, along with notable proteolytic processing of the Caspase repertoire characteristic substrates PARP and Lamin A/C. All apoptosis immunoblotting experiments were repeated three times.

further certified by the detection of intense cleavage of the Caspase repertoire substrates PARP and Lamin A/C upon administration of relatively high concentrations of 17-AAG (1 and 10 μM) in RT4, RT112 and T24 bladder cancer cell lines.

Exposure of human bladder cancer cells to 17-AAG results in downregulation of Hsp90. The effect of 17-AAG administration on Hsp90 and co-chaperone Hsp70 structural integrities in RT4, RT112 and T24 bladder cancer cells was examined by western immunoblotting (Figure 6A). In RT4 cells, 24 h incubation with 17-AAG resulted in a dose-dependent reduction of Hsp90 protein levels, up to the concentration of 1 μM. Intriguingly, at the highest dose of 10 μM, the levels of Hsp90 protein rose again significantly, disrupting the downregulation pattern, whereas an Hsp90 cleavage product with a molecular weight of approximately 65 kDa was generated. The same pattern of initial reduction (lower doses) and following increase (higher doses) of total Hsp90 protein levels was observed in RT112 cells as well, only this was found to occur at even lower doses. More specifically, RT112 cells displayed maximum Hsp90 downregulation at the dose of 0.1 μM 17-AAG, whereas a significant

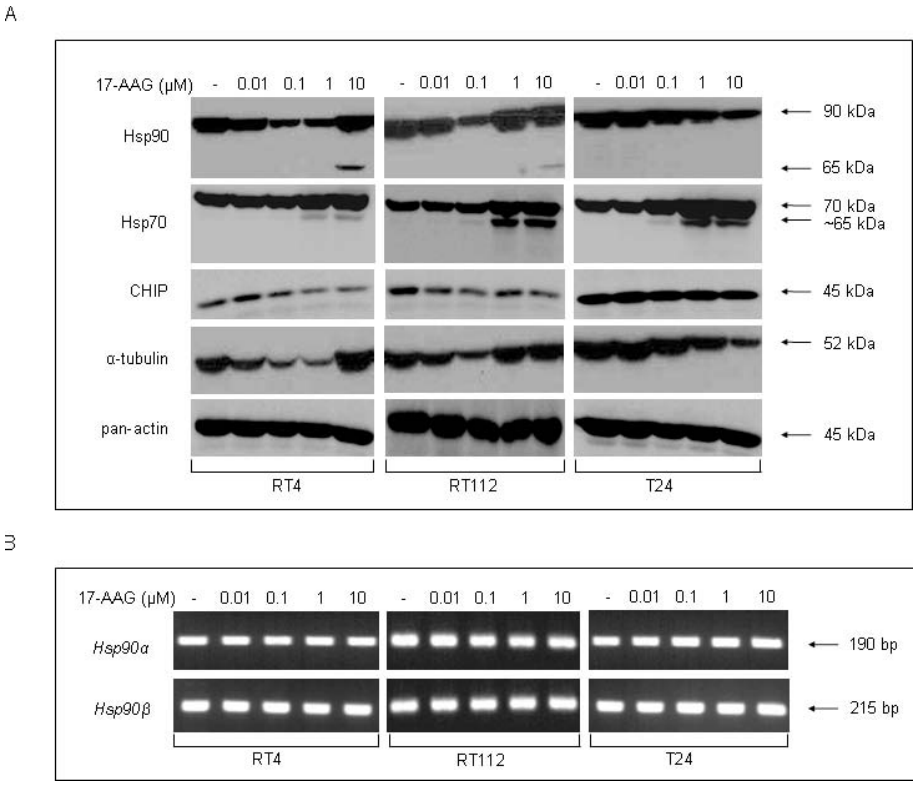


Figure 6 17-AAG-induced downregulation of Hsp90 in urinary bladder cancer cells, after 24 hours of drug treatment. (A) Total and truncated protein levels of critical members of the "chaperosome", such as Hsp90, Hsp70 and CHIP, are visualized by a Western blotting approach. Pan-actin was used as protein of reference, while α-tubulin revealed a similar to Hsp90 expression profile. The transcriptional activity analysis of *Hsp90* genes (*α* and *β*), in response to 17-AAG, is provided in (B). All experiments were repeated three times.

upregulation of total cellular Hsp90 levels was observed at 1 and 10 μM of 17-AAG, with production of the Hsp90 cleavage fragment at the highest drug dose (10 μM). This pattern could not be detected in the malignant cell line T24, where the levels of Hsp90 proved to follow a consistent dose-dependent decrease. Regarding the protein levels of Hsp70 co-chaperone, these appear to follow a dose-dependent increase, which becomes quite significant in response to relatively high doses of 17-AAG (1 and 10 μM) in all three cell lines. In addition, at the two (RT4) or three (RT112 and T24) higher doses of the drug (0.1, 1 and 10 μM), we were able to detect the presence of an Hsp70 protein cleavage product with a molecular weight of approximately 65 kDa, which also seemed to display a cell type-specific and dose-dependent formation pattern.

In order to study the cause of the 17-AAG-induced response pattern of Hsp90 in the three cell lines, we decided to analyze the expression of another member of the Hsp90 chaperone complex, namely Carboxyl terminus of Hsp70 interacting protein (CHIP), an E3 ubiquitin ligase, which regulates the turnover of Hsp90 protein clients in mammalian cells, but also Hsp90 itself, via ubiquitination of specific residues of the chaperone, therefore making it a suitable candidate for proteasomal degradation [16-18]. In the bladder cancer cell lines used in this study, CHIP showed a dose-dependent and cell type-specific decrease in response to 17-AAG administration, with RT4 and RT112 cells exhibiting the most notable reduction, whereas CHIP protein control levels were found to steadily increase from RT4 to RT112 and then T24 cells. Pan-actin was used as protein of reference in all experiments performed herein, whereas α-tubulin, interestingly, appeared to follow an expression pattern very similar to that of Hsp90. This is consistent with the recently discovered association between tubulin and the Hsp90 chaperone complex [19].

Finally, we examined the transcriptional profiles of *Hsp90α* and *Hsp90β* genes in response to the drug, in order to identify a possible association of 17-AAG-induced Hsp90 downregulation with transcriptional repression of *Hsp90* genes. In this frame, *Hsp90* mRNA expression levels were tested and found to remain unaffected in all the cell lines used here (Figure 6B), thus excluding any type of transcriptional control involvement in the 17-AAG-induced downregulation of Hsp90 protein.

17-AAG administration leads to downregulation of critical targets in the IGF-IR/Akt signaling pathway and results in NF-κB inactivation. Upon exposure to 17-AAG, a variety of Hsp90 protein clients, mainly kinases and transcription factors, were shown to be notably downregulated in the human urinary bladder cancer cell lines used in this study (Figure 7). In response to the

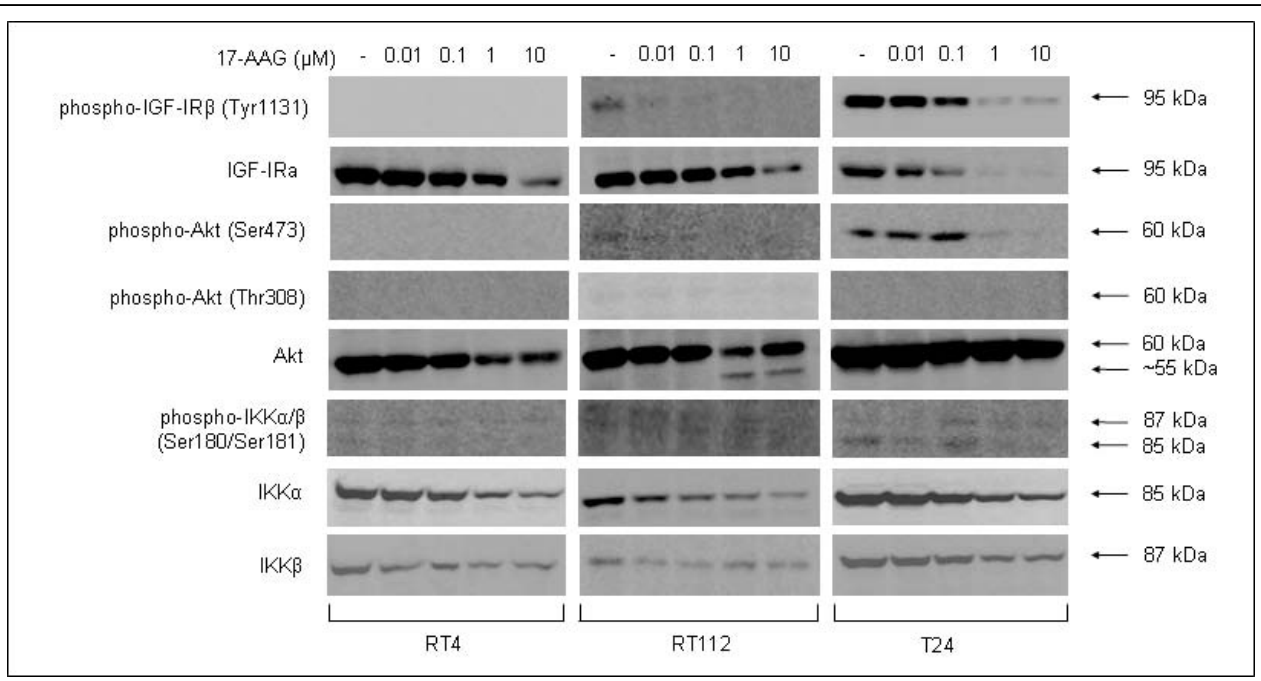


Figure 7 17-AAG administration results in functional attenuation of Akt signaling in bladder cancer cells. Inhibition of Hsp90 leads to prominent downregulation of the Akt-dependent signaling pathway, presenting with pronounced decrease of constitutively phosphorylated, and therefore activated, IGF-I receptor, Akt kinase and downstream signaling components, such as members of the IKK family (IKKα and IKKβ). All experiments were repeated three times.

drug, the total protein levels of IGF-I receptor (IGF-IR) showed a prominent dose-dependent reduction in all three bladder cancer cell lines, with T24 exhibiting the most potent effect (Figure 7). Remarkably, even though in RT112 and T24 cells the phosphorylated receptor levels, albeit weak in the former and strong in the latter, were similarly found to decrease in a dose-dependent manner, in RT4 cells no phosphorylation of the IGF-IR protein could ever be detected.

A prominent downstream target of the IGF-I receptor and distinguished protein member of the Hsp90 clientele is the Akt kinase, a critical regulatory component in many signaling pathways. Upon administration of 17-AAG, Akt proved to be downregulated in all three bladder cancer cell lines, in a dose-dependent manner (Figure 7). Interestingly, in RT112 cells we were able to observe the formation of a lower molecular weight fragment, possibly representing a cleavage product of the intact Akt kinase (55 kDa, approximately), specifically generated after exposure to 1 and 10 μM 17-AAG. Next, we tested the presence of phosphorylated Akt in the same cells before and after 17-AAG treatment. Even though phosphorylation of Akt on serine residue at position 473 (Ser473) could not be detected in RT4, it was marginal in RT112, and highly activated in T24 cells. In RT112 and T24 cell lines, Akt phosphorylation showed a dose-dependent decrease, resulting in an almost total elimination of the active form of the protein from drug concentrations higher than 0.1 μM for RT112 and 1 μM for T24 cells. Akt phosphorylation on threonine residue at position 308 (Thr308) ranged from absent (RT4 and T24) to marginal (RT112) levels.

17-AAG-induced Akt functional repression and degradation was accompanied by expression level reduction of the downstream targets IKKα and IKKβ, which clearly exhibit a dose-dependent downregulation pattern consistent with their status as *bona fide* Hsp90 chaperone clients. Moreover, the activated forms of IKKα and IKKβ kinases, phosphorylated on serine residues at positions 180 and 181, respectively, were detected at very low levels in all three cell lines (with T24 revealing the strongest expression profile), exhibiting a dose-dependent inhibition in response to 17-AAG administration. Furthermore, the combinational inhibitory effect of 17-AAG on key molecules of the IGF-IR/Akt/IKK axis was found to induce inactivation of NF-κB transcription factor, a downstream target of this pathway, ultimately resulting in its relocation to the cytoplasm, therefore rendering it unable to exert regulatory control upon a vast number of genes involved in cell proliferation and survival. As illustrated in Figure 8A, it is clear that 17-AAG promotes NF-κB inactivation in T24 bladder cancer cells due to nuclear exclusion of the factor, in contrast to the compartmentalization profile observed in control cells, where NF-κB is located both inside the nucleus and the cytoplasm. To reinforce our findings on 17-AAG-induced NF-κB inhibition in bladder cancer cells, the mRNA expression of two representative anti-apoptotic NF-κB target genes, namely *cIAP1* and *Survivin*, was examined using an RT-PCR approach (Figure 8B). Thus, in response to 17-AAG, both genes were found to be downregulated in a cell type-specific and dose-dependent manner, with RT4 and RT112 cells displaying stronger reductions of mRNA levels compared to the malignant T24 ones.

In addition, we examined one critical group of Akt downstream targets tightly associated with cell death inhibition signaling, the Forkhead family of transcription factors (FOXO: Forkhead box O). As shown in Figure 9, total FOXO1 protein detected at 78 kDa was found to display a characteristic cell type-specific and dose-dependent reduction in response to the drug, which was incomparably prominent in RT112 cells. On the other hand, total FOXO4 protein levels in all three bladder cancer cell lines exhibited an expression pattern similar to the one observed for Hsp90 and α-tubulin (Figure 9, the lowest band of 68 kDa). Furthermore, the phosphorylation status of FOXO proteins was also examined. In RT4 cells, no detectable phosphorylated FOXO transcription factors could be observed, while in RT112 cells only phospho-FOXO3 was traced in the control with subsequent elimination starting from the lowest drug dose. Interestingly, T24 cells were characterized by high levels of phosphorylated FOXO1 and FOXO3 proteins, likely reflecting the low differentiation level of these cells, whereas exposure to 17-AAG resulted in dose-dependent downregulation of both phosphorylated FOXO family members, supporting the induction of dephosphorylation-mediated nuclear sequestration of the Forkhead factors, with subsequent transactivation of apoptotic target genes.

Furthermore, we studied the effect of 17-AAG on the Ras-Raf-MEK-ERK pathway (known to usually cross-talk with Akt) in bladder cancer cells, by detection of total and phosphorylated p44/42 (Erk1/2) kinase protein levels. As illustrated in Figure 9, upon 17-AAG administration, total p44/42 levels in both RT4 and RT112 cell lines exhibited a pattern reminiscent of the one previously encountered in Hsp90, α-tubulin and FOXO4. More precisely, in RT4 cells, p44/42 protein levels displayed a pattern of dose-dependent downregulation up to 1 μM concentration of the drug, whereas a significant increase could be observed in the highest dose (10 μM). In RT112 cells, the pattern was similar, but shifted to lower concentrations. Thus, total p44/42 protein levels were found to manifest a drug-mediated reduction in the lower concentrations only, whereas in the higher ones a clear increase could be observed. On the

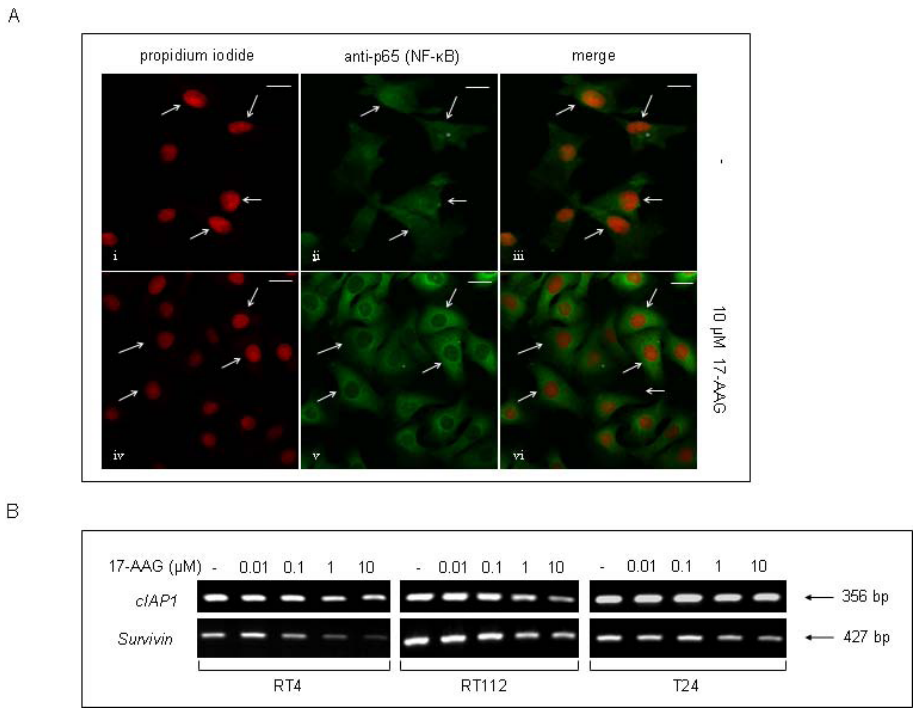


Figure 8 NF-κB functional impairment, in response to 17-AAG administration in bladder cancer cells. (A) Characteristic immunofluorescence images of T24 cells presenting NF-κB (green color) cellular localization, under control (i-iii) or 10 μM of 17-AAG (iv-vi) treatment conditions (scale bars: 10 μm). Nuclear counterstaining was performed by the utilization of propidium iodide, while images were visualized by Confocal microscopy and appropriately merged to reveal NF-κB localization in bladder cancer cells (white arrows). (B) Expression profiles of the two anti-apoptotic NF-κB target genes *cIAP1* and *Survivin* in RT4, RT112 and T24 bladder cancer cells, upon exposure to 17-AAG for 24 hours. All experiments were repeated three times.

contrary, in T24 cells, a slight but notable dose-dependent decrease of p44/42 expression levels was observed. In order to evaluate the potency of p44/42 signal transduction upon exposure to 17-AAG, the active form of the protein (phosphorylated on threonine and tyrosine residues at positions 202 and 204, respectively) was analyzed. As shown in Figure 9, all three cell lines demonstrated a severe dose-dependent reduction of active p44/42, therefore causing the downregulation of a variety of downstream targets, mainly involved in cell proliferation and survival. *In toto*, 17-AAG proved to induce a prominent inhibitory effect upon multiple Hsp90 clients, affecting both the NF-κB and the FOXO axes of the IGF-IR/Akt signaling repertoire, as well as

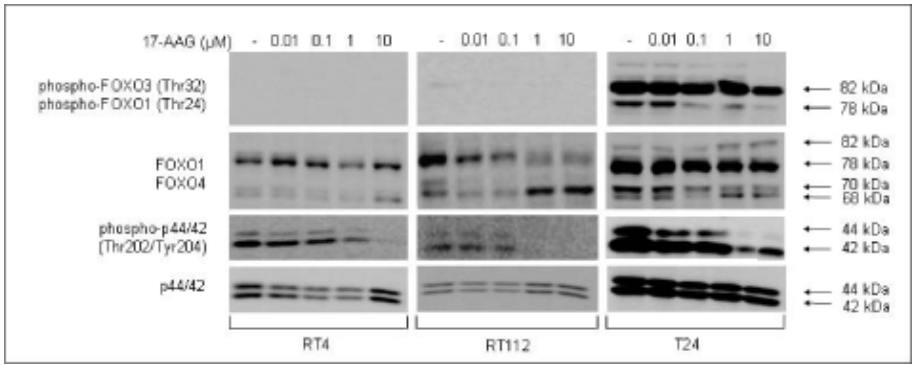


Figure 9 17-AAG induces downregulation of FOXO and ERK1/2 signaling mediators in bladder cancer cells. Detection of total and constitutively phosphorylated protein levels of FOXO transcription factors and Erk1/2 (p44/42) kinases in all three bladder cancer cell lines, upon 17-AAG administration for 24 hours, via a Western blotting approach. All immunoblotting experiments were repeated three times.

the p44/p42-dependent pathway, likely promoting the downregulation of downstream targets and finally leading to decreased cell proliferation and survival.

17-AAG administration reduces urinary bladder cancer cell motility. Cancer cell motility is an important determinant of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which underlies the early phase of the tumor invasion program. One of the key components in EMT-dependent tumor proliferation, cell motility and invasion signaling is the hepatocyte growth factor (HGF) receptor, also referred to as c-Met. In order to assess the effect of 17-AAG on c-Met pathway activation in RT4, RT112 and T24 bladder cancer cell lines, we have examined the total and phosphorylated protein levels of c-Met in response to drug exposure. As shown in Figure 10A, the low malignancy grade RT4 and RT112 cells were characterized by non to slightly detectable total c-Met protein levels, respectively, whereas in grade III T24 cells, c-Met protein could be easily recognized, exhibiting a drug dose-dependent downregulation pattern and reaching a complete elimination by the 1 μM dose of 17-AAG. The phosphorylated, active form of the protein was observed exclusively in high grade T24 cells, displaying a dose-dependent reduction profile, whereas RT4 and RT112 cells presented with undetectable (or hardly detectable) levels of constitutive activation (Figure 10A).

To further illuminate the effect of 17-AAG on the efficiency of bladder cancer cell motility, we have conducted scratch-wound assays on all the cell lines examined herein (Figure 10B). As clearly demonstrated in this work, the low malignancy grade cell lines RT4 and RT112 presented with reduced proliferation and motility potency, unable to heal the "wounds" during a 24-hours incubation period, either under high 17-AAG concentration (10 μM) or control conditions (Figure 10B, RT4: panels i-iv, RT112: panels v-viii). In contrast, the highly aggressive (grade III) T24 cells were characterized by a prominent efficiency in motility, being able to successfully "heal the wound" in an incubation period of 24 hours, creating a compact monolayer of cells (Figure 10B, panels ix and x). Although administration of 10 μM 17-AAG was not able to abrogate T24 proliferation and motility responses, it is clear that the scratch-wound "healing" mechanism in these cells has been significantly impaired due to the effect of the drug, since

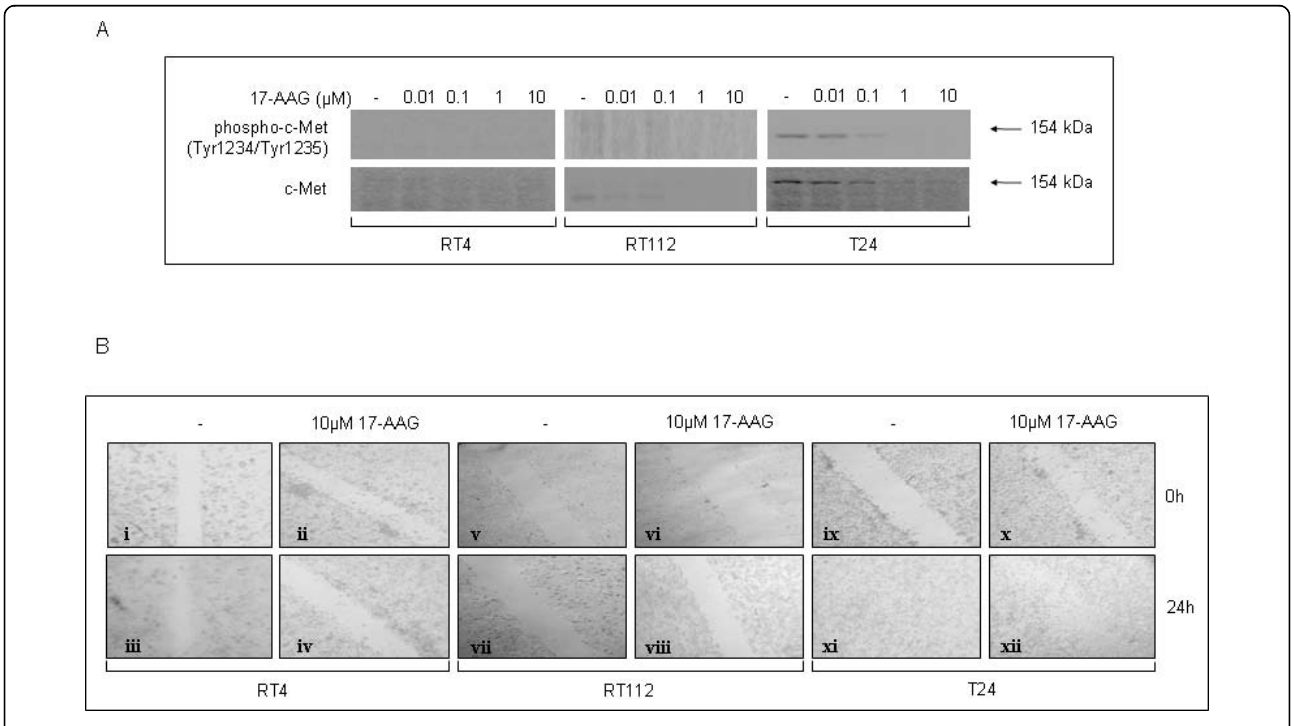


Figure 10 Exposure to 17-AAG results in reduced cancer cell motility and proliferation. (A) Western blotting analysis revealing the expression profile of total and phosphorylated c-Met protein in all three bladder cancer cell lines, upon a 24-hours incubation with different concentrations of 17-AAG. (B) Scratch-wound assays conducted on RT4 (i-iv), RT112 (v-viii) and T24 (ix-xii) cells, under control conditions or in the presence of 10 μM 17-AAG. T24 highly malignant cells display strong wound-healing potential (panel xi) over a 24-hours period, compared to RT4 and RT112 (panels iii and vii, respectively) cells, under control conditions. Interestingly, 17-AAG administration induces a moderate impairment of T24 cell motility and proliferative dynamics (panel xii), thus only partly prohibiting, in contrast to RT4 and RT112, the efficient closure of the gap (scratch-wound). Cells were observed under an inverted microscope and pictures were taken at a 20 × magnification. All experiments were repeated three times.

cells appeared to maintain the gap without being tightly condensed as initially observed under control conditions (Figure 10B, panels xi and xii).

Discussion

Human urinary bladder cancer is considered an increasingly significant public health issue in the industrialized countries, with a worldwide estimate of about two million patients [2]. Due to the importance of Hsp90 molecular chaperone on client protein maturation and function, along with its voluminous and highly diverse clientele of cancer-related proteins, a variety of Hsp90 inhibitors have emerged as promising anticancer agents [6,12]. In the present study, we have comparatively examined the effects of 17-AAG-induced Hsp90 inhibition on multiple protein targets implicated in signaling pathways critically regulating cell proliferation, apoptosis and motility, in RT4 (grade I), RT112 (grade I-II) and T24 (grade III) human urothelial bladder cancer cells. The data presented herein clearly demonstrate that, upon 17-AAG treatment, cell type-specific downregulation of multiple signaling molecules is followed by cell cycle arrest, finally resulting in Caspase-mediated cell death.

Depending on the cellular context and malignancy grade, 17-AAG has been shown to facilitate arrest in all checkpoints of the cell cycle, as for example, in human malignant pleural mesothelioma (G1 or G2/M block) [20] and breast cancer cells (G1 block) overexpressing HER2 [21]. In all human bladder cancer cell lines examined in this study, apoptotic cell death was found to be preceded predominantly by a drug dose-dependent G1/S cell cycle block, with arrest in other phases of the cell cycle appearing in a cell type-specific manner. The unpredictability of cell cycle arrest induced by 17-AAG in bladder cancer cells is in agreement with previous reports and might be related to differences in client protein repertoires and cellular contexts [22]. To elucidate the 17-AAG-induced block of the cell cycle, we undertook analysis of expression and/or activation profiles of several key-modulators of cell cycle progression. This demonstrated that, in response to 17-AAG exposure, the drug-dependent protein downregulation patterns correlate well with the observed G1 arrest of the cell cycle, as well as with the reduction in cell proliferation capacity.

Implementation of apoptosis, due to the effect of 17-AAG, has previously been reported in glioblastoma [23] and colon cancer [24]. In the bladder cancer cell lines used in this study, cell type-specific and drug dose-dependent activation of a Caspase-induced cell death program proved to be initiated upon 17-AAG administration. These findings are in accordance with the survival rates observed in the cytotoxicity tests, although, in these experiments, 17-AAG-induced cell death percentages in the three bladder cancer cell lines were not found to differ significantly. In contrast, the cell-type specific profile of Caspase repertoire activation, and especially the diminished levels of processed Caspase-3 in RT112 and T24 cells, could possibly implicate other types of executive Caspases not studied here (i.e. Caspase-6 or -7) or even Caspase-independent cell death mechanisms such as autophagy [25,26].

Hsp90 expression levels seem to be upregulated in cancer, resulting in addiction of tumor cells to multiple oncogenic pathways in which Hsp90 clients play a critical role. In bladder cancer, Hsp90 was found to be expressed in more than 90% of human tumor specimens, with high-grade and muscle invasive tumors expressing significantly higher levels of Hsp90 than low-grade and superficial tumours [27]. Nevertheless, in 10% of the tumor samples Hsp90 expression was found to be downregulated and this was associated with infiltrating recurrences and poor prognosis [28,29], most likely due to the overall molecular profile of the individual tumors. Besides the importance of Hsp90 expression levels, specific conformations of the chaperone have been implicated in cancer versus normal cell sensitivity to Hsp90 inhibitors: Hsp90 was shown to display higher binding affinity for 17-AAG exclusively in cancer cells [30], leading to the formation of 17-AAG-sensitive Hsp90-containing "superchaperone" complexes in malignant cells, whereas normal cells bearing a predominantly uncomplexed Hsp90 are significantly less sensitive to these types of inhibitors [13,30]. This feature is likely exploited by Hsp90 targeting with the use of 17-AAG and subsequent effects on multiple Hsp90 targets.

Hsp90 inhibition and subsequent Hsp70 and Hsp27 upregulation, due to 17-AAG, have been reported in human colon [31], prostate [32] and cervical cancer cells [32]. As presented in this study, even though a 17-AAG-induced Hsp90 downregulation was detected in all bladder cancer cell lines over a 24-hours treatment period, a cell type-specific pattern of inhibition was observed. In RT4 and RT112 cells, after exposure to the highest dose of the drug, an additional protein band was generated, whereas no such band could be detected in T24 cells. This novel finding in relation to Hsp90 structural integrity, upon high dose of 17-AAG administration, is presented herein for the first time. We suggest that this fragment may well be a product of Hsp90 proteolytic processing by Granzyme B [14,15]. Use of the GrabCas algorithm has revealed a putative Granzyme B recognition and cleavage site in the amino acid sequence of both Hsp90α and Hsp90β protein isoforms, indicating that Hsp90 must be a *bona fide* substrate of Granzyme B. On the contrary, no Caspase cleavage site could be identified, with the help of GrabCas, fitting to the

molecular weight of the possible Hsp90 cleavage fragment under discussion. Interestingly, Hsp90 cleavage has been reported previously, as a response to oxidative stress factors [33], arsenic-based compounds [34] and exposure to doxorubicin and cisplatin chemotherapeutic agents [14,15]. Yet, it is not known whether the putative cleavage product is associated, somehow, with malignancy grade or *p53* genetic status of the cells, since RT4 and RT112 are grade I and I-II, respectively, harboring a wild-type p53, whereas T24 are grade III, bearing a mutant p53 (Figure 6A). Intriguingly, the RT4- and RT112-specific production of a ~ 65 kDa putative proteolytic fragment could further enhance the functional amputation effect of 17-AAG on Hsp90, likely acting as a putative dominant negative component able to severely impair Hsp90 chaperoning properties. Thus, despite the Hsp90 upregulation observed in response to the highest 17-AAG concentration in grade I (RT4) and I-II (RT112) cell lines, the protein, due to its functional titration by the ~ 65 kDa processed product, seems unable to support its numerous clients thoroughly analyzed here. Therefore, we suggest that the chaperosomes containing these Hsp90 truncated forms are most likely inefficient to exert their cellular tasks.

The three bladder cancer cell lines seemed to follow a distinct and cell type-dependent downregulation profile of the Hsp90 molecular chaperone. However, as shown herein, despite 17-AAG administration, gene expression at the level of transcription remained unaffected for both isoforms of Hsp90 (α and β), clearly indicating that the regulation of Hsp90 is beyond transcriptional control, but occurs more likely at the post-translational level, via ubiquitination and subsequent proteasomal degradation or autophagy.

Hsp90 inhibition was suggested to be tightly associated with a compensatory upregulation of Hsp70 [31] and/or Hsp27 protein levels, likely inducing resistance to 17-AAG [32]. In this work, upon exposure to 17-AAG, total Hsp70 expression levels proved to exhibit a dose-dependent increase and generation of an ~ 65 kDa protein fragment in all three cell lines, reaching peak value at dose 10 μM. Using the GrabCas software, we propose that, similarly to Hsp90, the lower molecular weight band could likely represent a product derived from Hsp70 proteolytic processing by 17-AAG-induced Granzyme B activity, but not Caspase protease function.

CHIP was studied in order to illuminate the intriguing pattern of Hsp90 protein level alterations after 17-AAG treatment. CHIP levels were found to be downregulated in a dose-dependent manner in all three bladder cancer cell lines, suggesting a CHIP-regulated effect on proteasomal degradation of associated target proteins, such as Hsp90 and its clients. However, the higher dose-dependent upregulation of Hsp90 and α-tubulin implies a likely redundant, or non-essential, role of CHIP and, therefore, other ubiquitin ligases must be critically implicated in this type of response. An alternative scenario is that affinity threshold phenomena are at play here, with CHIP, although downregulated, still being able to implement its ubiquitin ligase activities regarding Hsp90 clients, but not Hsp90 itself.

The critical role of IGF-IR/Akt signaling pathway deregulation in tumor cell proliferation, survival and migration has been well documented [35]. It has been previously reported that 17-AAG administration causes severe inhibition of the Akt-dependent signaling pathways in osteosarcoma [36] and gastric cancer [37]. As demonstrated here, in human urinary bladder cancer cells, 17-AAG-induced inhibition of Hsp90 resulted in a cell type-specific downregulation of several proteins involved in Akt-dependent signaling, critically contributing to the negative regulation of proliferation, survival and motility. As a consequence, NF-κB transcription null activation potential was significantly compromised, mainly due to the sequestration of the factor into the cytoplasm, as clearly illustrated in Figure 8A. Reduced NF-κB activity was indirectly assessed by measuring the mRNA expression levels of *Survivin* and *cIAP1*, two well known *bona fide* NF-κB target genes. Thus, we have demonstrated that 17-AAG-dependent inhibition of NF-κB activity is tightly associated with transcriptional repression of *Survivin* and *cIAP1* anti-apoptotic genes, thus decisively contributing to the cytotoxic potency of 17-AAG by decreasing the required "apoptotic threshold" in bladder cancer cells [38].

Moreover, 17-AAG-mediated Hsp90 inhibition resulted in alterations of the phosphorylation status of members of the Forkhead family of transcription factors (FOXO), immediate downstream substrates of Akt kinase, in bladder cancer cells. As shown in this study, FOXO factors proved to be strongly phosphorylated in the highly malignant T24 cells, whereas extremely low, but detectable, levels were also observed in RT112 cells. Administration of 17-AAG caused a notable downregulation of phosphorylated FOXO1 and FOXO3 family members, likely inducing an enhancement of their apoptotic activity.

Interestingly, the undetectable phosphorylation of the IGF-I-dependent downstream mediators (i.e. IGF-IR, Akt, IKKs and FOXOs) in RT4 cells strongly suggests the deactivated character of the pathway under the particular growth conditions, whereas, on the contrary, in T24 cells the IGF-IR/Akt pathway seems to be constitutively activated. RT112 cells proved to display an intermediate pattern of signaling potency, with the IGF-IR/Akt pathway being activated at very low levels. This novel finding of cell type-specific activation of the IGF-IR/Akt-dependent signaling repertoire, herein

demonstrated for the first time, could be tightly associated with the underlying differences in various features of the malignant phenotype observed in the three bladder cancer cell lines examined.

Hsp90 inhibition and ensuing Akt inactivation in bladder cancer cells was accompanied by downregulation of Erk1/2-dependent signaling. Exposure to 17-AAG has been previously reported to cause inhibition of the Raf/MEK/ERK signaling cascade in Hodgkin's lymphoma [39] and leukemia [40]. Although total Erk1/2 protein levels exhibited a cell type-specific and drug dose-dependent response similar to the one of α-tubulin and Hsp90, phosphorylated p44/42 levels were severely downregulated in all bladder cancer cell lines, implying the differential control between total and phosphorylated protein destabilization processes in response to the high drug dose treatments.

Invasion and metastasis are one of the hallmark traits of cancer involved in the advanced stages of tumor progression. Hsp90 inhibition by ansamycins has been reported to suppress cancer cell motility and invasion through depletion of the HGF/c-Met signaling pathway in both leiomyosarcoma and glioblastoma cell lines [41]. Another novel finding of the present study is the notable expression and constitutive activation of c-Met receptor in T24 bladder cancer cells, whereas in RT4 and RT112 cells total c-Met protein levels were either absent (RT4) or barely detectable (RT112). Finally, in this study, we have clearly demonstrated that T24 cell line expresses high amounts of phosphorylated IGF-IR, Akt, FOXOs, p44/42 and c-Met proteins and exhibits strong migration dynamics, which could well be associated with a more invasive and metastatic potency, exactly as a result of this over-activated signaling network. Nevertheless, we have shown that the inhibitory effect of 17-AAG on T24 cells is reflected on the significant decrease of both total and phosphorylated c-Met protein levels, with subsequent suppression of other oncogenic parameters, such as increased cell proliferation and motility, hence critically contributing to the impairment of aggressive cancer cell phenotype [41-43].

Conclusions

We have clearly demonstrated the existence of a dose-dependent and cell type-specific inhibitory effect of 17-AAG on cell proliferation, survival and motility in human urinary bladder cancer cells. These responses are likely induced by the pronounced downregulation of multiple Hsp90 protein clients, as well as their associated and downstream components, such as Cyclin D1, Cdk4, pRb, E2F1, IGF-IR, Akt, FOXOs, IKKs, NF-κB, cIAP1, Survivin, ERK1/2 and c-Met, resulting in cell cycle arrest, decline in cell motility and potent activation of Caspase-mediated apoptosis (Figure 11).

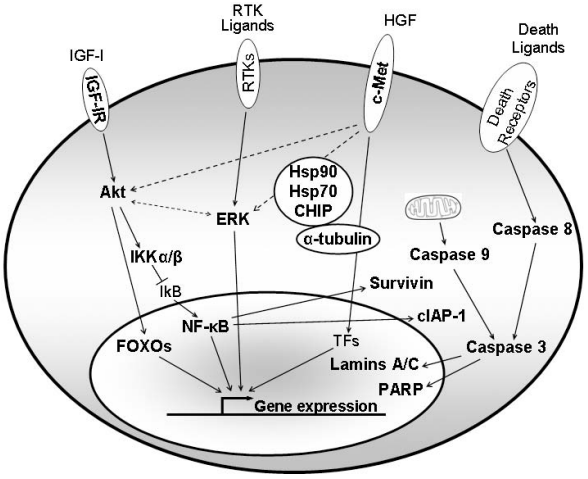


Figure 11 Schematic representation of the effects of Hsp90 inhibition on multiple signaling pathways in human urinary bladder cancer cells. Downregulated molecules examined herein are shown in bold letters, while dashed arrows depict "cross-talk" interactions (RTKs: Receptor Tyrosine Kinases, TFs: Transcription Factors).

Acknowledgements

We are deeply grateful to E.G. Konstantakou, *Ph.D.* candidate (Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, Athens, Greece) for her valuable assistance in the maintenance of cell cultures and scientific advice. We would like to thank Dr. Vasiliki Labropoulou (Laboratory of Molecular Genetics of Insects and Biotechnology, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Athens, Greece) for the provision of the anti-p65 (NF-κB) antibody. Many thanks to Dr. Harris Pratsinis (Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Athens, Greece) for his assistance in cell cycle analysis and to Dr. Dimitrios Kletsas (Head Researcher of the Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Athens, Greece) for his valuable suggestions during the implementation of this study. P.K. Karkoulis is financially supported by a fellowship awarded from the Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Athens, Greece (*Ph.D. fellowship*). Financial support was provided from the Greek Ministry of Health and Social Solidarity (*ΔΥ2β/ΟΙΚ.98909/17-07-2008*) and the Hellenic Society of Medical Oncology (*HESMO*) (*1804/20-03-2009*).

Author details

[1]Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", 15310 Athens, Greece. [2]Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15784 Athens, Greece. [3]Institute of Biology, NCSR "Demokritos", 15310 Athens, Greece.

Authors' contributions

PKK carried out most of the experimental work and drafted the manuscript. DJS has carried out confocal microscopy, participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. LHM participated in the design of the study. GEV conceived the study, designed the primers for RT-PCR, participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 4 May 2010 Accepted: 9 September 2010
Published: 9 September 2010

References

1. Clark PE: **Bladder cancer.** *Curr Opin Oncol* 2007, **19(3)**:241-247.
2. Wu XR: **Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5(9)**:713-725.
3. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A: **Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management.** *Cancer Pract* 2002, **10(6)**:311-322.
4. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS: **Bladder cancer.** *Lancet* 2009, **374(9685)**:239-249.
5. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ: **Molecular staging of bladder cancer.** *BJU Int* 2005, **96(1)**:7-12.
6. Stravopodis DJ, Margaritis LH, Voutsinas GE: **Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex.** *Curr Med Chem* 2007, **14(29)**:3122-3138.
7. Whitesell L, Lindquist SL: **HSP90 and the chaperoning of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5(10)**:761-772.
8. Picard D: **Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59(10)**:1640-1648.
9. Pearl LH, Prodromou C: **Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery.** *Annu Rev Biochem* 2006, **75**:271-294.
10. Maloney A, Workman P: **HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds.** *Expert Opin Biol Ther* 2002, **2(1)**:3-24.
11. Neckers L, Ivy SP: **Heat shock protein 90.** *Curr Opin Oncol* 2003, **15(6)**:419-424.
12. Powers MV, Workman P: **Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13(Suppl 1)**:S125-135.
13. Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N: **Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1113**:202-216.
14. Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Lampidonis AD, Anastasiou D, Kachrilas S, Messini-Nikolaki N, Papassideri IS, Aravantinos G, *et al*: **Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines.** *Int J Oncol* 2009, **34(1)**:137-160.
15. Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH, Stravopodis DJ: **Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses.** *Int J Oncol* 2009, **35(2)**:401-416.
16. Morales JL, Perdew GH: **Carboxyl terminus of hsc70-interacting protein (CHIP) can remodel mature aryl hydrocarbon receptor (AhR) complexes and mediate ubiquitination of both the AhR and the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in vitro.** *Biochemistry* 2007, **46(2)**:610-621.
17. Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C: **CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation.** *J Biol Chem* 2001, **276(46)**:42938-42944.
18. Kundrat L, Regan L: **Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP.** *J Mol Biol* **395(3)**:587-594.
19. Giustiniani J, Daire V, Cantaloube I, Durand G, Pous C, Perdiz D, Baillet A: **Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53.** *Cell Signal* 2009, **21(4)**:529-539.
20. Okamoto J, Mikami I, Tominaga Y, Kuchenbecker KM, Lin YC, Bravo DT, Clement G, Yagui-Beltran A, Ray MR, Koizumi K, *et al*: **Inhibition of Hsp90 leads to cell cycle arrest and apoptosis in human malignant pleural mesothelioma.** *J Thorac Oncol* 2008, **3(10)**:1089-1095.
21. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N: **Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2.** *Oncogene* 2002, **21(8)**:1159-1166.
22. Burrows F, Zhang H, Kamal A: **Hsp90 activation and cell cycle regulation.** *Cell Cycle* 2004, **3(12)**:1530-1536.
23. Garcia-Morales P, Carrasco-Garcia E, Ruiz-Rico P, Martinez-Mira R, Menendez-Gutierrez MP, Ferragut JA, Saceda M, Martinez-Lacaci I: **Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines.** *Oncogene* 2007, **26(51)**:7185-7193.
24. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA: **Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis.** *Cancer Res* 2001, **61(10)**:4003-4009.
25. Mediavilla-Varela M, Pacheco FJ, Almaguel F, Perez J, Sahakian E, Daniels TR, Leoh LS, Padilla A, Wall NR, Lilly MB, *et al*: **Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75.** *Mol Cancer* 2009, **8(1)**:68.
26. Byun JY, Kim MJ, Yoon CH, Cha H, Yoon G, Lee SJ: **Oncogenic Ras signals through activation of both phosphoinositide 3-kinase and Rac1 to induce c-Jun NH2-terminal kinase-mediated, caspase-independent cell death.** *Mol Cancer Res* 2009, **7(9)**:1534-1542.
27. Cardillo MR, Sale P, Di Silverio F: **Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer.** *Anticancer Res* 2000, **20(6B)**:4579-4583.
28. Lebret T, Watson RW, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H: **Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma.** *Cancer* 2003, **98(5)**:970-977.
29. Lebret T, Watson RW, Molinie V, Poulain JE, O'Neill A, Fitzpatrick JM, Botto H: **HSP90 expression: a new predictive factor for BCG response in stage Ta-T1 grade 3 bladder tumours.** *Eur Urol* 2007, **51(1)**:161-166, discussion 166-167.
30. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ: **A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.** *Nature* 2003, **425(6956)**:407-410.
31. Clarke PA, Hostein I, Banerji U, Stefano FD, Maloney A, Walton M, Judson I, Workman P: **Gene expression profiling of human colon cancer cells following inhibition of signal transduction by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of the hsp90 molecular chaperone.** *Oncogene* 2000, **19(36)**:4125-4133.
32. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C: **Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism.** *Cancer Res* 2006, **66(22)**:10967-10975.
33. Beck R, Verrax J, Gonze T, Zappone M, Pedrosa RC, Taper H, Feron O, Calderon PB: **Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77(3)**:375-383.
34. Shen SC, Yang LY, Lin HY, Wu CY, Su TH, Chen YC: **Reactive oxygen species-dependent HSP90 protein cleavage participates in arsenical As (+3)- and MMA(+3)-induced apoptosis through inhibition of telomerase activity via JNK activation.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **229(2)**:239-251.
35. Brader S, Eccles SA: **Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis.** *Tumori* 2004, **90(1)**:2-8.
36. Gazitt Y, Kolaparthi V, Moncada K, Thomas C, Freeman J: **Targeted therapy of human osteosarcoma with 17AAG or rapamycin: characterization of induced apoptosis and inhibition of mTOR and Akt/MAPK/Wnt pathways.** *Int J Oncol* 2009, **34(2)**:551-561.
37. Lang SA, Klein D, Moser C, Gaumann A, Glockzin G, Dahlke MH, Dietmaier W, Bolder U, Schlitt HJ, Geissler EK, *et al*: **Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6(3)**:1123-1132.
38. Hovelmann S, Beckers TL, Schmidt M: **Molecular alterations in apoptotic pathways after PKB/Akt-mediated chemoresistance in NCI H460 cells.** *Br J Cancer* 2004, **90(12)**:2370-2377.
39. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A: **Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death.** *Clin Cancer Res* 2006, **12(2)**:584-590.
40. Jia W, Yu C, Rahmani M, Krystal G, Sausville EA, Dent P, Grant S: **Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways.** *Blood* 2003, **102(5)**:1824-1832.
41. Xie Q, Gao CF, Shinomiya N, Sausville E, Hay R, Gustafson M, Shen Y, Wenkert D, Vande Woude GF: **Geldanamycins exquisitely inhibit HGF/SF-mediated tumor cell invasion.** *Oncogene* 2005, **24(23)**:3697-3707.
42. Wang S, Pashtan I, Tsutsumi S, Xu W, Neckers L: **Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors.** *Cell Cycle* 2009, **8(13)**:2050-2056.

43. Peruzzi B, Bottaro DP: **Targeting the c-Met signaling pathway in cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12(12)**:3657-3660.

Pre-publication history
The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/481/prepub

doi:10.1186/1471-2407-10-481
Cite this article as: Karkoulis *et al.*: 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC Cancer* 2010 **10**:481.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cells

Panagiotis K. Karkoulis[1], Dimitrios J. Stravopodis[2], Eumorphia G. Konstantakou[2], Lukas H. Margaritis[2] and Gerassimos E. Voutsinas[1, 3]

[1]Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", Aghia Paraskevi, 15310 Athens, Greece

[2]Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15784 Athens, Greece

[3]Corresponding author: Gerassimos E. Voutsinas, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Aghia Paraskevi, 15310 Athens, Greece, Tel.: +30 210 650 3579, +30 210 650 3622, Fax: +30 210 651 1767, E-mail: mvoutsin@bio.demokritos.gr

Abstract

Geldanamycin (GA) can be considered as a relatively new component with promising capacity of therapy for muscle-invasive urinary bladder cancer. It specifically targets heat shock protein 90 (Hsp90) and interferes with its function as a molecular chaperone. In this study, we have investigated the effect of geldanamycin on the regulation of Hsp90-dependent oncogenic signaling pathways directly implicated in cell cycle progression, survival and motility of human urinary bladder cancer cell lines. In order to assess the biological effect of Hsp90 inhibition on RT4 and T24 human urinary bladder cancer cell lines, we applied MTT assays, FACS analysis, Western blotting, semi-quantitative RT-PCR, electrophoretic mobility shift assays (EMSA), immunocytochemistry and scratch-wound assays. We have herein demonstrated that, upon geldanamycin treatment, bladder cancer cells are prominently arrested in the G1 phase of the cell cycle and eventually undergo programmed cell death, via combinatory activation of apoptosis and autophagy. Furthermore, geldanamycin administration proved to induce a profound downregulation of multiple Hsp90 protein clients and downstream effectors, such as membrane receptors (IGF-IR and c-Met), protein kinases (Akt, IKKα, IKKβ, and Erk1/2) and transcription factors (FOXOs and NF-κB), therefore resulting in the impairment of proliferative oncogenic signaling and reduction of cell motility. *In toto*, we have clearly evinced a dose-dependent and cell type-specific effect of geldanamycin on cell cycle progression, survival and motility of human bladder cancer cells, due to downregulation of multiple Hsp90 clients and subsequent disruption of oncogenic signaling integrity.

Keywords

Bladder, cancer, Hsp90, geldanamycin, motility, signaling

17-DMAG induces heat shock protein 90 functional impairment in human urinary bladder cancer cells; taking out pathological hallmark traits of malignancy

Panagiotis K. Karkoulis[1], Dimitrios J. Stravopodis[2], Athanassios D. Velentzas[2] and Gerassimos E. Voutsinas[1, 3]

[1]Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", Aghia Paraskevi, 15310 Athens, Greece

[2]Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15784 Athens, Greece

[3]Corresponding author: Gerassimos E. Voutsinas, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Aghia Paraskevi, 15310 Athens, Greece, Tel.: +30 210 650 3579, +30 210 650 3622, Fax: +30 210 651 1767, E-mail: mvoutsin@bio.demokritos.gr

Abstract

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a molecular chaperone that maintains the structural and functional integrity of various protein clients that are involved in multiple oncogenic signaling pathways. Hsp90 holds a prominent role in the initiation of tumorigenesis and cancer progression, as its broad clientele is involved in the generation of the hallmark traits of cancer. 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) specifically targets Hsp90 and interferes with its function as a molecular chaperone, impairing its intrinsic ATPase activity and undermining proper folding of multiple protein clients. In this study, we have examined the effect of 17-DMAG on the regulation of Hsp90-dependent tumorigenic signaling pathways directly implicated in cell cycle progression, survival and motility of human urinary bladder cancer cell lines. We have used MTT-based assays, FACS analysis, Western blotting, semi-quantitative RT-PCR, immunocytochemistry and scratch-wound assays in RT4 ($p53^{+/+}$), RT112 ($p53^{+/+}$), T24 ($p53^{-/-}$) and TCCSUP ($p53^{-/-}$) human urinary bladder cancer cell lines. We have demonstrated that, upon exposure to 17-DMAG, bladder cancer cells display prominent cell cycle arrest and eventually undergo apoptotic cell death in a dose-dependent manner. Furthermore, 17-DMAG administration induced pronounced downregulation of multiple Hsp90 protein clients and other downstream oncogenic effectors, therefore resulting in cell proliferation reduction and decline of cell motility due to the molecular “freezing” of several cytoskeletal components. In total, we have clearly proved a dose-dependent and cell type-specific effect of 17-DMAG on the hallmark traits of cancer, rendering Hsp90 a key molecular component in targeted bladder cancer therapy.

Keywords

17-DMAG, bladder, cancer, cytoskeleton, Hsp90, signaling

The ripple effect paradigm: a proteome-wide approach of Hsp90 inhibition in human urinary bladder cancer cells

Panagiotis K. Karkoulis[1], Dimitrios J. Stravopodis[2], Eumorphia G. Konstantakou[2], Ema Anastasiadou[3], George Th. Tsangaris[4] and Gerassimos E. Voutsinas[1, 5]

[1]Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, National Center for Scientific Research (NCSR) "Demokritos", 15310 Athens, Greece

[2]Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15784 Athens, Greece

[3]Department of Genetics and Gene Therapy, Center of Basic Research II, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou, 11527 Athens, Greece

[4]Proteomics Research Unit, Center of Basic Research II, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou, 11527 Athens, Greece

[5]Corresponding author: Gerassimos E. Voutsinas, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", 15310 Athens, Greece, Tel.: +30 210 650 3579, +30 210 650 3622, Fax: +30 210 651 1767, E-mail: mvoutsin@bio.demokritos.gr

Abstract

17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is a relatively novel and highly promising component of therapy against muscle-invasive urinary bladder cancer. This benzoquinone ansamycin displays strong anti-tumor activity by specific disruption of the chaperoning properties of heat shock protein 90 (Hsp90) that, among others, targets the preservation of the structural and functional integrity of a vast variety of oncogenic proteins, hence rendering it (Hsp90) a significant candidate for targeted chemotherapy. In this study, we have investigated the proteomic, and therefore subcellular, modifications that occur in the highly malignant bladder cancer cells T24, upon 17-AAG treatment for 24 hours, as well as the resulting functional changes. A wide-range proteome analysis was performed, utilizing two-dimensional gel electrophoresis (2DE), peptide mass fingerprinting (LC-MS/MS) and post-source decay assays, in order to obtain an insight of the significant proteome changes that occur due to Hsp90 inhibition. Specific protein members of the oncogenic chaperone complex (i.e. Hsc70 and GRP75) and cytoskeleton network (i.e. Ezrin, Radixin, Moesin, and Actins) were further examined via a Western blotting approach, followed by immunofluorescence experiments. Our study revealed, among others, changes in multiple protein groups that are implicated in all aspects of cellular physiology, including the molecular chaperone network players, cytoskeletal components, cellular metabolism regulators and receptor signaling cascades, therefore unveiling the highly diversified effect of 17-AAG in signal transduction and protein trafficking of bladder cancer cells.

Keywords

17-AAG, bladder, cancer, ERM, Hsp90, proteome

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Κ. ΚΑΡΚΟΥΛΗΣ B.Sc., M.Sc.

Βιολόγος

Προσωπικές Πληροφορίες

- Εθνικότητα: Ελληνική
- Ημερομηνία Γέννησης: 27 Αυγούστου 1980
- Τόπος Γέννησης: Χάμιλτον (Hamilton), Καναδάς (Canada)

Στοιχεία Επικοινωνίας

- Διεύθυνση κατοικίας: Αισχύλου 25, Χαλάνδρι, 15234
- Τηλέφωνα επικοινωνίας: +30-2107470472
  +30-2106503622
  +30-6944206118
- Διεύθυνση Ηλεκτρονικού Ταχυδρομείου: pkarkoul@bio.demokritos.gr
  pkarkoulis@yahoo.gr
  pkarkoulis@biol.uoa.gr

Σχολικοί Τίτλοι

- Απόφοιτος 1ου Γενικού Λυκείου Τριπόλεως (1998)
- Βαθμός Απολυτηρίου: Δεκαεννέα και 5 ενδέκατα (19 5/11)
- Εισαγωγή στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (1999)

Προπτυχιακές Σπουδές

- Πτυχιούχος του Τμήματος Βιολογίας (Βαθμός Πτυχίου 6,39)
  Σχολή Θετικών Επιστημών
  Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2005)

- Διεξαγωγή και ολοκλήρωση διπλωματικής πτυχιακής εργασίας στο εργαστήριο του Ε. Δ. Βαλάκου (Αναπληρωτής Καθηγητής), διάρκειας 12 μηνών, στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου με θέμα «Φυσιολογικές προσαρμογές του χερσαίου σαλιγκαριού *Codringtonia codringtonii*, στη διάρκεια ενός ετήσιου κύκλου του. Η ζωή ανάμεσα σε διαπαύσεις» (2004-2005)

Μεταπτυχιακές Σπουδές

- Πτυχιούχος του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «*Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική*» (Βαθμός Πτυχίου 9,3)
  Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
  Σχολή Θετικών Επιστημών – Τμήμα Βιολογίας & Ιατρική Σχολή Αθηνών (2007)

- Διεξαγωγή και ολοκλήρωση διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «*Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική*» στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» με θέμα «*Μελέτη μηχανισμών απόπτωσης επαγόμενης από επίδραση στοχευμένων και συμβατικών χημειοθεραπευτικών σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης*» (2006-2007). Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Ι. Στραβοπόδης (Επίκουρος Καθηγητής)

- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο «*Μελέτη μηχανισμών μεταγωγής σήματος μετά από επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στον ανθρώπινο καρκίνο*» στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης, Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Επιβλέπων Ερευνητής: δρ. Γ. Ε. Βουτσινάς (Ερευνητής Β') και Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής. Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Ι. Στραβοπόδης (Επίκουρος Καθηγητής) (Ιούλιος 2007 έως και σήμερα)

- Παρακολούθηση και επιτυχής ολοκλήρωση των μαθημάτων του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Ξένες Γλώσσες / Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές

- Αγγλικά (Proficiency in English, University of Cambridge)
- Αγγλικά (Proficiency in English, University of Michigan)
- Χειρισμός Ηλεκτρονικών Υπολογιστών και Γλώσσες Προγραμματισμού (Microsoft Windows, Microsoft Office, Linux, Unix, Internet)

Εργαστηριακή Προϋπηρεσία

- Πρακτική εξάσκηση διάρκειας 2 μηνών (Ιούνιος και Ιούλιος 2005) στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Δρ. Γ. Παναγιώτου, στο Ερευνητικό Κέντρο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Υποτροφίες - Βραβεία

- Υπότροφος Κληροδοτήματος Γ. Μιστριώτου (1999-2003), ως αριστεύσας απόφοιτος του 1ου Γενικού Λυκείου Τριπόλεως που επέτυχε σε Ανώτατο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα
- Υπότροφος-Μεταπτυχιακός Υποψήφιος Διδάκτορας (ΥΜΥΔ) του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (Ιούλιος 2007 έως και σήμερα)
- Βραβείο «Γ. Ακογιούνογλου» 2010, ως διακριθείς Υπότροφος-Μεταπτυχιακός Υποψήφιος Διδάκτορας του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Συμμετοχές σε Ελληνικά Συνέδρια

- 24ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Ερέτρεια 2002
- 25ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Μυτιλήνη 2003
- 26ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Βόλος 2004
- 27ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Ναύπλιο 2005
- 9ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο

Ελληνική Ομάδα Έρευνας Συνδετικού Ιστού, Αθήνα 2007

- 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, Πάτρα 2009
- 60ο Πανελλήνιο Συνέδριο
  Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα 2009

Αναρτήσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

- Καρκούλης Π., Γκιόκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. «*Φυσιολογικές προσαρμογές στον ετήσιο κύκλο του σαλιγκαριού Codringtonia codringtoni: η ζωή ανάμεσα σε διαπαύσεις*». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 27ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Ναύπλιο (2005)
- Αναστασίου Δ., Στραβοπόδης ΔΙ, Μελαχροινού Σ., Καρκούλης Π, Κωνσταντάκου Ε., Λαμπιδώνης Α, Κλέτσας Δ. και Γ. Βουτσινάς Γ. «*Η λειτουργική αναστολή της Hsp90 δεν επιδρά στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων της εξωκυττάριας ουσίας, σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης*». 9ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Ελληνική Ομάδα Έρευνας Συνδετικού Ιστού, Αθήνα (2007)
- Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Κωνσταντάκου Ε.Γ., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε. «*Η 17-AAG επάγει αναστολή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης λόγω μειορύθμισης πολλαπλών «πελατών» της Hsp90 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Akt*». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα (2009)
- Κωνσταντάκου Ε.Γ., Βουτσινάς Γ.Ε., Καρκούλης Π.Κ., Αραβαντινός Γ., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Στραβοπόδης Δ.Ι. «*Η δια μέσου της cisplatin επαγόμενη απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης συσχετίζεται με p53-εξαρτώμενες και p53-ανεξάρτητες ρυθμιστικές αποκρίσεις*». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα (2009)
- Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε. «*Αναστολή πολλαπλών σηματοδοτικών μηχανισμών από το 17-AAG σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης*». Συνεδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα (2009)

Ομιλίες σε Ελληνικά Συνέδρια

- Καρκούλης Π., Γκιόκας Σ., Παφίλης Π., Βαλάκος Ε.Δ. «*Φυσιολογικές προσαρμογές στον ετήσιο κύκλο του σαλιγκαριού Codrigtonia codrigtoni: η ζωή ανάμεσα σε διαπαύσεις*». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 27ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Ναύπλιο (2005)
- Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Κωνσταντάκου Ε.Γ., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε. «*Η 17-AAG επάγει αναστολή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστης λόγω μειορύθμισης πολλαπλών «πελατών» της Hsp90 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Akt*». Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα (2009)
- Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε. «*Αναστολή πολλαπλών σηματοδοτικών μηχανισμών από το 17-AAG σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης*». Συνεδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα (2009)

Συμμετοχές σε Διεθνή Συνέδρια

- 10th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Patra (2006).
- 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki (2009).
- 1st International Conference on Molecular Cancer Research, Athens (2009).

Αναρτήσεις σε Διεθνή Συνέδρια

- Giokas S., Katsakiozi P., Karkoulis P., Pafilis P. & Valakos E.D. "*How variable are the seasonal ecophysiological adaptations of land snails in semi-arid ecosystems?"* 10th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Patra (2006).
- Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Konstantakou E.G., Melachroinou S., Anastasiou D., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E. *"Hsp90 drug targeting in bladder cancer cells"*. 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, Loutraki (2009).

Ομιλίες σε Διεθνή Συνέδρια

- Karkoulis P.K., Stravopodis D.J., Margaritis L.H. and Voutsinas G.E. *"Pharmacological targeting of Hsp90 molecular chaperone in human urinary bladder cancer cells"*. 1st International Conference on Molecular Cancer Research, Athens, Greece (2009).

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

- Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Margaritis LH and Voutsinas GE. "*17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells*". BMC Cancer. 2010 Sep 9; 10:481.
- Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Konstantakou EG, Margaritis LH and Voutsinas GE. "*Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cells*". (In preparation).
- Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Velentzas AD and Voutsinas GE. "*17-DMAG induces heat shock protein 90 functional impairment in human urinary bladder cancer cells; taking out pathological hallmark traits of malignancy*". (In preparation).
- Karkoulis PK, Stravopodis DJ, Konstantakou EG, Anastasiadou E, Tsangaris GTh and Voutsinas GE. "*The ripple effect paradigm: a proteome-wide approach of Hsp90 inhibition in human urinary bladder cancer cells*". (In preparation).
- Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Aravantinos G, Margaritis LH and Voutsinas GE. "*Thymidylate synthase inhibition induces p53-dependent and p53-independent apoptotic responses in human urinary bladder cancer cell lines*". J Cancer Res Clin Oncol. 2011 Feb; 137(2):359-74 28. Epub 2010 Apr 28.
- Konstantakou EG, Voutsinas GE, Karkoulis PK, Aravantinos G, Margaritis LH and Stravopodis DJ. "*Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses".* Int J Oncology, 2009 Aug; 35(2):401-16.
- Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Lampidonis AD, Anastasiou D, Kachrilas S, Messini-Nikolaki N, Papassideri IS, Aravantinos G, Margaritis LH and Voutsinas GE "*Grade-dependent regulation of cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines".* Int J Oncology, 2009 Jan; 34(1):137-60.

- Giokas S, Karkoulis P, Pafilis P and Valakos ED "*Relictual physiological ecology in the threatened land snail Codrigtonia helenae: a cause for decline in a changing environment?"* Acta Oecologica. 2007 Jul, 32:269-278.

Ενδιαφέροντα - Δραστηριότητες

- Αθλητισμός
- Μουσική - Κινηματογράφος