ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ &
ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

«Μελέτη της πρωτεασωμικής λειτουργίας σε ασθενείς πολλαπλού μυελώματος μετά τη χορήγηση θεραπευτικών πρωτεασωμικών αναστολέων»

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Ειδίκευσης
«Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική»

Μηνάγια Μαρία
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ
ΑΜ: 225618

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη

Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Μαριάννα Χ. Αντώνελου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Η διπλωματική εργασία με θέμα «Μελέτη της πρωτεασωμικής λειτουργίας σε ασθενείς πολλαπλού μυελώματος μετά τη χορήγηση θεραπευτικών πρωτεασωμικών αναστολέων» πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική». Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου, στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, στο Τμήμα Βιολογίας, του ΕΚΠΑ.

Θα ήθελα αρχικά, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τρουγκάκο, υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ πάνω στο συγκεκριμένο θέμα και μου προσέφερε όλη τη γνώση και τα εφόδια για να την ολοκληρώσω. Από την πρώτη στιγμή με αντιμετώπισε σαν μέλος της ομάδας του και ήταν δίπλα μου σε ότι χρειαζόμουν τόσο με τις συμβουλές του, όσο και με την εμπειρία του.

Επίσης, να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Παπασιδέρη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Αντωνέλου για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλης της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και για την υποστήριξη και τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Παράλληλα, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή της Πανεπιστημιακής ογκολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα, Αθανάσιο Μ. Δημόπουλο καθώς και την ερευνητική του ομάδα για την πολύτιμη συνεισφορά τους στο πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής.

Εξίσου, θερμές ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου γιατί ανέλαβε να μου μεταδώσει όλα όσα ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση της εργασίας μου και ακόμα περισσότερα. Την ευχαριστώ για όλο τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, τη βαθιά υπομονή που έδειξε, τη βοήθειά της σε ότι και αν ζητούσα, την καλοσύνη της και πάνω από όλα για την υποστήριξή της.

Ευχαριστώ την Ελένη, την Άννα, τη Χριστίνα, την Αιμιλία, τη Ζωή, τη Μαριλού, τη Δέσποινα και τον Διονύση για τη βοήθεια τους, το πολύ όμορφο και υποστηρικτικό κλίμα καθώς και για όσα μου έμαθαν. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου και τους φίλους μου, διότι με τη δική τους στήριξη και αγάπη κατάφερα να φτάσω ως εδώ.

Περίληψη

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί μια αιματολογική κακοήθεια που προκύπτει από τον μετασχηματισμό των Β-λεμφοκυττάρων σε κλώνο παθολογικών πλασματοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης (IgG). Μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση είναι αυτή της στόχευσης του πρωτεασώματος με τη χρήση διαφόρων ειδικών αναστολέων. Οι αναστολείς πρωτεασώματος είναι μικρά μόρια τα οποία προσδένονται στις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος και έτσι παρεμποδίζουν τη φυσιολογική του λειτουργία. Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος οδηγεί στη συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο των μυελωματικών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης και της γονιδιακής έκφρασης (επιπέδων mRNA και πρωτεϊνική) των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε ασθενείς με ΠΜ που έλαβαν ως θεραπεία τον πρωτεασωμικό αναστολέα carfilzomib (CFZ). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από τους ασθενείς σε διάφορα σημεία του κύκλου θεραπείας τους με παράλληλη απομόνωση ερυθροκυττάρων (ΕΚ, κύτταρα με μακράς διάρκειας πρωτέωμα) και μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ, κύτταρα με δυνατότητα γενωμικής απόκρισης), με τελικό σκοπό την απομόνωση πρωτεασωμάτος, πρωτεϊνών και RNA.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ μειώθηκε σε όλους τους ασθενείς αμέσως μετά τη θεραπεία και οδήγησε σε μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες πυροδοτούν την έκφραση των συστατικών του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος προκειμένου να εξισορροπηθεί η ανασταλτική δραση του πρωτεασωμικού αναστολέα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία οδήγησε (στους περισσότερους ασθενείς) στην επαγωγή της έκφρασης των μοριακών συνοδών, των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως επίσης και της αυτοφαγίας με στόχο την επιβίωση του κυττάρου. Η ενεργοποίηση των επιπρόσθετων μονάδων του δικτύου πρωτεόστασης, όπως το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος μετά από την αναστολή του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, υποστηρίζεται και από τα

ευρήματα μας σχετικά με τα μειωμένα επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών σε χρονικά σημεία μειωμένης πρωτεασωμικής ενεργότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο υπολογισμός των επιπέδων των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων μετά από τη χορήγηση των πρωτεασωμικών αναστολέων είναι επιτακτικής ανάγκης, ώστε να προσαρμοστεί το δοσολογικό πρωτόκολλο οδηγώντας σε μία πιο εξατομικευμένη θεραπεία. Επιπλέον, προτείνεται ότι η συσχέτιση μεταξύ της μεταγραφικής ρύθμισης της αυτοφαγίας, των αντιοξειδωτικών ενζύμων, των μοριακών συνοδών και των μεταγραφικών παραγόντων της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες με τα κλινικά αποτελέσματα των ασθενών, όπως είναι η ολική επιβίωση και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου, θα μπορούσε να οδηγήσει στην εύρεση προγνωστικών δεικτών και την ανάπτυξη συνδυαστικών θεραπειών.

Abstract

Multiple Myeloma (MM) is a hematological malignancy caused by the transformation of B-lymphocytes into pathological clonal plasma cells that accumulate in the bone marrow and secrete high amounts of monoclonal immunoglobulin (IgG). A promising therapeutic approach is to target the proteasome, using various proteasome inhibitors (PIs). PIs are short peptides that bind to the catalytic sites of proteasome subunits and thus prevent proper proteasome function. Proteasome dysfunction leads to the accumulation of unfolded proteins and results in disproportionate apoptosis of myeloma cells.

Herein, we studied proteasome regulation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs; represent cell lineages with active genomic responses), and red blood cells (RBCs; represent an anucleate relatively "long-lived" proteome) isolated from MM patients treated with Carfilzomib.

Our findings showed that proteasome activity in both PBMCs and RBCs was immediately suppressed after PI treatment in all patients, resulted in gene expression increase of ubiquitin-proteasome system components, in order to overcome the inhibitory effect of PIs. In addition, it was found that PIs led in induction of the expression levels of antioxidant enzymes, chaperones and aggresomes removal/autophagy components. The activation of additional PN modules upon proteasome inhibition is supported by our finding of minimal correlation between the levels of proteome ubiquitination/carbonylation in PBMCs and the level of proteasome activity downregulation.

Considering the above, we conclude that the measurement of proteasome activities after administration of PIs is a matter of necessity in order to adjust the dosage protocol for a more personalized therapeutic approach. In addition, we propose that a correlation between the transcriptional regulation of autophagy, antioxidant enzymes, molecular chaperones and patients' clinical outcomes, such as overall survival and progression-free survival, could reveal possible prognostic markers in order to evaluate and develop combination therapy for MM patients.

I. Εισαγωγή

1. Το δίκτυο πρωτεόστασης

Η ομοιόσταση του πρωτεώματος (πρωτεόσταση) είναι κρίσιμη για την κυτταρική λειτουργικότητα και συνεπώς για την υγεία του οργανισμού. Τα πολυάριθμα κυτταρικά πολυπεπτίδια και οι πρωτεϊνικές μηχανές μπορούν να ρυθμισθούν είτε μέσω αυστηρά ελεγχόμενων ενζυμικών τροποποιήσεων (φωσφωρυλίωση, ακετυλίωση, ουβικιτινιλίωση), είτε μέσω στοχαστικών μη ενζυματικών τροποποιήσεων (οξείδωση πρωτεϊνών, γλυκοζυλίωση) (Nedic et al., 2013). Οι πρωτεΐνες που τροποποιούνται ενζυματικά παραμένουν πλήρως λειτουργικές σε αντίθεση με τις μη ενζυματικές τροποποιήσεις, οι οποίες προκαλούν λανθασμένο δίπλωμα ή ξεδίπλωμα στις πρωτεΐνες καταλήγοντας σε αυξημένη πρωτεωμική αστάθεια.

Για να διατηρηθεί η πρωτεόσταση, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ολοκληρωμένο σύστημα που εξασφαλίζει το γενικότερο έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος, το οποίο καλείται δίκτυο πρωτεόστασης (proteostasis network, PN) και έχει ως στόχο την επιδιόρθωση, όταν είναι εφικτό, ή την αποικοδόμηση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Morimoto 2008; Trougakos et al., 2013; Niforou et al., 2014). Το PN αποτελείται από τους ακόλουθους ρυθμιστές: τη μηχανή πρωτεϊνοσύνθεσης, το σύστημα απόκρισης σε μη σωστό δίπλωμα πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR), ένα σύνολο εξωκυττάριων και ενδοκυττάριων μοριακών συνοδών, καθώς και τα δύο κύρια πρωτεολυτικά συστήματα, το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) και το σύστημα αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Autophagy-Lysosome System, ALS) (Trougakos et al., 2013; Niforou et al., 2014; Tsakiri and Trougakos, 2015). Συνεπώς, είναι εξέχουσας σημασίας η επικοινωνία μεταξύ των διάφορων μορίων του PN για τη διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης και της σταθερότητας του πρωτεώματος (Trougakos et al., 2013).

Αναλυτικότερα το ALS εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής, των συσσωματωμάτων ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών και στην ανακύκλωση κατεστραμμένων οργανιδίων (Jankowska et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, το UPS αποκαθιστά την πρωτεωμική σταθερότητα σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στον πυρήνα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, ακόμα και στον εξωκυττάριο χώρο. Ως εκ τούτου, το UPS είναι το κύριο σημείο ελέγχου της ποιότητας του κυτταρικού πρωτεώματος και εμπλέκεται επίσης

στην ανακύκλωση τόσο των πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημιζωής, όσο και των μη σωστά διπλωμένων ή μη διπλωμένων πρωτεϊνών (Baker et al., 2011). Τα επίπεδα έκφρασης και η δράση του ρυθμίζονται αυστηρά σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού και πρωτεοτοξικού στρες.

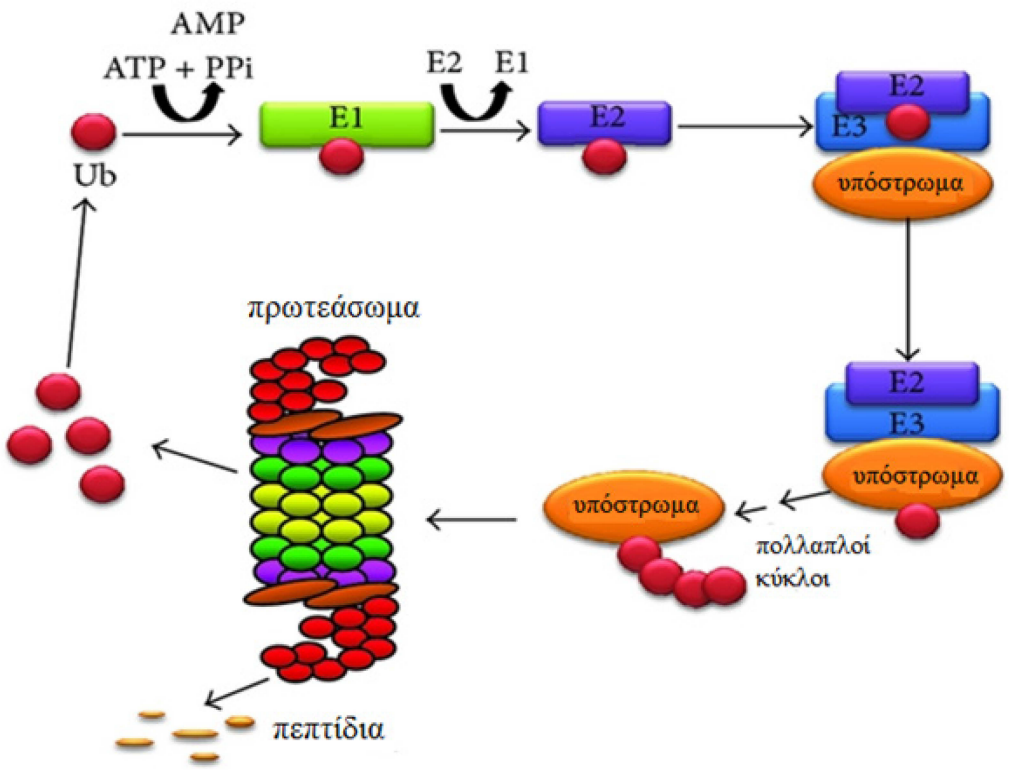
1.1 Το σύστημα ουβικιτίνης

Η ουβικιτίνη είναι μια πρωτεΐνη 76 αμινοξέων και εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αν και απουσιάζει από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν ορισμένες βακτηριακές πρωτεΐνες που εμφανίζουν λειτουργικές και δομικές ομοιότητες με τα συστατικά του συστήματος ουβικιτίνης (Lehmann et al., 2006). Η ουβικιτίνη σχηματίζει διαφορετικές αλυσίδες που συνδέονται μέσω των επτά καταλοίπων λυσίνης της, της λυσίνης (Lys-K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 και 63. Επιπλέον, η ουβικιτίνη μπορεί να συνδεθεί μέσω της αμινοτελικής μεθειονίνης της και του καρβοξυτελικού άκρου μιας άλλης ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη συνδέεται σε άλλες πρωτεΐνες είτε ως μονομερές, είτε ως αλυσίδα πολυουβικιτίνης μέσω ενζυματικών αντιδράσεων, διαδικασία που ονομάζεται ουβικιτινιλίωση, ρυθμίζοντας έτσι τη «μοίρα» των τροποποιημένων υποστρωμάτων στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων του πυρήνα και του κυτοσολίου. (von Mikecz, 2006). Η «μοίρα» της πρωτεΐνης που θα υποσθεί την τροποποίηση αυτή διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλυσίδας που της προστίθεται. Για παράδειγμα, η ουβικιτινιλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης 11 σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, σε λυσίνη 48 με την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και σε λυσίνη 63 με την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, την αντιγραφή και τη μεταγωγή σήματος (Ikeda et al., 2010).

1.2 Τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτίνης

Η σύζευξη της ουβικιτίνης σε πολυπεπτίδια είναι ATP-εξαρτώμενη και μεσολαβείται από μια σειρά ενζύμων. Ειδικότερα, η ουβικιτίνη μεταφέρεται με κατανάλωση ενέργειας στο ενεργό κέντρο ενός κατάλοιπου κυστεΐνης του ενζύμου που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη, το E1. Η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη, στη συνέχεια, μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο μιας άλλης οικογένειας ενζύμων που καταλύουν τη σύζευξη των ουβικιτινών, το E2. Στο τέλος, οι E3 λιγάσες της ουβικιτίνης συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού κατάλοιπου γλυκίνης της ουβικιτίνης με

την e-αμινομάδα μιας εσωτερικής λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου (Hershko and Ciechanover, 1998).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας πρωτεϊνικής αποικοδόμησης μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Προσαρμοσμένη από Gomes 2013)

Η απελευθέρωση της ουβικιτίνης από τα διάφορα προϊόντα της είναι κρίσιμη τόσο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών όσο και για τη βιοσύνθεσή της. Τα ένζυμα από-ουβικιτινιλίωσης (deubiquitinating enzymes, DUBs) διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία. Πρόκειται για μικρές πρωτεΐνες που υδρολύουν μικρά αμίδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης (Amerik and Hochstrasser, 2004). Έτσι, συμμετέχουν στην επεξεργασία των ανενεργών ουβικιτινών, στην επιδιόρθωση του συζεύγματος ουβικιτίνης-πρωτεΐνης, στην απομάκρυνση της ουβικιτίνης από τα προϊόντα προσθήκης της, καθώς και στη διατήρηση του 26S πρωτεασώματος ελεύθερου από ανασταλτικές αλυσίδες ουβικιτίνης.

1.3 Το πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη και πολύπλοκη κυτταρική μηχανή με μοριακό βάρος της τάξης των 2.5 MDa, που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες της κυτταρικής ομοιοδυναμικής και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο (core particle-CP) και ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια (regulatory particles-RP) τα οποία συνδέονται στα άκρα του καταλυτικού κέντρου (Saeki and Tanaka, 2012; Liu and Jacobson, 2013). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα (Ciechanover et al., 2000; Pickart, 2000). Αντίθετα, η δράση του 20S πρωτεασώματος εστιάζεται στην αποικοδόμηση μη διπλωμένων, μη σωστά διπλωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών, καθώς και μη φυσικών πεπτιδίων (Hohn and Grune, 2014)

1.3.1 Το 20S καταλυτικό σωματίδιο

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το 20S καταλυτικό κέντρο αποτελείται από 28 α- και β-τύπου υπομονάδες που οργανώνονται σε τέσσερεις δακτυλίους (Maupin-Furlow 2013). Οι εσωτερικοί δακτύλιοι απαρτίζονται από β υπομονάδες (β1-7) και οι εξωτερικοί από α υπομονάδες (α1-7). Το 20S έχει μια κυλινδρική α-β-β-α οργάνωση που φέρει καταλυτικά κέντρα με τρεις ενεργότητες πεπτιδασών (Groll et al.,1997). Ειδικότερα, οι πρωτεολυτικές αυτές ενεργότητες βρίσκονται στους εσωτερικούς δακτυλίους, όπου η β1, β2 και β5 υπομονάδες παρουσιάζουν ενεργότητες κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, αντίστοιχα (Groll and Clausen, 2003). Η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης πρωτολύει έπειτα από υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων, ενώ οι ενεργότητες κασπάσης και θρυψίνης μετά από όξινα και βασικά κατάλοιπα, αντίστοιχα (Arendt and Hochstrasser, 1997). Οι α υπομονάδες στερούνται πρωτεολυτικής ενεργότητας και για αυτό το λόγο θεωρούνται ρυθμιστικές υπομονάδες (Groll and Clausen, 2003), καθώς το αμινοτελικό τους άκρο οργανώνεται μέσα στην πύλη του κεντρικού θαλάμου του δακτυλίου ρυθμίζοντας την είσοδο των μη διπλωμένων από-ουβικιτινιλιωμένων πολυπεπτιδίων στο κεντρικό πρωτεολυτικό θάλαμο (Kunjappu and Hochstrasser, 2014).

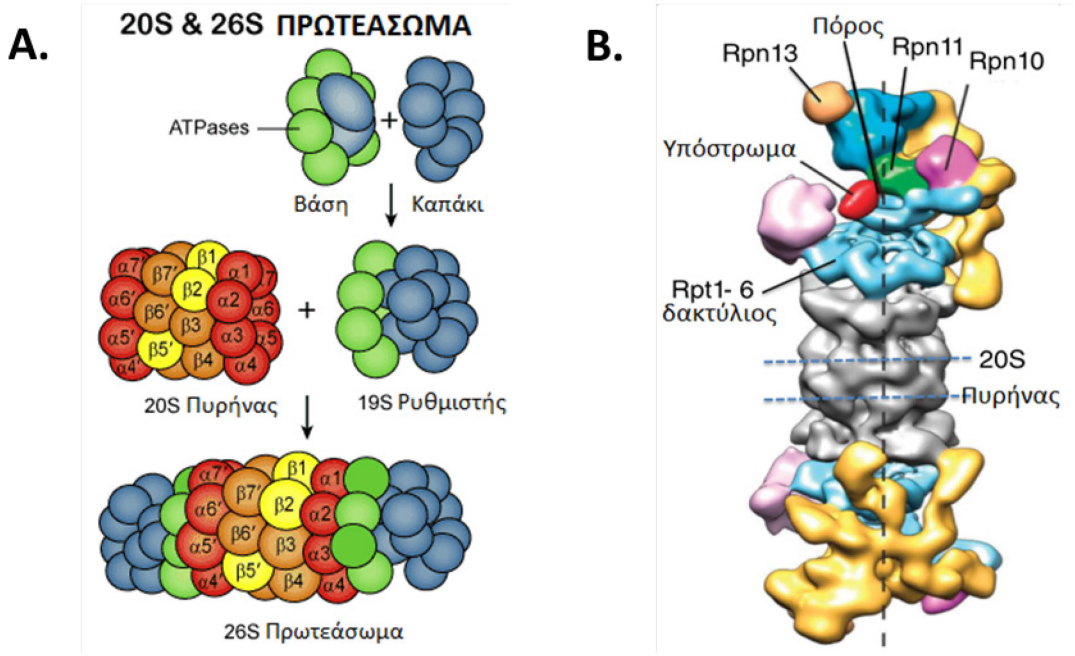
Η συναρμολόγηση του 20S τμήματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία απαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών ή την αυτό-συναρμολόγηση των υπομονάδων, καθώς και την ωρίμαση των β υπομονάδων (Kunjappu and Hochstrasser, 2014). Το πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός ενός επταμερούς δακτυλίου

με α υπομονάδες με τη βοήθεια παραγόντων που ρυθμίζουν τη σωστή οργάνωση (Stadtmueller et al., 2012). Έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός προωθείται από δύο ετεροδιμερείς μοριακές συνοδούς, την PAC1/PAC2 και την PAC3/PAC4 (Hirano et al., 2005). Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του α δακτυλίου, η POMP1 (Proteasome maturation protein1) πρωτεΐνη προωθεί τη μετατόπιση του συμπλόκου PAC3/PAC4 και τη συναρμολόγηση των β υπομονάδων μέσα στους α δακτυλίους. Ο σχηματισμός των β δακτυλίων ξεκινάει με την β2 υπομονάδα και την POMP1 (Yashiroda et al., 2008). Παρόλο που τα προπεπτίδια όλων των β υπομονάδων συνεισφέρουν στον σχηματισμό του 20S κεντρικού τμήματος, το προπεπτίδιο της β5 υπομονάδας είναι κρίσιμο, καθώς φαίνεται να ασκεί δράση μοριακής συνοδού (Ramos et al., 1998). Στο τελικό βήμα, η συναρμολόγηση του 20S ολοκληρώνεται με την αυτόλυση των προπεπτιδίων των β υπομονάδων και την αποικοδόμηση της POMP1 και της PAC1/PAC2 από το ενεργοποιημένο 20S πρωτεάσωμα (Ramos et al., 1998; Hirano et al., 2005,). Η πύλη του 20S πρωτεασώματος παραμένει κλειστή από τα αμινοτελικά άκρα των α-υπομονάδων και ανοίγει με τη ρυθμιστική δράση του 19S τμήματος (Groll et al., 2000).

1.3.2 Το 19S ρυθμιστικό σωματίδιο

Το 19S ρυθμιστικό μόριο αποτελείται από 19 υπομονάδες οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα (Liu and Jacobson, 2013). Συγκεκριμένα, αναγνωρίζει τη σημασμένη με ουβικιτίνη πρωτεΐνη στόχο και τη μεταφέρει στον καταλυτικό πυρήνα. Η βάση αποτελείται από έξι ATPάσες τύπου AAA, τις RPT1-6, και από τρεις υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες, τις RPN1, RPN2 και RPN13 (Tanaka, 2013). Το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες με διακριτή αλληλουχία, δομή και λειτουργία, τις RPN3, RPN5-9, RPN11, RPN12 και RPN15. Η βάση και το κάλυμμα συνδέονται με την βοήθεια του μορίου RPN10 σχηματίζοντας έτσι το 19S ρυθμιστικό τμήμα. Οι υπομονάδες RPN13 και RPN10 δρουν ως υποδοχείς πολυουβικιτίνης, ενώ η υπομονάδα RPN11 φέρει ενεργότητα απο-ουβικιτινάσης (Lander et al., 2012). Το 26S πρωτεάσωμα καταστρέφει κυρίως πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη. Η επιλογή αυτών γίνεται από το ένα εκ των δύο 19S μορίων (Glickman and Ciechanover, 2002). Αντίθετα, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός λειτουργεί χωρίς τη διαμεσολάβηση της

ουβικιτίνης και φαίνεται να συμμετέχει στην αποικοδόμηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Shringarpure et al., 2003).



Εικόνα 2. Α. Σχηματική απεικόνιση της δομής του 20S και 26S πρωτεασώματος (Προσαρμοσμέμη από BostonBiochem®), Β. Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους υπομονάδων που απαρτίζουν το 26S πρωτεάσωμα καθώς και της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (Προσαρμοσμένη από Deshaies, 2014).

1.3.3 Εναλλακτικές μορφές του πρωτεασώματος

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος μπορεί να διαμορφωθεί με την αντιστρεπτή σύνδεση διάφορων ρυθμιστικών τμημάτων. Έχουν αναγνωρισθεί άλλα δύο ρυθμιστικά μόρια, το 11S και το PA200. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι τα τμήματα αυτά μπορούν να συνδεθούν στο 20S καταλυτικό κέντρο ασύμμετρα και να σχηματίσουν υβριδικά πρωτεασώματα. Εναλλακτικά, μπορεί να συνδεθεί μόνο ένα ρυθμιστικό μόριο και η άλλη πλευρά του 20S να παραμείνει ασύνδετη.

Η 11S υπομονάδα έχει την ικανότητα παρουσία ιντερφερόνης-γ να προσδένεται στη θέση ενός συμπλόκου 19S στο 20S πρωτεάσωμα, δημιουργώντας έτσι ένα υβριδικό 19S:20S:11S πρωτεάσωμα (Tanahashi et al., 2000). Το πρωτεάσωμα που προκύπτει καλείται ανοσοπρωτεάσωμα και εμπλέκεται στην επεξεργασία ενδοκυτταρικών αντιγόνων και την παρουσίασή τους από MHC μόρια τάξης I (Barton et al., 2002). Το 11S είναι επταμερές και δεν περιέχει ATP-άσες, ενώ μπορεί να επάγει πρωτεόλυση μικρών πεπτιδίων (για παράδειγμα ιϊκών πεπτιδίων), αλλά και

οξειδωμένων υποστρωμάτων, όχι όμως ολόκληρων πρωτεϊνών αφού δε δύναται να τις ξεδιπλώσει (Förster et al., 2005). Στο ανοσοπρωτεάσωμα οι καταλυτικές υπομονάδες β1, β2 και β5, αντικαθίστανται από τις ανοσο-υπομονάδες β1i, β2i, και β5i οι οποίες επάγονται από την ιντερφερόνη -γ (Kimura et al., 2009).

Το PA200 ρυθμιστικό μόριο ενισχύει την υδρόλυση των πεπτιδίων, αλλά στην πραγματικότητα μειώνει την ενεργότητα του 20S πρωτεασώματος απέναντι στις άθικτες πρωτεΐνες (Pickering and Davies, 2012). Συνδέεται στον έναν ή και στους δύο α-δακτυλίους και αυξάνει το άνοιγμα για τον πρωτεολυτικό θάλαμο (Ortega et al., 2005).

Τέλος, μία ακόμη εναλλακτική μορφή πρωτεασώματος αποτελεί το θυμοπρωτεάσωμα που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού του θύμου αδένα και το οποίο περιέχει την καταλυτική υπομονάδα β5t. Το θυμοπρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των CD8 Τ-κυττάρων και στην διαδικασία της θετικής επιλογής των Τ κλώνων, δημιουργώντας πεπτίδια (Tanaka, 2013).

1.4 Η μεταγραφική ρύθμιση του πρωτεασώματος

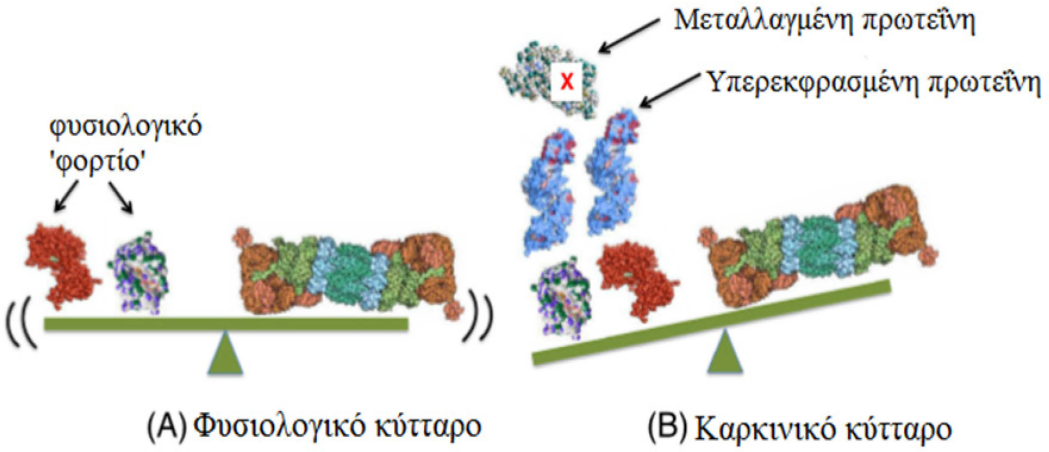
Έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος, παρατηρείται μια συντονισμένη *de novo* σύνθεση των υπομονάδων του 26S πρωτεασώματος και ταυτόχρονη συναρμολόγηση του (Li et al., 2011; Meiners et al., 2003). Στα θηλαστικά έχει δειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NRF1 (nuclear factor erythroid 2-related factor 1) είναι απαραίτητος για την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από την αναστολή του πρωτεασώματος (Radhakrishnan et al., 2010). Ο NRF1 ουβικιτινιλιώνεται από περισσότερες από μία Ε3 λιγάσες ουβικιτίνης και πιθανώς αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (Steffen et al., 2010). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο NRF1 είναι συνδεδεμένος στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ελευθέρωση και η μετατόπιση του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής απαιτεί την απογλυκοζυλίωση του, την ουβικιτινιλίωση του και τη μερική αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Η προσθήκη μικρής συγκέντρωσης πρωτεασωμικού αναστολέα έχει ως αποτέλεσμα την επεξεργασία του NRF1 και τη μετατόπιση του στον πυρήνα, την αυξημένη ρύθμιση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με το πρωτεάσωμα, ενώ τέτοια απόκριση δε συμβαίνει παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αναστολέων. Σε απουσία αναστολέα, ο NRF1 αποικοδομείται ταχέως (Sha et al., 2014).

Ο NRF1 και ο NRF2 είναι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response elements, AREs) στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Μελέτες έδειξαν ότι γονίδια των πρωτεασωμικών υπομονάδων φέρουν τα AREs στους υποκινητές τους, δηλώνοντας ίσως ότι η αυξημένη ρύθμιση του πρωτεασώματος που μεσολαβείται από τον NRF1 και έπεται της αναστολής του, οφείλεται στη σύνδεση του NRF1 στα στοιχεία αυτά (Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010). Ο NRF2 είναι και αυτός υπόστρωμα για το UPS. Υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1, που χρησιμεύει ως συστατικό για την αναγνώριση του από την Ε3 λιγάση της ουβικιτίνης. Η λιγάση ουβικιτινιλιώνει τον NRF2, στοχεύοντας τον προς πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Η αυξημένη ρύθμιση του NRF2 κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες πιστεύεται ότι εκδηλώνεται με την αποσύνδεση του από τον Keap1 παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης οξειδωτικού στρες και καταλήγει στη σταθεροποίηση και μετατόπιση του στον πυρήνα, εκεί όπου επάγει τη μεταγραφή των πρωτεασωμικών γονιδίων (Malloy et al., 2013).

1.5 Πρωτεοτοξικό στρες, UPS και καρκίνος

Αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλή εξάρτηση από τους μηχανισμούς πρωτεόστασης (Balch et al., 2008), συμπεριλαμβανομένου και του UPS. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος αποκάλυψε ότι τα καρκινικά γονιδιώματα φέρουν δεκάδες έως εκατοντάδες σημειακές μεταλλαγές σε κωδικές αλληλουχίες πρωτεϊνών (Vogelstein et al., 2013). Πολλές από αυτές τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις αναφορικά με την αναδίπλωση τους, καταλήγοντας στην αυξημένη αποικοδόμηση τους μέσω του πρωτεασώματος. Επιπλέον, τα καρκινικά γονιδιώματα συχνά περιέχουν μεγάλους διπλασιασμούς, διαγραφές, αναστροφές και μεταθέσεις, καθώς και διαφορετικό αριθμό αντιγράφων ολόκληρων χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία). Εκτιμάται ότι περισσότεροι από το 90% των ανθρώπινων όγκων περιέχουν κύτταρα με πάνω από δύο αντίγραφα ενός ή και περισσότερων χρωμοσωμάτων (Weaver et al., 2006). Τα επιπλέον χρωμοσώματα συνεχίζουν να εκφράζονται και συνεπώς η πρωτεϊνική σύνθεση σε αυτά τα κύτταρα διαταράσσεται καθώς παράγεται περίσσεια πρωτεϊνών (Williams et al., 2008). Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν στοιχειομετρικά σύμπλοκα όπως είναι τα ριβοσώματα. Σε τέτοιες περιπτώσεις η περίσσεια των πρωτεϊνών σχεδόν πάντα δε μπορεί να διατηρήσει μια σταθερή διαμόρφωση, με

αποτέλεσμα να αποικοδομούνται στο UPS (Dephoure et al., 2014). Θεωρητικά, αυτό το γεγονός δημιουργεί στα καρκινικά κύτταρα μια υψηλή εξάρτηση στους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου όπως είναι το δίκτυο των μοριακών συνοδών, το UPS και η αυτοφαγία (Guo et al., 2013). Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι οι παράγοντες που αναστέλλουν τα μονοπάτια του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών θα πρέπει να είναι πιο τοξικοί στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, και ίσως χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία μιας ευρείας ποικιλίας καρκίνων.



Εικόνα 3. Πρωτεοτοξική κρίση στα καρκινικά κύτταρα. (A) Στα φυσιολογικά κύτταρα, το φορτίο των υποστρωμάτων για αποικοδόμηση βρίσκεται σε ισορροπία με την ικανότητα αποικοδόμησης από το UPS. (B) Στα καρκινικά κύτταρα το φορτίο είναι αυξημένο λόγω της έκφρασης **μεταλλαγμένων** πρωτεινών ή/και της έκφρασης περίσσειας πρωτεινών που οφείλεται στην ανευπλοειδία. Έτσι το σύστημα οδηγείται σε ανισορροπία, όπου το φορτίο προς αποικοδόμηση υπερβαίνει τη λειτουργία του UPS (Προσαρμοσμένη από Deshaies, 2014)

1.6 Μηχανισμός δράσης των πρωτεασωμικών αναστολέων

Οι αναστολείς πρωτεασώματος ασκούν την αντινεοπλασματική τους δράση μέσω στόχευσης στον καταλυτικό πυρήνα (20S) του 26S πρωτεασώματος, του ενζυμικού συμπλόκου που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών (Jain et al., 2011). Όπως ήδη αναφέρθηκε, το κεντρικό και καταλυτικό τμήμα του πρωτεασώματος εμπεριέχει πρωτεολυτικές ενεργότητες χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και κασπάσης και στοχεύει πρωτεΐνες με ουβικιτίνο-εξαρτώμενο τρόπο. Η ενεργότητα χυμοθρυψίνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, ενώ μπορεί εύκολα να στοχευθεί περιορίζοντας έτσι το ρυθμό της πρωτεολυτικής διαδικασίας (Bennett and Kirk,

2008). Οι συνέπειες της αναστολής του πρωτεασώματος περιλαμβάνουν 1) τη συσσώρευση μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, γεγονός που οδηγεί σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, 2) την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, 3) την αναστολή του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, το οποίο ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωση, 4) την σταθεροποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και των ογκοκατασταλτικών γονιδιακών προϊόντων, καθώς και την απορρύθμιση των κυκλινών, των κινασών των κυκλινών και των αναστολέων τους (Hideshima and Anderson, 2012).

2. Πολλαπλούν Μυέλωμα

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί μία αιματολογική κακοήθη νεοπλασία των Β κυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μονόκλωνων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν τα αντισώματα, στην περίπτωση όμως του ΠΜ υφίστανται κακοήθη εξαλλαγή με αποτέλεσμα να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα παράγουν αντισώματα ή και απλά τμήματα αντισωμάτων, τις λεγόμενες παραπρωτεϊνες, οι οποίες παράγονται από τον ίδιο κλώνο πλασματοκυττάρων και για το λόγο αυτό ονομάζονται μονοκλωνικές. Ο πολλαπλασιασμός των μη φυσιολογικών πλασματοκύτταρων μέσα στο μυελό των οστών οδηγεί σε διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του, δηλαδή σε διαταραχή της ομαλής ανάπτυξης και ωρίμανσης των αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναιμίας ή θρομβοκυτταροπενίας (έλλειψη αιμοπεταλίων).

Το ΠΜ αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες αιματολογικές κακοήθειες (δεύτερη πιο συχνή στις Ηνωμένες Πολιτείες), ενώ συνιστά το 1% όλων των καρκινικών τύπων (Raab et al., 2009). Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 69 έτη, με τα τρία τέταρτα των ασθενών να είναι ηλικίας πάνω από 55 ετών και οι δύο στους τρεις ασθενείς να είναι άντρες. Φαίνεται επίσης πως είναι πλέον κοινό σε Αφρο-αμερικανούς και σπάνιο σε Αμερικανούς ασιατικής καταγωγής, με την αιτία αυτή της διαφοράς να είναι άγνωστη (Landgren et al., 2006). Με την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών και τη βελτίωση της ήδη ισχύουσας θεραπείας, η μέση επιβίωση των ασθενών αυξήθηκε από τρία σε έξι έτη τις δύο τελευταίες δεκαετίες.

Το ΠΜ μπορεί να υφίσταται επί σειρά ετών χωρίς εμφανή συμπτώματα ασθένειας. Κατά κανόνα, τα περισσότερα συμπτώματα δεν εμφανίζονται παρά μόνο αφού η

ασθένεια υφίσταται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ δύναται να προκύψει *de novo*, είτε να εξελιχθεί από την κατάσταση της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας ακαθόριστης σημασίας (Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS). Η ΜΓΑΣ χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα πλασματοκυττάρωσης στο μυελό των οστών και IgM ανοσοσφαιρίνης, ενώ απουσιάζουν οι οστεολυτικές βλάβες, η αναιμία, η υπερασβεστιαιμία και η δυσλειτουργία των νεφρών που παρουσιάζονται σε ασθενείς με ΠΜ. (Agarwal and Ghobrial, 2013). Όταν το ποσοστό των κακόηθων πλασματοκυττάρων [διακρίνονται από τον συνδυασμό επιφανειακών δεικτών CD19-/CD56+/CD45-/CD38+, από τα αντίστοιχα φυσιολογικά (CD19+/CD56-/CD45+/CD38-)] είναι <10% όλων των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, η νόσος χαρακτηρίζεται ως ΜΓΑΣ. Όταν το ποσοστό των κακόηθων πλασματοκυττάρων υπερβαίνει το 10%, η πάθηση ορίζεται ως ΠΜ, το οποίο ταξινομείται σε δύο ομάδες, το ασυμπτωματικό ΠΜ και το συμπτωματικό, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία υπερασβεστιαιμίας, νεφρικής ανεπάρκειας, αναιμίας και λυτικών αλλοιώσεων στα οστά. Εκτιμάται ότι η ΜΓΑΣ εξελίσσεται σε ΠΜ με ρυθμό 1-2 % ετησίως (Barlogie et al., 2004; Rollig et al., 2015.).

Ειδικότερα, φαίνεται πως με την πρόοδο της νόσου, τα μυελωματικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να ανεξαρτητοποιούνται από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, να αναπτύσσονται και να επεκτείνονται εκτός αυτού, σχηματίζοντας εξωμυελικές αλλοιώσεις (πλασματοκύττωμα) ή να γίνονται λευχαιμικά (πλασματοκυτταρική λευχαιμία) στα τελικά στάδια. Συγκεκριμένα, η πορεία της νόσου περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1. μετασχηματισμός των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων σε ΜΓΑΣ, 2. εξέλιξη της ΜΓΑΣ σε ΠΜ και 3. εξέλιξη σε εξωμυελική νόσο.

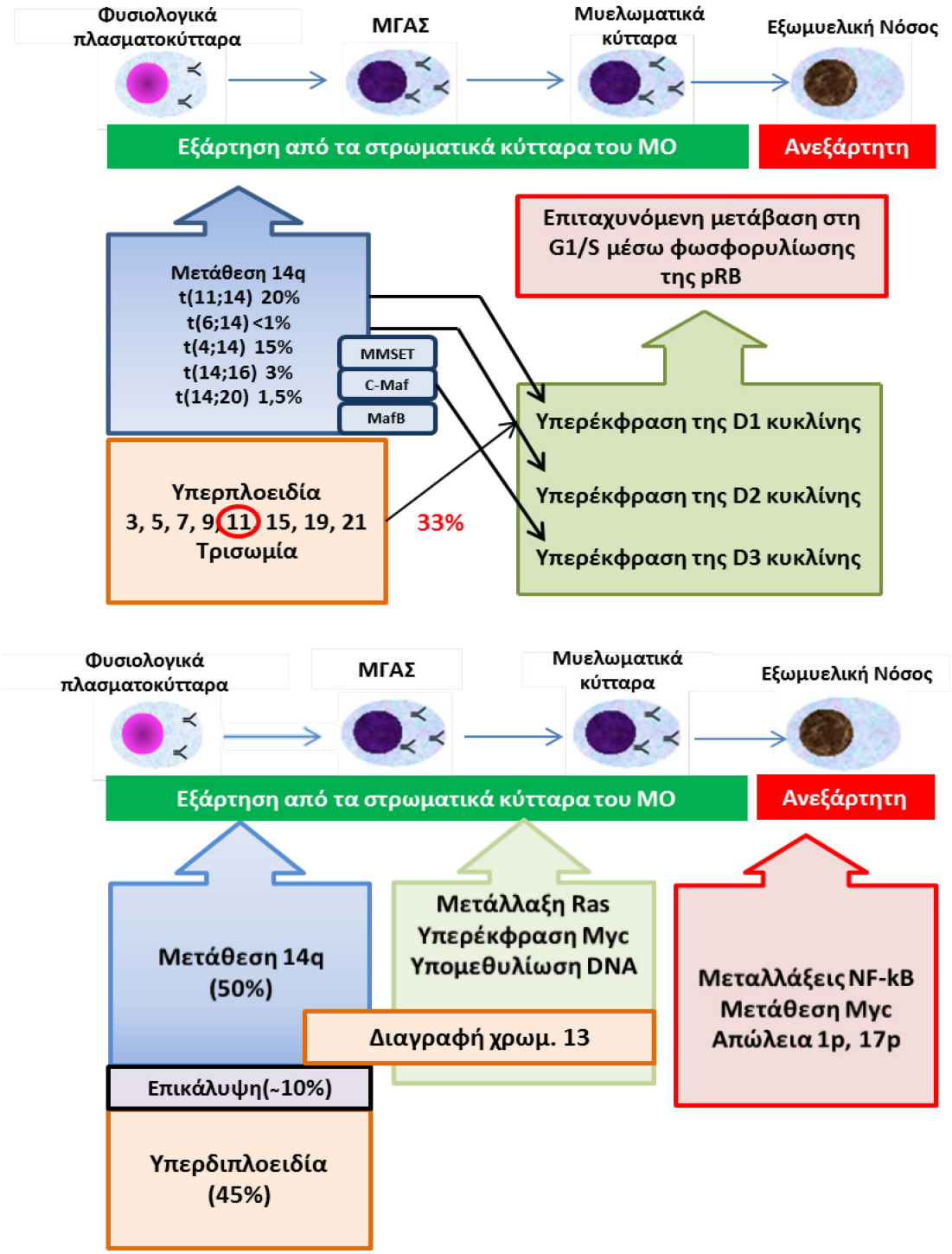
2.1 Παθογένεια και Στάδια της νόσου

Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα Β-κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί σωματικές υπερμεταλλάξεις και επιλογή τάξης με αποτέλεσμα να αποκτούν την ικανότητα παραγωγής ειδικών ανοσοσφαιρινών κατά την έκθεση τους σε αντιγόνα (Nutt et al., 2011; Pieper et al., 2013). Τα ενεργοποιημένα αυτά πλασματοκύτταρα σταματούν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και παραμένουν στο μυελό των οστών ως μακρόβια πλασματοκύτταρα ή στους λεμφαδένες ως Β-κύτταρα μνήμης μέχρι την επόμενη επαφή με τα αντιγόνα. Ως εκ τούτου, το αρχικό βήμα στην εξέλιξη του μυελώματος είναι να αποκτήσουν τα

πλασματοκύτταρα ή Β-κύτταρα μνήμης πλεονέκτημα ανάπτυξης. Αυτή η διαδικασία ολοκληρώνεται μέσω της απορρύθμισης των κυκλινών D μέσω δύο μηχανισμών. Οι κυκλίνες D αποτελούν έναν κρίσιμο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα του σημείου μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S . Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται μέσω δύο μηχανισμών.

Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τη δημιουργία συνεχών χρωμοσωμικών μεταθέσεων στο χρωμόσωμα 14q32 και συγκεκριμένα στο γονιδιακό τόπο της βαριάς αλυσίδας (IgH) (~50% των περιπτώσεων). Οι μεταθέσεις αυτές συμβαίνουν κυρίως κατά τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και τον ανασυνδυασμό για επιλογή τάξης (Walker et al., 2013). Η πιο συχνή χρωμοσωμική μετάθεση είναι η t(11;14)(p13;q32) (~15-20% των περιπτώσεων) (González et al., 2007), ακολουθούμενη από τη t(4;14)(p16;q32) (~12-15% των περιπτώσεων) (Chesi et al., 1997). Έχει παρατηρηθεί ότι στα μυελωματικά κύτταρα που φέρουν τις χρωμοσωμικές μεταθέσεις t(11;14) και t(6;14), οι κυκλίνες D1 και D3 αντίστοιχα ενεργοποιούνται άμεσα από τον ενισχυτή της IgH (Bergsagel et al., 2005). Ακόμα, στα μυελωματικά κύτταρα που φέρουν τη γονιδιακή μετάθεση t(4;14) έχει παρατηρηθεί ότι η μεθυλοτρανσφεράση της ιστόνης (η οποία επηρεάζεται και αυτή από τον ενισχυτή της IgH) επάγει την υπερέκφραση της κυκλίνης D2 (Martinez-Garcia et al., 2011). Ομοίως, ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης D2 παρατηρείται στα μυελωματικά κύτταρα με μετάθεση t(14;16) και t(14;20) από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Maf (Hurt et al., 2004).

Ο δεύτερος μηχανισμός της κακοήθους μεταλλαγής των πλασματοκυττάρων είναι η υπερδιπλοειδία, η οποία παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 55% των ασθενών, με το 10% αυτών να παρουσιάζουν και μεταθέσεις στο χρωμόσωμα 14. Συγκεκριμένα, η τρισωμία του χρωμοσώματος 11 καταλήγει σε ενισχυμένη έκφραση της κυκλίνης D1 εξαιτίας της αυξημένης ύπαρξης του γονιδίου της. Έτσι, η υπερέκφραση των γονιδίων της οικογένειας των κυκλινών D προσδίδουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στα μυελωματικά κύτταρα, καθώς επίσης επάγουν γενωμική αστάθεια που οδηγεί σε δευτερογενείς γενετικές ανωμαλίες (Smadja et al., 2001).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των γενετικών ανωμαλιών που σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος (ΜΟ:Μυελός των οστών) (Furukawa and Kikuchi, 2015).

Παρόλα αυτά, για να εξελιχθεί η ΜΓΑΣ σε ΠΜ, απαιτείται περαιτέρω αύξηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των μυελωματικών κυττάρων, καθώς η διαδικασία

αυτή χαρακτηρίζεται από ποσοτική αύξηση του αριθμού των κακόηθων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης δύο μείζονος σημασίας ογκογονιδίων, των *RAS* και *MYC*. Το *RAS* γονίδιο υπόκειται σε σημειακές μεταλλαγές (Lohr et al., 2014), ενώ το *MYC* υπερεκφράζεται, πιθανώς λόγω ενισχυμένης ενεργοποίησης της μεταγραφής του (Loven et al., 2013). Σε επόμενο στάδιο, παρατηρείται απώλεια του χρωμοσώματος 13, ένα κρίσιμο γεγονός το οποίο συμβάλλει στην περαιτέρω εξέλιξη της νόσου εξαιτίας της απώλειας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RB* καθώς και εξαιτίας της υπομεθυλίωσης του DNA η οποία προκαλεί γενωμική αστάθεια (Chiecchio et al., 2009).

Το τελικό στάδιο της εξέλιξης του ΠΜ χαρακτηρίζεται από την ικανότητα ανεξαρτητοποίησης των μυελωματικών κυττάρων από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αποτέλεσμα της προαναφερθείσας διεργασίας είναι η δημιουργία εξωμυελικής νόσου και πλασμοκυτταρικής λευχαιμίας εξαιτίας της ενεργοποίησης μεταλλαγμένων στοιχείων στο μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Demchenko et al., 2010), της δημιουργίας δομικών ανωμαλιών στο χρωμόσωμα που εντοπίζεται το *C-MYC* γονίδιο (Walker et al., 2014) καθώς και της απώλειας του 17p που καταλήγει σε απενεργοποίηση της P53 (Avet-Loiseau et al., 2012).

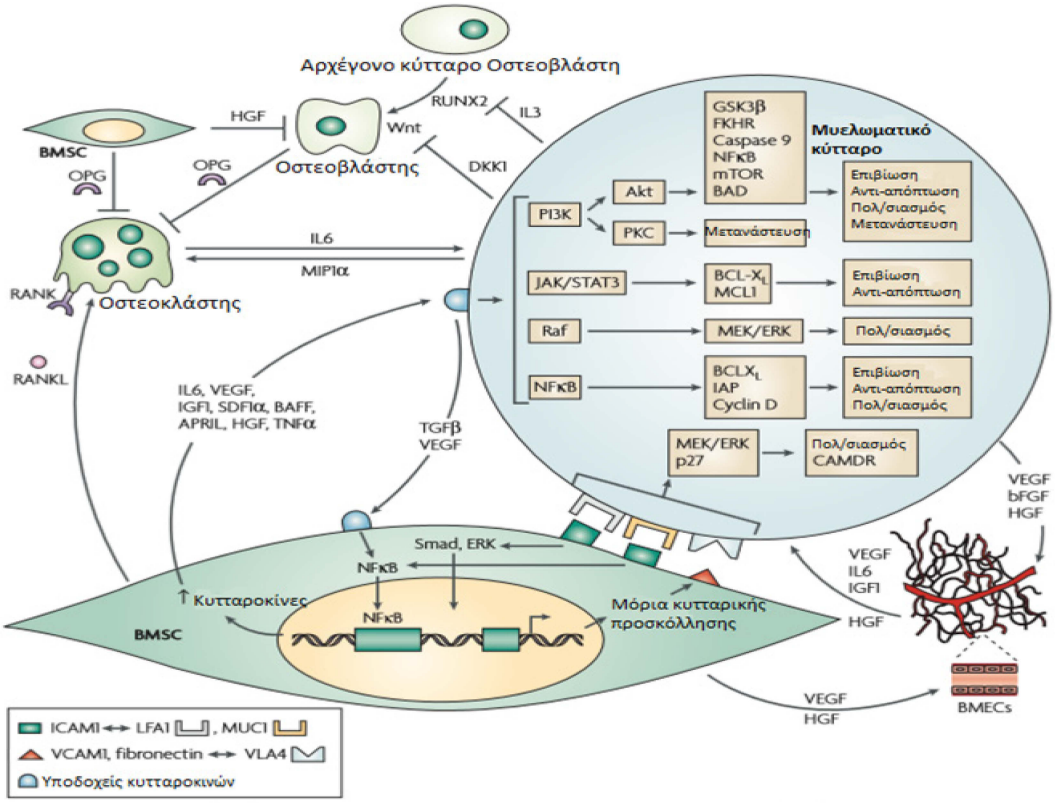
2.2 Ενδοκλωνική ετερογένεια στο πολλαπλούν μυέλωμα

Η καρκινογένεση αποτελεί μία πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία, αφού η κυτταρική εξαλλαγή δεν είναι ένα αυτόματο γεγονός, αλλά απαιτεί συσσώρευση μεταλλαγών που σιγά-σιγά θα έχουν ως αποτέλεσμα να παρακαμφθούν οι μηχανισμοί ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η καρκινογένεση είναι συνήθως το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών αλλαγών (μεταλλαγές) και περιβάλλοντος (ηλικία, κάπνισμα, μεταλλαξιογόνα, ιοί, βακτήρια). Συγκεκριμένα, στο ΠΜ η αρχική επικρατούσα άποψη ήταν πως η ασθένεια ξεκινά από έναν κλώνο (καρκινικό βλαστικό κύτταρο) καρκινικών κυττάρων και έπειτα εξελίσσεται μέσω γενετικών συμβάντων που μεταβάλλουν τη βιολογία του προς μια κακοήθη και ανθεκτική στα φάρμακα μορφή, με έναν σχετικά σταδιακό τρόπο. Όμως, εκτεταμένες γενωμικές μελέτες υψηλής ανάλυσης κατά τη διάγνωση και εξέλιξη της νόσου έδειξαν ότι ο όγκος στο ΠΜ, σε αντίθεση με την άποψη που επικρατούσε, δεν προέρχεται από ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο, αλλά από ποικίλα κλωνικά υποσύνολα που φέρουν υψηλή γενετική ποικιλότητα (Chapman et al., 2011). Αυτή η

θεωρία υποστηρίζεται από την κλινική εμφάνιση δικλωνικής νόσου ή ακόμα και από τη μετάπτωση τάξης της μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης σε ασθενείς με υποτροπιάζον ΠΜ. Η ύπαρξη διαφορετικών κλώνων μυελωματικών κυττάρων, η εξέλιξή τους κατά τη φυσική πορεία της νόσου, αλλά και οι αλλαγές που υφίστανται (κυρίαρχοι και υποτελείς κλώνοι) κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή της υποτροπής αποτελούν σημαντικό και δυναμικό ερευνητικό πεδίο.

2.3 Η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στο πολλαπλούν μυέλωμα

Τα παθολογικά κύτταρα εφόσον εγκατασταθούν στο μυελό των οστών, βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση με τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που εδράζονται εκεί, όπως είναι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (BMSCs), οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία προάγουν την επέκταση του παθολογικού κλώνου και διεγείρουν διαδικασίες νεοαγγειογένεσης και οστεοκλαστογένεσης (Εικόνα 5). Ένας μεγάλος αριθμός κυτταροκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης παρέχονται από το μικροπεριβάλλον του μυελού και συμβάλλουν στην υποστήριξη και την προστασία των καρκινικών κυττάρων, αλλά και στην αποφυγή της απόπτωσης (Bommert et al., 2006). Ακόμη, η επαφή των μυελωματικών κυττάρων με τους άλλους τύπους κυττάρων, αλλά και η έκκριση των αυξητικών παραγόντων από τα τελευταία οδηγούν στην επαγωγή της μεταγραφής και έκκρισης κυτταροκινών, οι οποίες με την σειρά τους προκαλούν αντοχή στα φάρμακα (Hideshima et al., 2007). Επιπρόσθετα, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες είναι πολύ σημαντικοί για την εμφάνιση της ασθένειας. Σήματα που εκκρίνονται από τα μυελωματικά κύτταρα παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση και τη δράση των οστεοβλαστών, αλλά ενεργοποιούν τη γένεση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η διαδικασία ανάπλασης του μυελού.



Εικόνα 5. Αλληλεπιδράσεις μυελωματικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και ενεργοποίηση πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών (Προσαρμοσμένη από Hideshima et al., 2007)

2.4 Ο ρόλος των ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μονοπατιών στην παθογένεια του πολλαπλού μυελώματος

Το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR

Η PI3K ενεργοποιείται από διάφορες κυτταροκίνες. Η ενεργοποιημένη PI3K ενεργοποιεί την AKT, η οποία φωσφωρυλιώνει μόρια όπως τον mTOR με αποτέλεσμα τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ο mTOR είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και παίζει κύριο ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και διαίρεση. Αυτό το μονοπάτι είναι σημαντικό για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των μυελωματικών, την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στα φάρμακα (Steinbrunn et al., 2011).

Το μονοπάτι JAK/STAT

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι η πιο σημαντική κυτταροκίνη για τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων. Η σηματοδότηση του JAK/STAT

μονοπατιού ενεργοποιείται από κυτταροκίνες της οικογένειας των γλυκοπρωτεινών 130, όπως η IL-6. Η σύνδεση της στον υποδοχέα της έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Janus κινάσης (JAK), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα STAT3 συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωση του κυττάρου και προσδίδοντας του αντι-αποπτωτικές ιδιότητες (Li et al., 2010).

Το μονοπάτι NF-kB

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ενεργοποιείται από πολλές κυτταροκίνες όπως ο TNF-α, η IL-1β και το CD40 καθώς και από χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης. Παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης των παραπάνω μορίων, αλλά και στην έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ενώ είναι ενεργοποιημένος σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του ΠΜ. Τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν μόρια που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-kB παρέχοντας πλεονέκτημα επιβίωσης για τα καρκινικά κύτταρα (Brioli et al., 2014). Στα μυελωματικά κύτταρα, πολλά γονίδια που είναι στόχοι του NF-kB υπερεκφράζονται, υποδηλώνοντας ότι τα κακοήθη πλασματοκύτταρα εξαρτώνται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά και ότι η εξωγενής σηματοδότηση είναι σημαντική για την πορεία της νόσου (Annunziata et al., 2007).

Το μονοπάτι p38 MAPK

Η P38 MAPK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία φωσφωρυλιώνεται και ενεργοποιείται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και διεγείρεται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η ενεργοποίηση της στα μυελωματικά κύτταρα εμπλέκεται στη δράση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών καθώς και στην οστεόλυση (Cuadrado and Nebreda, 2010).

Το μονοπάτι HSP90

Η HSP90 είναι μια μοριακή συνοδός απαραίτητη για τη διατήρηση και τη σταθερότητα του πρωτεώματος, αφού εμπλέκεται στον ποιοτικό έλεγχο πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών. Όταν αναστέλλεται η δράση της η σταθερότητα αυτών των πρωτεϊνών μειώνεται, προκαλώντας στα καρκινικά κύτταρα πρωτεϊνική δυσλειτουργία (Whitesell and Lindquist, 2005). Η HSP90 έχει ως στόχο διάφορες κινάσες, υποδοχείς και μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στον έλεγχο του

κυτταρικού κύκλου και της σηματοδότησής του, καθώς και στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό. Η έκφρασή της στα μυελωματικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα.

2.5 Θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος

Η ασθένεια του ΠΜ παρά τις εκτεταμένες μελέτες και προσπάθειες για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας παραμένει μέχρι και σήμερα ανίατη. Το γεγονός αυτό έγκειται στο ότι τα μυελωματικά κύτταρα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, η οποία μπορεί να είναι είτε ενδογενής, είτε επίκτητη και οι ασθενείς που την εμφανίζουν έχουν πολύ κακή πρόγνωση. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η εύρεση νέων φαρμακευτικών παραγόντων και η χρήση νέων θεραπευτικών σχημάτων, καθώς και ο συνδυασμός των παραγόντων αυτών για την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής. Σε κάθε περίπτωση βέβαια, είναι απαραίτητη η αποσαφήνιση των μηχανισμών ανάπτυξης και παθογένειας της νόσου. Σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 70 ετών, που πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις είναι δυνατή η θεραπεία με αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων κυττάρων στο μυελό των οστών. Ακολουθεί σύντομη παρουσίαση των παραγόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα με στόχο τη θεραπεία του ΠΜ, αλλά και άλλων που βρίσκονται ακόμη σε στάδιο κλινικών μελετών.

<u>Αναστολείς πρωτεασώματος</u>: Αποτελούν μικρά μόρια τα οποία στοχεύουν και καταστέλλουν τις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος οδηγώντας σε συσσώρευση κυκλινών ή κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) και ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, αναστολή της απομάκρυνσης μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, και παρεμπόδιση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω της παρεμπόδισης της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης του αναστολέα του NF-kB (IkB), ο οποίος απουσία αναστολέα πρωτεασώματος φωσφωρυλιώνεται από την κινάση του (IKK), ουβικιτινιλιώνεται και οδηγείται σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο αναστολέας 1ης γενιάς bortezomib (Adams et al., 1999).

<u>Ανοσορυθμιστικά μόρια (IMIDs)</u>: Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας ονομάζονται ανοσορυθμιστικά εξαιτίας της επίδρασής τους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η λειτουργία τους βασίζεται στην πρόσδεσή τους στο μόριο cereblon, το οποίο σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την E3 λιγάση της ουβικιτίνης, την κατεστραμμένη πρωτεΐνη και το μόριο Cul4A. Υπάρχουν 3 είδη μηχανισμών που σχετίζονται με την

αντιμυελωματική τους δράση, οι καρκινοκτόνοι, οι ανοσορυθμιστικοί και οι αντι-αγγειογενετικοί. Η καρκινοκτόνος δράση τους έγκειται: 1) στην μείωση των επιπέδων της IRF4 που οδηγεί σε καταστολή του κυτταρικού κύκλου, μειωμένη κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρικό θάνατο που σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα του *myc* και επαγωγή διάφορων αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (p15, p16, p21 and p27), 2) στην επαγωγή της έκφρασης του P21 WAF-1 μέσω ενός LSD1-μεσολαβούμενου επιγενετικού μηχανισμού και, 3) στη διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του μικροπεριβάλλοντός τους. Η ανοσορυθμιστική τους δράση μεσολαβείται από την αύξηση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών κυττάρων, την καταστολή των ρυθμιστικών Τ–λεμφοκυττάρων ή την επιδιόρθωση του σχηματισμού της ανοσοποιητικής σύναψης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η θαλιδομίδη και η λεναλιδομίδη (Weber et al., 2007).

Αλκυλιωτικοί παράγοντες: Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες μεταφέρουν αλκυλομάδες στις μεθυλ- και αιθυλ- ομάδες του DNA (συνήθως στο N-7 της γουανιδίνης) σχηματίζοντας ενδομοριακούς δεσμούς που διαφοροποιούνται στη δομή και στη λειτουργία του. Οι παράγοντες αυτοί δρουν σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πολλών τύπων καρκίνου (Espinosa et al., 2003). Ένα νέο και πολλά υποσχόμενο αλκυλιωτικό παράγοντα αποτελεί το Bendamustine, το οποίο ελέγχεται και για την δυνατότητα συγχορήγησης με αναστολείς πρωτεασώματος και με ανοσορυθμιστικά μόρια.

Ανοσοθεραπεία/Μονοκλωνικά αντισώματα: Αποτελούν χαρακτηριστική περίπτωση στοχευμένης θεραπείας καθώς κατευθύνονται με μεγάλη ειδικότητα έναντι αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων. Κάποιοι από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων δρουν είναι: 1) η κυτταροτοξικότητα είτε μέσω άμεσης επαγωγής της απόπτωσης, είτε μέσω σύζευξης με ραδιοισότοπα ή τοξίνες, 2) η ενίσχυση της ανοσοποιητικής λειτουργίας μέσω αντιγονοεξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας ή κυτταροτοξικότητας που εξαρτάται από το συμπλήρωμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Elotuzumab το οποίο στοχεύει την γλυκοπρωτεΐνη CS1 των πλασματοκυττάρων (Zonder et al., 2012).

Αναστολείς απο-ακετυλασών (DACi): Οι από-ακετυλάσες είναι ένζυμα που ειδικεύονται στην απομάκρυνση ομάδων ακετυλίου από διάφορες πρωτεΐνες. Είναι γνωστές για την επιγενετική τους δράση κυρίως στις ιστόνες, αλλά και την ρύθμιση μη ιστονικών πρωτεϊνών σχετικών με την εξέλιξη των όγκων, όπως η P53, τα μέλη

της οικογένειας του E2F, η BCL-6 και άλλες. Οι από-ακετυλάσες υπερεκφράζονται σε μια πληθώρα τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ΠΜ (Ocio and San Miguel, 2010). Δύνανται να συνδυαστούν με αναστολείς πρωτεασώματος όπως το bortezomib και να επιδράσουν τόσο στην αναστολή του πρωτεασώματος, όσο και στην επικοινωνία των μυελωματικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους. Τα μόρια panobinostat και vorinostat αποτελούν παράδειγμα νέων και καινοτόμων αναστολέων απο-ακετυλασών (Hideshima et al., 2011).

Αναστολείς κινασών: Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται διάφοροι αναστολείς κινασών σερίνης και θρεονίνης με διαφορετικά κλινικά αποτελέσματα ο καθένας. Στους πιο πρόσφατους αναστολείς κινασών με εφαρμογή στη θεραπεία του ΠΜ συγκαταλέγεται το dinaciclib (Zhu et al., 2011). Κάποιοι από τους αναστολείς αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με το bortezomib.

Αναστολείς μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης: Τα μυελωματικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τη μη φυσιολογική ενεργοποίηση πολλών σημαντικών μονοπατιών ενδοκυττάριας σηματοδότησης, όπως των PI3K/AKT/mTOR, RAF/MEK/ERK, JAK/STAT και του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων φαρμάκων με στόχο την παρεμπόδιση αυτών των μονοπατιών σε διαφορετικά επίπεδα της μεταγωγής σήματος.

3. Πρωτεασωμική αναστολή στα πλασματοκύτταρα και στα μυελωματικά κύτταρα

Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών και διάφορες κυτταροκίνες απαραίτητες για τη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αυτές συσσωρεύονται κατά τη σύνθεσή τους, απαιτούν δίπλωμα, γλυκοζυλίωση και μεταφορά στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Η σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών βασίζεται στην εύρυθμη λειτουργία τόσο του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum, ER) όσο και του πρωτεασώματος. Πράγματι, η προοδευτική μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος έχει συσχετισθεί με τη μειωμένη διάρκεια ζωής των πλασματοκυττάρων (Cenci et al., 2006). Συγκεκριμένα, σε μοντέλο μυός με ασθένεια που προσομοιάζει το συστηματικό ερυθυματώδη λύκο έχει δειχθεί ότι τόσο τα βραχείας όσο και τα μακράς διάρκειας μη κακοήθη πλασματοκύτταρα ήταν εξαιρετικά ευαίσθητα στη θεραπεία με bortezomib. Ο

κυτταρικός θάνατος στο μοντέλο αυτό φαίνεται πως επάγεται κατά κύριο λόγο μέσω του UPR (Neubert et al., 2008).

Το UPR είναι ένα σηματοδοτικό μονοπάτι του ER που ενεργοποιείται από τη συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών σε αυτό. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα εξαιρετικό σύστημα αποικοδόμησης πρωτεϊνών συσχετιζόμενο με το ER (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD), με τη βοήθεια του οποίου οι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες αποβάλλονται από αυτό, ουβικιτινιλιώνονται και υπόκεινται σε πρωτεόλυση μέσω του πρωτεασώματος. Παράλληλα, το κύτταρο οδηγείται βαθμιαία στη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης, στην αύξηση της έκφρασης των μοριακών συνοδών και των συστατικών του πρωτεασώματος, με στόχο την πρόληψη της συσσώρευσης των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών. Αυτό επιτρέπει προσωρινά στο κύτταρο να ανταπεξέλθει στο επιβλαβές περιβαλλοντικό στρες και να επιβιώσει. Ωστόσο, αν το στρες είναι έντονο ή παρατεταμένο, όπως συμβαίνει στη θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς, η ενεργοποίηση του UPR οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της απόπτωσης (Brewer et al., 2000).

Η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος στα κακοήθη πλασματοκύτταρα περιλαμβάνει επίσης και μείωση της ρύθμισης του αντι-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Η δράση του στα μυελωματικά κύτταρα προωθεί την επιβίωση και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και τις ακτινοβολίες, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μορίων προσκόλλησης, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών όπως η IL-6. Ο NF-κB υπό φυσιολογικές συνθήκες παραμένει αδρανής στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με ανασταλτικές πρωτεΐνες που καλούνται IκB (Inhibitor of κB). Η ενεργοποίηση του NF-κB απαιτεί την αποικοδόμηση του IκB από το πρωτεάσωμα έπειτα από την πολυουβικιτινιλίωση του από την κινάση του αναστολέα του NF-kB (IKK). Έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας απελευθερώνεται και ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχει. Εντούτοις η ειδική αναστολή του NFκB από την IKK σε μυελωματικά κύτταρα οδήγησε σε μερική αναστολή του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων (20-50%), υποδεικνύοντας ότι η ευαισθησία των μυελωματικών κυττάρων στους πρωτεασωμικούς αναστολείς οφείλεται επίσης και σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη υψηλών επιπέδων παραπρωτεϊνών (απόπτωση μέσω UPR) (Hideshima et al., 2002; Meister et al., 2007; Bianchi et al., 2009,).

Ειδικότερα, έχει φανεί πως τα μυελωματικά κύτταρα εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης μοριακών συνοδών του ER όπως οι HSP70, HSP90 (Melnick et al., 1994; Obeng et al., 2006). Η HSP90 μαζί με άλλες κυτοσολικές και μιτοχονδριακές μοριακές συνοδούς καθώς και μεταβολικά ένζυμα παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση των Β κυττάρων σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αντισώματα (van Anken et al., 2003). Η HSP70 από την άλλη έχει δειχθεί ότι συνδέεται στη βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών και βοηθάει στη σύνδεσή της με την ελαφριά, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό των ανοσοσφαιρινών. Τόσο η HSP70 όσο και η HSP90 συμβάλλουν στη στόχευση των αδέσμευτων υπομονάδων των ανοσοσφαιρινών προς αποικοδόμηση.

3.1 Πρωτεασωμικοί αναστολείς στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος

Οι πρωτεασωμικοί αναστολείς μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με τον τρόπο σύνδεσής τους (ομοιοπολική ή μη) στο ενεργό κέντρο του πρωτεασώματος. Οι μη ομοιοπολικοί αναστολείς δε χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, ενώ μόνο τρεις από τους οκτώ δομικά διαφορετικούς ομοιοπολικούς αναστολείς έχουν εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration), οι οποίοι βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της κλινικής ανάπτυξης. Αυτοί είναι τα βορονικά πεπτίδια, οι εποξυκετόνες και οι β-λακτόνες (Kisselev et al., 2012).

3.1.1 Βορτεζομίμπη (Bortezomib)

Το bortezomib είναι ο πρώτης γενιάς πρωτεασωμικός αναστολέας που εγκρίθηκε από το FDA για τη θεραπεία του ΠΜ το 2003. Πρόκειται για ένα βορονικό πεπτίδιο που δεσμεύεται και αναστέλλει αντιστρεπτά τη β5 καταλυτική υπομονάδα του πρωτεασώματος στην οποία εδράζεται η ενεργότητα χυμοθρυψίνης (ή της β5i υπομονάδας του ανοσοπρωτεασώματος αντίστοιχα) και σε μικρότερο βαθμό τη β1 και β2 υπομονάδες με ενεργότητα κασπάσης και θρυψίνης αντίστοιχα. Η δράση του αναστολέα bortezomib έχει συσχετισθεί με το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, τον αποπτωτικό θάνατο, τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική μετανάστευση (Kubiczkova et al., 2014). Όσον αφορά στο μονοπάτι του NF-kB, το bortezomib όπως περιγράφθηκε και στην ενότητα 1.6 (Μηχανισμός δράσης των πρωτεασωμικών αναστολέων) έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα επιβίωσης, μέσω σταθεροποίησης του αναστολέα του IκB. Συγκεκριμένα, ο NF-kB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ως ένα

αδρανές σύμπλοκο με τον IκB. Καθώς το bortezomib προκαλεί αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος, δεν επιτρέπει την αποικοδόμηση του IκB και κατά συνέπεια οδηγεί στη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB στον πυρήνα και την πρόσδεση στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Αργότερα φάνηκε ότι το bortezomib έχει και την ικανότητα να επάγει τη μη πρωτεασωμική αποικοδόμηση του IκB ενεργοποιώντας δύο κινάσες που ενεργοποιούν το NF-kB (RIP2 και IKKb) μέσω του κανονικού μονοπατιού του (canonical NF-kB pathway) (Li et al., 2010).

Κλινικά, οι ασθενείς που λαμβάνουν το bortezomib ως μέρος της θεραπείας τους παρουσιάζουν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης, σημαντική μείωση του όγκου, βελτίωση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου (Progression free survival, PFS) και στην ολική επιβίωση (overall survival). Ωστόσο, ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στη χορήγησή του είναι η περιφερική νευροπάθεια, η οποία μπορεί να φτάνει το 80% σε συνδυασμό με ανοσορυθμιστικά φάρμακα (Richardson et al., 2010). Η προαναφερθείσα παρενέργεια οφείλεται στο ότι το bortezomib πέραν της πρωτεασωμικής αναστολής που προκαλεί, αναστέλλει επίσης και διάφορες πρωτεάσες σερίνης, μία εκ των οποίων εμπλέκεται στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων (Arastu-Kapur et al., 2011). Η σχετιζόμενη με το bortezomib νευροπάθεια μπορεί εν μέρει να περιοριστεί αλλάζοντας το θεραπευτικό σχήμα και την οδό χορήγησης χωρίς να επηρεάζεται παράλληλα και η δράση του (Moreau et al., 2011; Wang et al., 2012).

Παρόλο που η αναστολή του πρωτεασώματος αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική στο ΠΜ, ορισμένοι ασθενείς αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες του φαινομένου αυτού. Αναλυτικότερα, μεταξύ άλλων φαίνεται πως η χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων οδηγεί σε ενεργοποίηση της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και την αποικοδόμησή τους μέσω του λυσοσώματος (Zeng et al., 2012). Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους πρωτεασωμικούς αναστολείς είναι η αυξημένη λειτουργία πρωτεϊνών όπως η P-γλυκοπρωτεΐνη ή η MDR1 (multidrug resistance protein 1), οι οποίες αποτελούν μεμβρανικούς μεταφορείς που οδηγούν τις ξένες προς τον οργανισμό ουσίες εκτός κυττάρου (de Jong et al., 2001). Τέλος, η αυξημένη έκφραση των HSP πρωτεϊνών (heat shock proteins) αλλά και οι μεταλλάξεις στη θέση πρόσδεσης των αναστολέων στη β5 υπομονάδα του πρωτεασώματος ωθούν τα μυελωματικά κύτταρα στην ανάπτυξη αντοχής σε αυτό το είδος φαρμάκων (Chauhan

et al., 2003; Oerlemans et al., 2008). Για το λόγο αυτό νέοι πρωτεασωμικοί αναστολείς (όπως το carfilzomib) που υπερνικούν αυτούς τους περιορισμούς και προκαλούν λιγότερες παρενέργειες αναπτύσσονται συνεχώς, Επιπλέον, νέοι στόχοι όπως η HDAC6 πρωτεΐνη (histone deacetylase 6) που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην απομάκρυνση των συσσωματωμάτων ανακαλύπτονται. Οι αναστολείς των μορίων αυτών μπορούν να συνδυαστούν με το bortezomib και να ενισχύσουν τη δράση του (Badros et al., 2009).

3.1.2 Καρφιλζομίμπη (Carfilzomib)

Το carfilzomib είναι ένας μη αντιστρεπτός πρωτεασωμικός αναστολέας. Πρόκειται για ένα τετραπεπτίδιο εποξυκετόνης, το οποίο διαφέρει δομικά και μηχανιστικά από το διπεπτίδιο βορονικού οξέος του bortezomib (Arastu-Kapur et al., 2011). Οι εποξυκετόνες είναι παράγωγα της εποξομικίνης, ενός φυσικού προϊόντος που απομονώνεται από τον ακτινομύκητα και σχηματίζει ένα μη αντιστρεπτό, και ιδιαίτερα ειδικό προϊόν, με το αμινοτελικό κατάλοιπο θρεονίνης της β5 υπομονάδας με ενεργότητα χυμοθρυψίνης του 20S πρωτεασώματος, (Meng et al., 1999). Μελέτες φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής έδειξαν ότι το carfilzomib μεταβολίζεται ταχέως σε ανενεργούς μεταβολίτες και ότι ο μέσος χρόνος ημίζωής του είναι κάτω από 30 λεπτά. (O'Connor et al., 2009; Alsina et al., 2012). Παρόλο που και το botrezomib αναστέλλει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης με παρόμοια δραστικότητα, το carfilzomib εμφανίζει υψηλότερη ειδικότητα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών (Demo et al., 2005). Σε αντίθεση με το bortezomib, το carfilzomib έχει μικρότερη επίδραση στις ενεργότητες θρυψίνης και κασπάσης του πρωτεασώματος (Demo et al., 2007). Σε πειράματα in vitro, φάνηκε ότι το carfilzomib επάγει την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Demo et al., 2007) και αναστέλλει την πρωτογενή οξεία μυελογενή λευχαιμία (Stapne et al., 2007). Επίσης, έχει δειχθεί πως είναι ικανό να επάγει την απόπτωση σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές και σε μυελωματικά κύτταρα ασθενών με υποτροπιάζον ΠΜ, στους οποίους είχε χορηγηθεί πρώτα bortezomib ή κάποια άλλη θεραπεία (Kuhn et al., 2007). Σε μοντέλα ξενομοσχεύματος ανθρώπινων όγκων που χορηγήθηκε το carfilzomib στις μέρες 1 και 2 ενός εβδομαδιαίου θεραπευτικού σχήματος φάνηκε πως δεν επηρεάζονται τόσο τα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ σημειώθηκε ισχυρή αντικαρκινική δράση, μεγαλύτερη από αυτή που προκάλεσε το bortezomib (χορήγηση τις ημέρες 1 και 4 ενός προγράμματος δύο εβδομάδων). Συμπερασματικά,

τα προαναφερθέντα αποτελέσματα σε συνδυασμό και με άλλες σχετικές μελέτες συνηγορούν στο ότι το carfilzomib πλεονεκτεί σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητα και την πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε σύγκριση με το bortezomib (Yang et al., 2011).

4. Σκοπός

Το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί μια αιματολογική κακοήθεια που προκύπτει από τον μετασχηματισμό των Β-λεμφοκυττάρων σε κλώνο παθολογικών πλασματοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται στον μυελό των οστών και προκαλούν μια σειρά από σοβαρές επιπλοκές και βλάβες στην υγεία του ασθενούς (Kubiczkova et al., 2014). Μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση αφορά στην στόχευση του πρωτεασώματος με τη χρήση διαφόρων αναστολέων πρωτεασώματος, που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στις καταλυτικές του υπομονάδες και να παρεμποδίζουν την φυσιολογική του λειτουργία (Ocio et al., 2014). Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος οδηγεί στην συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο των μυελωματικών κυττάρων (Tsakiri and Trougakos 2015).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η λεπτομερής μελέτη της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης και της γονιδιακής έκφρασης (επιπέδων mRNA και πρωτεϊνική) των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε ασθενείς με ΠΜ που έλαβαν τον πρωτεασωμικό αναστολέα carfilzmob (CFZ) ως θεραπεία. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από τους ασθενείς σε διάφορα σημεία του κύκλου θεραπείας τους, με παράλληλη απομόνωση των ερυθροκυττάρων και των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ, κύτταρα με δυνατότητα γενωμικής απόκρισης), με τελικό σκοπό τον έλεγχο της κύριας πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (β5) και την παράλληλη απομόνωση RNA (ΜΚΠΑ) και πρωτεϊνών στα αντίστοιχα σημεία θεραπείας.

ΙΙ. Υλικά και μέθοδοι

1. Υλικά

1.1 Μηχανήματα

Συσκευή	Εταιρεία
Επωαστήρας	ProBlot Labnet
Φυγόκεντρος	Biofuge stratus
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	Biorad
Συσκευή για Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	PikoReal Real- Time (Thermo Scientific)
Φθορισμόμετρο	Biorad
Φασματοφωτόμετρο	Biorad
Φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano	Shimadzu

1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
2-μερκαπτοαιθανόλη	Merck	15433
APS	Research Organics	9530A
Biorad protein assay	Biorad	500-0006
$ClCH_2COONa$	Fluka	24610
CH_3COONA	Fluka	35208
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka	27816
Developer D-19	Kodak	146 4593
DTT	Sigma	248531

ECL (Enhanced ChemiLuminescence)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2048
EDTA	Research organics	9572E
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Hepes	Sigma	H-0891
Lymphosep, Lymphocyte Separation Medium	Biosera	LM-T1702
Maxima® SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix,	Thermo Scientific	K0222
Μεθανόλη	Merck	1.06009.2511
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma	P4417
SDS	Serva	20765
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Enzo life sciences	BML-P802-0005
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Merck	1107320100
Tris	Research Organics	9680T
Ακρυλαμίδη	Research Organics	9502A
Γλυκερόλη	Sds	6023516
Γλυκίνη	Serva	23390
Κιτ ανίχνευσης οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit)	Chemicon	S7150
Κιτ απομόνωσης RNA (NucleoSpin® RNA)	Macherey Nagel	740955.250

Κιτ σύνθεσης cDNA (cDNA synthesis Kit for RT-qPCR)	thermo scientific	K1641
Κοκτέιλ από αναστολείς πρωτεασών	Sigma	P8340
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	thermo scientific	SM0671
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	thermo scientific	SM1841
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Santa Cruz Biotechnology	Sc-3724
Οξικό οξύ (CH3COOH)	Merck	K39105963
Φιλμ αυτοραδιογραφίας	Santa Cruz Biotechnology	Sc-201697
Χαρτιά Whatman	Sigma Aldrich	Z241768

1.3 Διαλύματα

Διάλυμα λύσης NP-40	150 mM NaCl 1% NP-40 (v/v) 50 mMTris pH 8.0 σε dH2O
Διάλυμα 1X TBS	20 mM Tris 137 mM NaCl pH 7.6 σε dH2O
Διάλυμα stripping	50 mM Tris 2 % SDS (w/v) pH 7.0

	σε dH2O
Ρυθμιστικό διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (10x LRB)	0,25M Tris 1,92M γλυκίνη 1% (w/v) SDS pH 8.3
Διάλυμα μεταφοράς	39mM γλυκίνη 43,6mM Tris 0,0376% (w/v) SDS 20% (v/v) μεθανόλη
Διάλυμα λύσης 26S	0,2 % NP-40 (v/v) 5 mM ATP 10 % γλυκερόλη (v/v) 20 mM KCl 1 mM EDTA 1 mM DDT 20 mM Tris pH 7.6 σε dH2O
Πήκτωμα πακεταρίσματος	1,35ml ακρυλαμίδη 30% (περιέχει και bis-ακρυλαμίδη, σε συγκέντρωση του stock διαλύματος 0.8(w/v) bis-ακρυλαμίδη, 29.2(w/v) ακρυλαμίδη σε dH2O και φυλάσσεται στους 4oC) 1,26ml Tris pH 6.8 0,5ml SDS 10% 100μl Ammonium persulfate (APS) 10μl TEMED 6,8ml ddH2O
Πήκτωμα διαχωρισμού	8ml ακρυλαμίδη 30% 5ml Tris pH 8.8 1ml SDS 10% 200μl APS 8μl TEMED

	5.8ml ddH2O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της 26Sπρωτεασωμικής ενεργότητας	100 mM Hepes pH 7.4 σε dH2O
Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας	30 mM CH3COONa 70 mM CH3COOH 100 mM ClCH2COONa pH 5.3 σε dH2O

1.4 Αντισώματα

Αντισώματα	**Εταιρεία**	**Αριθμός καταλόγου**
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τον άνθρωπο		
20S proteasome α7 (GH6)	SANTA CRUZ	100456
20S proteasome β5 (C-19)	SANTA CRUZ	55009
Clusterin (C-18)	SANTA CRUZ	6419
GAPDH (FL-335)	SANTA CRUZ	25778 X2
LC3B	Cell Signaling	2775S
NQO1	SANTA CRUZ	16464
NRF-2 (C-20)	SANTA CRUZ	722
Ubiquitin (P4D1)	SANTA CRUZ	8017
Δευτερογενή αντισώματα		
Anti-Mo-IgG/HRP	SANTA CRUZ	Sc-2005
Anti-Go-IgG/HRP	SANTA CRUZ	Sc-2020
Anti-Rb-IgG/HRP	SANTA CRUZ	Sc-2004

Οι εκκινητές PCR σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

1.5 PCR εκκινητές

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR)	
Όνομα εκκινητή	***Αλληλουχία***
BECN1-R	CAGAGCGATGGTAGTTCTGGA
BECN1-F	TTGGACGTCTTAGACCCTTCC
HDAC6-F	GACCATCCAAGTCCATCGCA
HDAC6-R	ACCTAGGTTTGGCTGGTTGG
HSP27-F	CCACCCAAGTTTCCTCCTC
HSP27-R	GACTGGGATGGTGATCTCGT
HSP90-F	CTGGGGATCTTCCAGACTGA
HSP90-R	GGCAGAGGCTGATAAGAACG
NQO1-F	AGCAGACGCCCGAATTCAAA
NQO1-R	AGAGGCTGCTTGGAGCAAAA
PSMA3-F	TCTGAAGGAAGAAGATGAATCAGA
PSMA3-R	TGGACAGTATGTATAATCCAGGGC
PSMA7-F	TACATCACCCGCTACATCGC
PSMA7-R	AGAGCCTAGGAGTGCCATCA
PSMB1-F	GGATGCAGCGGTTTTCATGG
PSMB1-R	AATTGCCCCCGTAGTCATGG
PSMB2-F	CTGCTCCGCCCTCCATTAAC

PSMB2-R	GCCAAGCATGGAGTAGAACG
PSMB5-F *PSMB5*-R	TCAAGTTCCGCCATGGAGTC CTTCTTCACCGTCTGGGAGG
PSMB6-F *PSMB6*-R	GACCTGATGGCGGGAATCAT CAAAGCGAGAGCATTGGCA
PSMB7-F *PSMB7*-R	CAAGCTGGATTTTCTCCGCC TGATTTTCTCAGTGAGGACTGC
RPN11-F *RPN11*-R	ACGGAAGCCGAAGCAAACTA GCAAACCGGCGATGAATCAG
RPN6-F *RPN6*-R	TCAAACTCTCCAAGGCCGAC CTCCCCCTGGTCCAAAATCC
SQSTM1-F *SQSTM1*-R	CATCGGAGGATCCGAGTGTG TTCTTTTCCCTCCGTGCTCC
TXNRD1-F *TXNRD1*-R	TTGGAGTGCGCTGGATTTCT TTTGTTGGCCATGTCCTGGT

2. Μέθοδοι

Αρχικά και σε συνεργασία με την ογκολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα πραγματοποιήθηκε η προκαταρκτική διαδικασία λήψης αίματος από ασθενείς με ΠΜ σε διάφορα σημεία του κύκλου θεραπείας τους. Ταυτόχρονα, απομονώθηκαν ΕΚ και ΜΚΠΑ από ασθενείς με ΠΜ που έλαβαν ως θεραπεία CFZ. Ακολούθησε ο αρχικός έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργοτήτας χυμοθρυψίνης (CT-L) στα ΕΚ και ΜΚΠΑ (φρέσκα δείγματα), με παράλληλη απομόνωση RNA (μόνο ΜΚΠΑ) και πρωτεϊνών στα αντίστοιχα σημεία θεραπείας. Σε συνέχεια με την προκαταρκτική αυτή εργασία, εξετάσθηκε η γονιδιακή έκφραση (επιπέδων mRNA

και πρωτεϊνική) των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε κύτταρα αίματος ασθενών με ΠΜ.

2.1 Απομόνωση ΜΚΠΑ και ΕΚ

Ο διαχωρισμός των κυττάρων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος Lymphosep (Lymphocyte Separation Medium-Biosera), πυκνότητος 1.077 ± 0.001 g/ml. Αρχικά, το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένα σωληνάρια και έπειτα, αραιώθηκε με PBS (Phosphate buffered saline) (1:2 του όγκου του δείγματος) σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν 5ml Lymphosep σε πλαστικούς σωλήνες των 15ml και ακολούθησε σταδιακή και προσεχτική προσθήκη του αραιωμένου αίματος (10ml) υπό κλίση. Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν (400g) σε θερμοκρασία δωματίου για 30'. Στο σημείο αυτό, συλλέχθηκε ο δακτύλιος των ΜΚΠΑ καθώς και η φάση των ΕΚ [απομάκρυνση μέσω απόχυσης της ανωτέρας φάσης (κοκκιοκύτταρα)], τα οποία ξεπλύθηκαν με PBS.

2.2 Απομόνωση RNA από τα εμπύρηνα ΜΚΠΑ

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού kit (NucleoSpin® RNA-Macherey Nagel). Επόμενο βήμα, πριν προχωρήσουμε στη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν η εκτίμηση της ποιότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου υλικού και ο υπολογισμός της συγκέντωσης του (ng/μL). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano. Εν συνεχεία συντέθηκε cDNA, χρησιμοποιώντας cDNA synthesis kit for RT-qPCR (thermo scientific).

2.3 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-Real Time-PCR)

Προχωρήσαμε σε Q-Real Time-PCR προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των εξής γονιδίων: *RPN6* και *RPN11* (γονίδια που κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές υπομονάδες RPN6 και RPN11 του 19S πρωτεασώματος, αντίστοιχα), *PSMA7* (γονίδιο που κωδικοποιεί για την α3 ρυθμιστική υπομονάδα του 20S πρωτεασώματος), *PSMB6*, *PSMB7* και *PSMB5* (γονίδια που κωδικοποιούν για τις καταλυτικές υπομονάδες β1, β2 και β5 του 20S πρωτεασώματος), *BECN1* (γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Beclin1, η οποία εμπλέκεται στο αυτοφαγικό μονοπάτι), *P62/SQSTM1* και *HDAC6* (γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες P62/Sequestosome 1 και HDAC6 αντίστοιχα, οι

οποίες εμπλέκονται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων μέσω αυτοφαγίας), *TXNRD1* και *NQO1* (γονίδιο που κωδικοποιεί για τις TXNRD1 και NQO1 πρωτεΐνες-στόχους του μεταγραφικού παράγοντα αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2) και των γονιδίων *HSP27*, *HSP90, clusterin* (κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς HSP27, HSP90, Clusterin αντίστοιχα). Επίσης, μελετήσαμε το γονίδιο *PEPCK* (κωδικοποιεί για την PEPCK, πρωτεΐνη-στόχο του μεταγραφικού παράγοντα FOXO1) καθώς και το γονίδιο *CHOP*, (κωδικοποιεί για την προαποπτωτική πρωτεΐνη CHOP, που σχετίζεται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου/ER-stress). Τέλος ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *GAPDH* (housekeeping gene).

Η αντίδραση Q-RT-PCR πραγματοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή PikoReal Real-Time (Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix της Thermo Scientific. Οι καμπύλες τήξης (Melting curves) εξετάζονται μετά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της PCR για την επιβεβαίωση μοναδικών ειδικών προϊόντων. Επίσης, για κάθε ζεύγος εκκινητών (primers) πραγματοποιείται πρότυπη καμπύλη για να βρεθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσής τους.

Το πρόγραμμα που ακολουθείται είναι το εξής:

-95°C για 10’

-95°C για 15’’
-60°C για 30’’ } X40 κύκλοι
-72°C για 30’’

Το στάδιο για τη δημιουργία των καμπύλων τήξης πραγματοποιείται στους 58-95°C.

2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomasie Briliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων BSA γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, από την οποία υπολογίζονται οι

συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη. Η οπτική πυκνότητα στα 595 nm μετράται σε φωτόμετρο.

2.5 Απομόνωση πρωτεασωμάτων και μέτρηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης του 26S πρωτεασώματος

Μετά την απομόνωση των ΜΚΠΑ και των ΕΚ από το ολικό αίμα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και προστέθηκαν σε αυτά διάλυμα λύσης 26S με προσθήκη ATP συγκέντρωσης 5mM (τελική συγκέντρωση), προκειμένου να απομονωθούν ενεργά πρωτεασώματα. Το ATP διατηρεί ενεργό το πρωτεάσωμα και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του. Ακολούθησε η τοποθέτηση τους στη ρόδα στους 4^oC για 30'. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στους 4^oC και σε 17.000 g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτείνες των κυττάρων. Έπειτα, με τη μέθοδο Bradford έγινε η ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου και υπολογίσθηκε ο όγκος του δείγματος ώστε να ληφθούν 30μg πρωτεΐνης από τα ΜΚΠΑ και 90μg πρωτεΐνης από τα ΕΚ. Οι πρωτείνες τοποθετήθηκαν εις διπλούν (duplicated) σε 195μl του διαλύματος αντίδρασης, το οποίο πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί σταθερή την ενεργότητα του πρωτεασώματος, καθώς προσομοιάζει το περιβάλλον του κυττάρου. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη 5μl του φθοροπεπτιδίου CT-L (2mM) (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY) και επώαση των δειγμάτων για 30' στους 37^oC. Κατά τη διάρκεια της επώασης το LLVY φθοροπεπτίδιο εντοπίζεται από την ενζυματική ενεργότητα της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος, αποικοδομείται και παράγεται φθορισμός. Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 300μl του διαλύματος τερματισμού σε κάθε δείγμα, το οποίο σταματά την αντίδραση της αποικοδόμησης του φθοροπεπτιδίου, και 1ml ddH_2O. Ο παραγόμενος φθορισμός καταγράφεται στο φθορισμόμετρο (φίλτρο διέγερσης, 350 nm/φίλτρο εκπομπής, 440 nm; VersaFluorTM Fluorometer System, Biorad).

Για κάθε πρωτεϊνικό δείγμα που μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιήθηκαν 200μl του αντιδραστηρίου Bradford, 800μl ddH_2O και ένα 1μl του προς εξέταση δείγματος.

2.6 SDS-PAGE Ανοσοστύπωμα Western

Προκειμένου να ποσοτικοποιήσουμε την πρωτεϊνική έκφραση των ΜΚΠΑ και των ΕΚ, προχωρήσαμε σε απομόνωση των πρωτεινών προσθέτοντας στα κύτταρα

ρυθμιστικό διάλυμα λύσης NP-40 που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στους 4°C και σε 17.000g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτείνες των κυττάρων. Έπειτα, με τη μέθοδο Bradford υπολογίσθηκε η συγκέντρωση τους στο εκχύλισμα. Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση προσθέσαμε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα 5x Laemmli διάλυμα (5x LSB) (Laemmli, 1970) και διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλη με αναλογία: 2 μέρη 5x LSB, 7 μέρη πρωτεϊνικό διάλυμα, 1 μέρος 1M 2-μερκαπτοαιθανόλη ενώ υπολογίσθηκε και ο όγκος του δείγματος ώστε να ληφθούν 60μg πρωτεΐνης (αραιωμένης) από τα ΜΚΠΑ και 90μg πρωτεΐνης από τα ΕΚ. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων στους 100 ^{o}C για 2-3 λεπτά

Ακολούθησε η ανάλυση των πρωτεϊνών σε ομοιογενές πήκτωμα 12% ακρυλαμίδης, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάστηκε για 50 λεπτά με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων [5% γάλα με χαμηλά λιπαρά διαλυμένο σε 1X TBS παρουσία 0,1 % Tween-20] σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα που φέρει την υπεροξειδάση του ραπανακιού (Horseradish peroxidase-HRP) (διαλυμένα στο διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων) επωάσθηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν 3 πλυσίματα μετά τις επωάσεις με τα αντισώματα με διάλυμα 1X TBS, 0,1 % Tween-20. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (πρωτεΐνη υπό μελέτη)-αντισώματος έγινε με τη μέθοδο ECL (Santa Cruz Biotechnology) και τη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση) και λουμινόλης ως ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια αποτυπώνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιείται με τη μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1 έως 5 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα σε H_2O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για ~5 λεπτά. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πολύ καλά με H2O βρύσης.

Οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν ξανά, αφού αφαιρέθηκαν τα αντισώματα μετά από επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα stripping στους 60°C για 45 λεπτά και αφού ακολούθησαν 3 πλυσίματα της μεμβράνης με διάλυμα 1X TBS, 0,1 % Tween-20.

2.7 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)

Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το OxyBlot Kit (Chemicon International). Το kit αυτό ανιχνεύει καρβονυλικές ομάδες τις οποίες

απέκτησαν οι πρωτεΐνες μετά την οξείδωσή τους. Πιο αναλυτικά, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνη (DNPH) δίνοντας 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζόνη (DNP). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με ειδικά αντισώματα (anti-DNP) με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος Western.

Συγκεκριμένα, απομονώσαμε με το διάλυμα λύσης NP-40 τις πρωτεΐνες των ΜΚΠΑ και των ΕΚ, όπως περιγράφηκε παραπάνω και χρησιμοποιήσαμε 20μg για ανάλυση τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος Western.

2.8 Στατιτική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ακολούθησαν τη διαδικασία της στατιστικής επεξεργασίας με στόχο να καταφανούν οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος και στη γενωμική απόκριση των κυττάρων πριν και μετά τη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα. Όλες οι δοκιμές διενεργήθηκαν, τουλάχιστον, εις διπλούν. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel. Η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε εφαρμόζοντας τον έλεγχο Τ (t-test). Οι γραμμές σφάλματος στα διαγράμματα υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση και η στατιστική σημαντικότητα υποδεικνύεται με έναν ή δύο αστερισκούς όταν η τιμή σημαντικότητας (p-value) είναι $P<0.05$ ή $P<0.01$, αντίστοιχα.

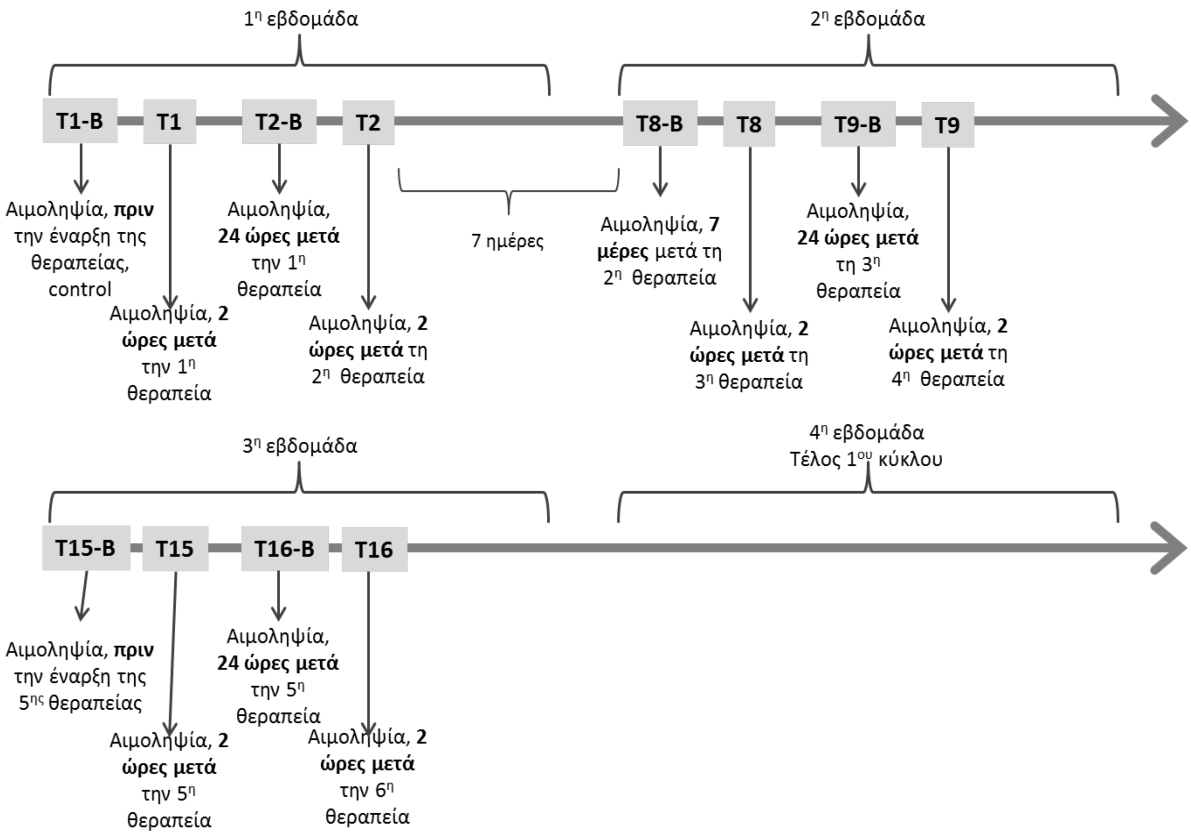
2.9 Δεοντολογική έγκριση και συγκατάθεση συμμετοχής

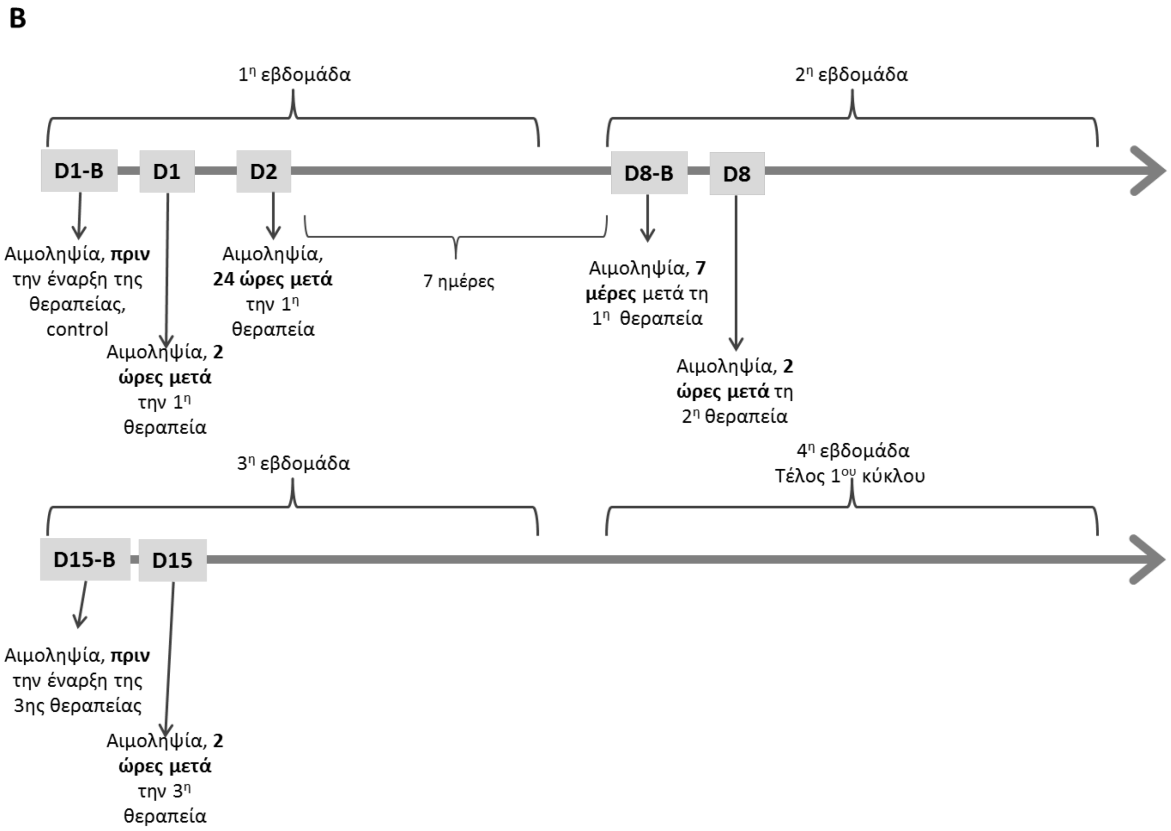
Όλοι οι συμμετέχοντες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη έδωσαν την συγκατάθεση τους κατόπιν ενημέρωσης. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τα πρότυπα δεοντολογίας της θεσμικής και εθνικής επιτροπής έρευνας και τη Διακύρηξη του Ελσίνκι του 1964, με τις μεταγενέστερες τροποποιήσεις της. Έχει ληφθεί, επίσης, έγκριση από την επιστημονική επιτροπή του Νοσοκομείου Αξεξάνδρα για τη συλλογή των δειγμάτων αίματος.

III. Αποτελέσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εξετάσθηκαν η πρωτεασωμική ενεργότητα των ΜΚΠΑ και των ΕΚ, καθώς και η γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε 6 ασθενείς [3 άντρες (MC3, MC4, MC5) και 3 γυναίκες (FC2, FC4, FC7)] με ΠΜ που έλαβαν ως θεραπεία τον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο παρακολουθήθηκε η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης έπειτα από χορήγηση θεραπευτικού αναστολέα αποτελείται από 6 κύκλους (C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6), συνολικής διάρκειας περίπου 6 μηνών. Στον πρώτο κύκλο ο αναστολέας χορηγείται 1 ή 2 φορές (2 συνεχόμενες ημέρες) την εβδομάδα για 3 εβδομάδες και έπειτα την πρώτη εβδομάδα των κύκλων C_2, C_3 και C_6. Οι ασθενείς FC2, FC4 και FC7, MC5 ακολούθησαν το δοσολογικό σχήμα των 2 χορηγήσεων την εβδομάδα, ενώ οι MC3 και MC4 έλαβαν το CFZ 1 φορά την εβδομάδα. Τα χρονικά σημεία της αιμοληψίας και της απομόνωσης των κυττάρων είναι πριν και 2 ώρες μετά την εκάστοτε χορήγηση του αναστολέα (Εικ. 6).

A





Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του θεραπευτικού πρωτόκολλου ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα και τα χρονικά σημεία διενέργειας αιμοληψίας και απομόνωσης των ΜΚΠΑ και ΕΚ για τον C1 κύκλο θεραπείας. (A) Χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ δύο φορές την εβδομάδα. (B) Χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ μία φορά την εβδομάδα.

Οι ασθενείς που ακολούθησαν το θεραπευτικό πρωτόκολλο των 2 χορηγήσεων την εβδομάδα έλαβαν 20 mg/m^2 CFZ στα χρονικά σημεία T1 και T2 (C1 κύκλος θεραπείας) και έπειτα 27 mg/m^2 για το υπόλοιπο της θεραπείας τους. Παράλληλα, οι ασθενείς που ακολούθησαν το θεραπευτικό πρωτόκολλο της 1 χορήγησης την εβδομάδα έλαβαν 20 mg/m^2 CFZ για το χρονικό σημείο D1 (C1 κύκλος θεραπείας) και έπειτα 70 mg/m^2 για το υπόλοιπο της θεραπείας τους.

Τα χρονικά σημεία που θα παρατεθούν στα διαγράμματα της πρωτεασωμικής ενεργότητας αφορούν στο σύνολο των χρονικών σημείων που μελετήθηκαν, ενώ για τον περαιτέρω πρωτεϊνικό και γονιδιακό έλεγχο των βασικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης θα παρατεθούν μόνο τα χρονικά σημεία του πρώτου κύκλου.

1. Ασθενής FC2 (Female Carfilzomib patient number 2)

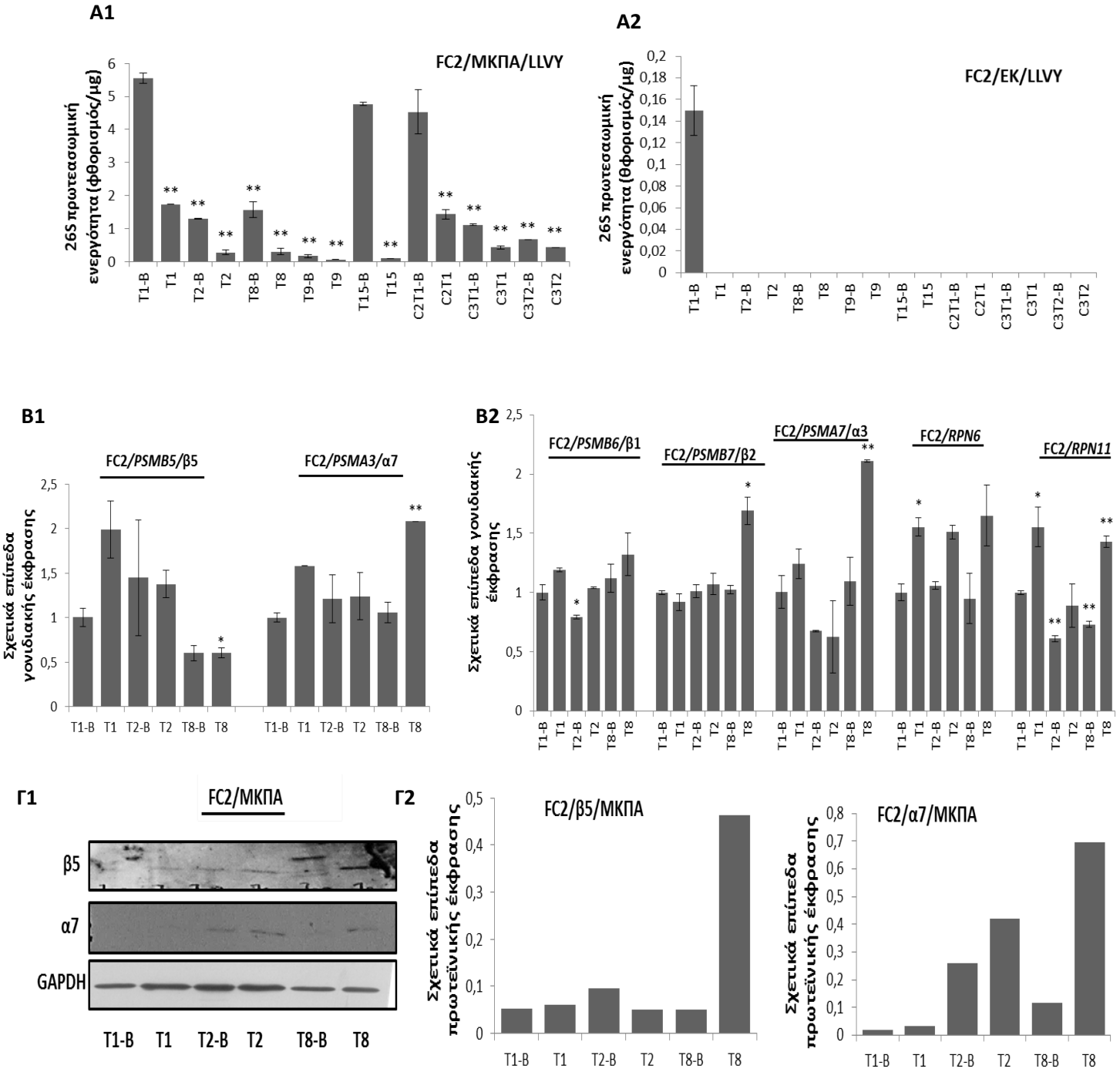
Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

Η χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενεργότητας της β5 υπομονάδας (ενεργότητα χυμοθρυψίνης) του πρωτεασώματος (T1) στα ΜΚΠΑ, η οποία παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και 24 ώρες μετά (T2-B) τη χρονική στιγμή T1, ενώ μειώνεται ακόμα περισσότερο μετά τη δεύτερη δόση της θεραπείας. Με την πάροδο της πρώτης εβδομάδας και τον έλεγχο της πρωτεασωμικής ενεργότητας 7 ημέρες μετά την 1η λήψη της θεραπείας, παρατηρείται ήπια αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης, η οποία παραμένει σημαντικά μειωμένη συγκριτικά με τα βασικά επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας στο χρονικό σημείο T1-B. Το ίδιο πρότυπο μεταβολής στα επίπεδα της ενεργότητας της β5 υπομονάδας ακολουθείται και στα επόμενα χρονικά σημεία της θεραπείας. Συγκεκριμένα, στα χρονικά σημεία T15-B και C2T1-B στα οποία μεσολαβεί ένα μεγάλο χρονικό διάστημα από την προηγούμενη χορήγηση του αναστολέα (7 και 14 ημέρες από το χρονικό σημείο T8 και T15 αντίστοιχα), παρατηρείται ανάκαμψη της ενζυμικής ενεργότητας της β5 υπομονάδας, η οποία μειώνεται σημαντικά μετά τη λήψη της θεραπείας (T15, C2T1). Πριν την έναρξη του 3ου κύκλου θεραπείας (C3T1-B, μεσοδιάστημα 4 εβδομάδων από την τελευταία χορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα τη χρονική στιγμή C2T2), η πρωτεασωμική ενεργότητα παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα συγκρινόμενη με τα χρονικά σημεία T15-B και C2T1-B (Εικ. 7A1).

Στην περίπτωση των ΕΚ, παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή του πρωτεασώματος σε σχέση με το χρονικό σημείο T1-B, καθώς σε κανένα άλλο χρονικό σημείο δε σημειώθηκε επαναφορά της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα απύρηνα ΕΚ εκφράζουν χαμηλότερη πρωτεασωμική ενεργότητα, συγκρινόμενα με τα εμπύρηνα (δυνατότητα γενωμικής απόκρισης) ΜΚΠΑ (Εικ. 7A2).

Μετά τον έλεγχο της ενεργότητας του πρωτεασώματος, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων (*PSMB5/β5, PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA3/α7, PSMA7/α3, RPN6, RPN11)* (Εικ. 7B), καθώς και τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα των β5 και α7 υπομονάδων (Εικ. 7Γ). Η πρωτεασωμική αναστολή φάνηκε ότι ακολουθείται από την αύξηση των επιπέδων mRNA στην πλειοψηφία των

πρωτεασωμικών γονιδίων και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β5 και α7 υπομονάδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η γονιδιακή έκφραση της β5 υπομονάδας μειώνεται σημαντικά την τρίτη κατά σειρά ημέρα χορήγησης του αναστολέα (στο χρονικό σημείο T8, όπου η ενεργότητα πρωτεασώματος είναι σημαντικά μειωμένη), ενώ τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης εμφανίζουν αύξηση.

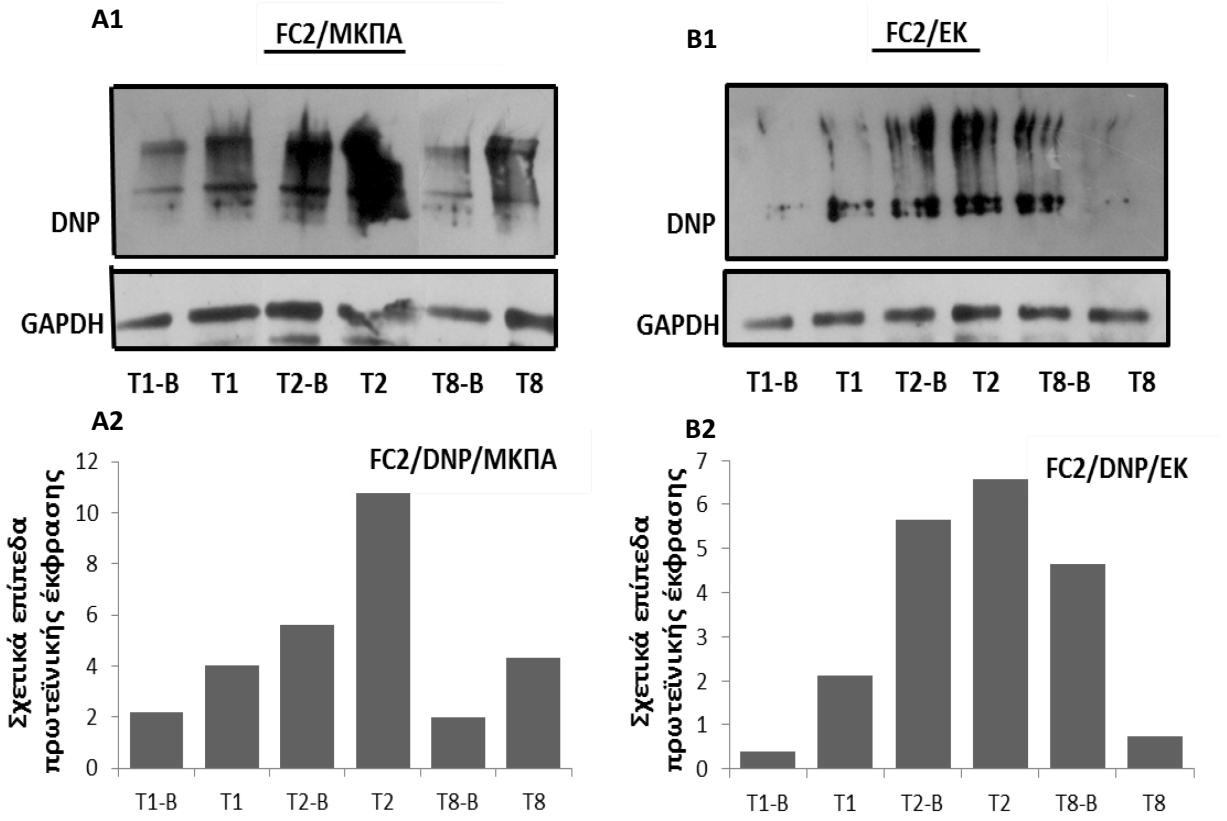


Εικόνα 7. Ασθενής FC2: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (A1) και ΕΚ (A2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης

των γονιδίων *PSMB5/β5, PSMA3/α7* (Β1) και *PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA7/α3, RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (Β2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

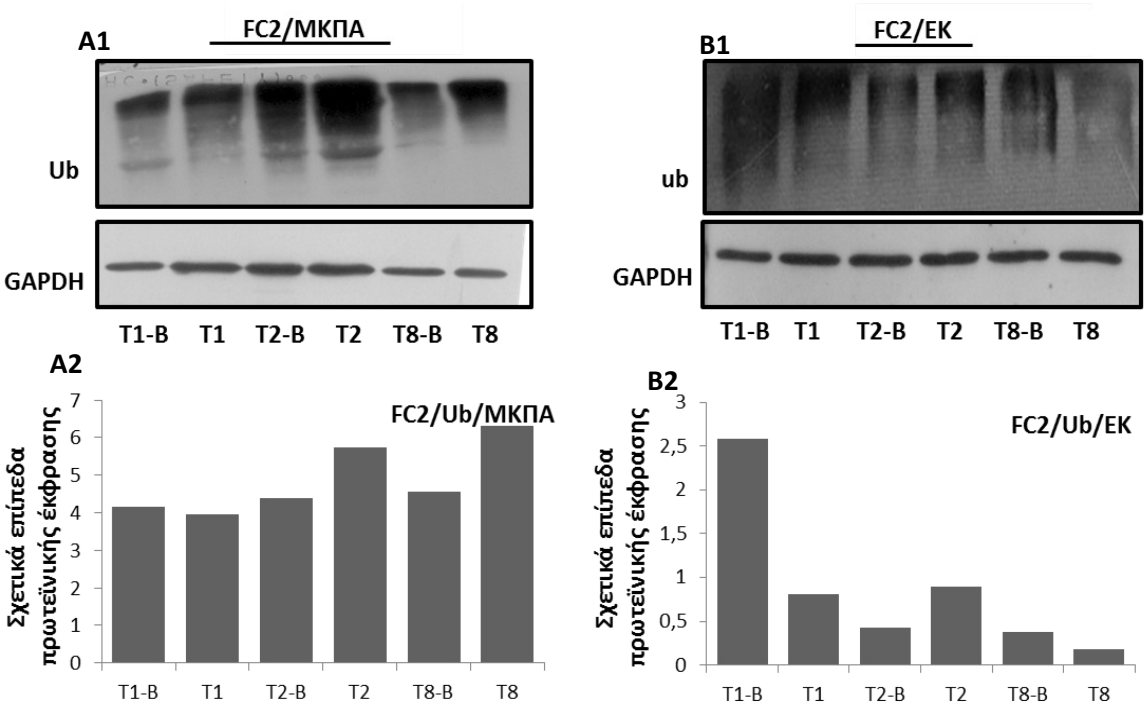
Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Η διαταραχή της πρωτεόστασης που προκαλείται από τη χορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα μελετήθηκε περαιτέρω μέσω της μελέτης των επιπέδων των οξειδωμένων και ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα ΜΚΠΑ και ΕΚ. Συγκεκριμένα, μετά την πρώτη χορήγηση του αναστολέα σημειώνεται αύξηση των επιπέδων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (Τ1) στα ΜΚΠΑ, τα οποία συνεχίζουν να αυξάνονται μέχρι και το πρώτο 24ωρο (Τ2-Β). Τα επίπεδά τους κορυφώνονται μετά τη δεύτερη χορήγηση του αναστολέα (Τ2), με το ρυθμό αύξησής τους να είναι ανάλογος της αναστολής του πρωτεασώματος (στο χρονικό σημείο Τ2 παρατηρείται και η μέγιστη μείωση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης). Έπειτα από 7 ημέρες θεραπείας και απουσία του αναστολέα (Τ8-Β) η ενεργότητα του πρωτεασώματος αυξάνεται, παραμένοντας όμως σε σημαντικά χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με το χρονικό σημείο Τ1-Β. Παράλληλα, στην ίδια χρονική στιγμή (Τ8-Β) σημειώνεται μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και εκ νέου αύξηση των επιπέδων τους μετά την τρίτη χορήγηση του CFZ (Εικ. 8Α1, Α2). Στα ΕΚ μέχρι και το χρονικό σημείο Τ2, τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών ακολουθούν το πρότυπο των ΜΚΠΑ, διαφοροποιούνται όμως στο χρονικό σημείο Τ8, καθώς μετά την αναστολή του πρωτεασώματος δεν παρατηρείται η ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσής τους (Εικ. 8Β1, Β2).



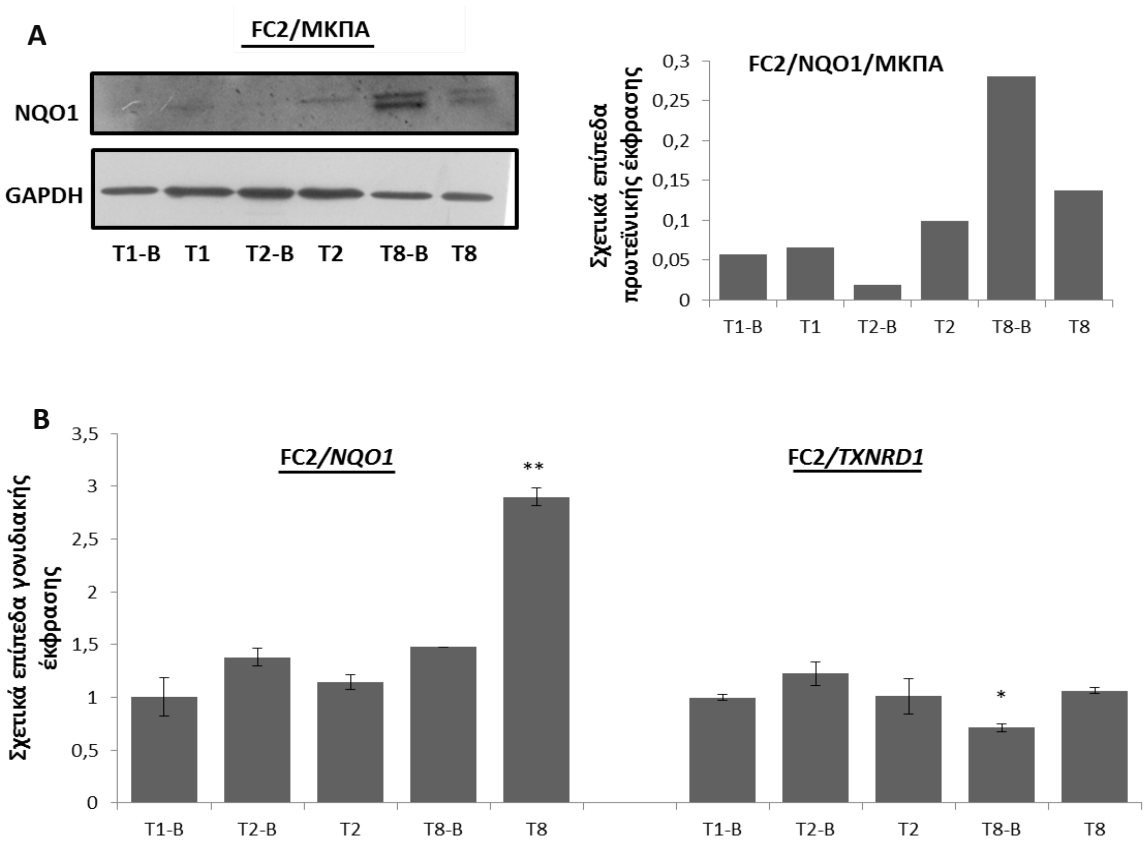
Εικόνα 8. Ασθενής FC2: Συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Τα επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεινών διαφοροποιούνται από αυτά των οξειδωμένων. Συγκεκριμένα, τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ παρατηρήθηκε μείωση της συσσώρευσής τους μετά την πρώτη χορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα που συνοδεύθηκε από αύξηση της μεταγραφής της β5 υπομονάδας. Στη συνέχεια, σημειώθηκε αύξηση μετά τη δεύτερη χορήγηση του αναστολέα, ενώ η τρίτη χορήγηση ακολουθήθηκε από εκ νέου μείωσή τους στα ΕΚ και αύξηση στα ΜΚΠΑ (Εικ. 9).



Εικόνα 9. Ασθενής FC2: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 αποτελεί μέρος του δικτύου πρωτεόστασης και κινητοποιεί την κυτταροπροστατευτική γενωμική απόκριση σε συνθήκες πρωτεοτοξικού και οξειδωτικού στρες. Σύμφωνα με αυτό, στα ΜΚΠΑ μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων NQO1 (NADPH quinone dehydrogenase, *NQO1* gene) και TXNRD1 (Thioredoxin reductase 1, *TXNRD1*gene) που ελέγχει.



Εικόνα 10. Ασθενής FC2: Πρωτεϊνική έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (A). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (B). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

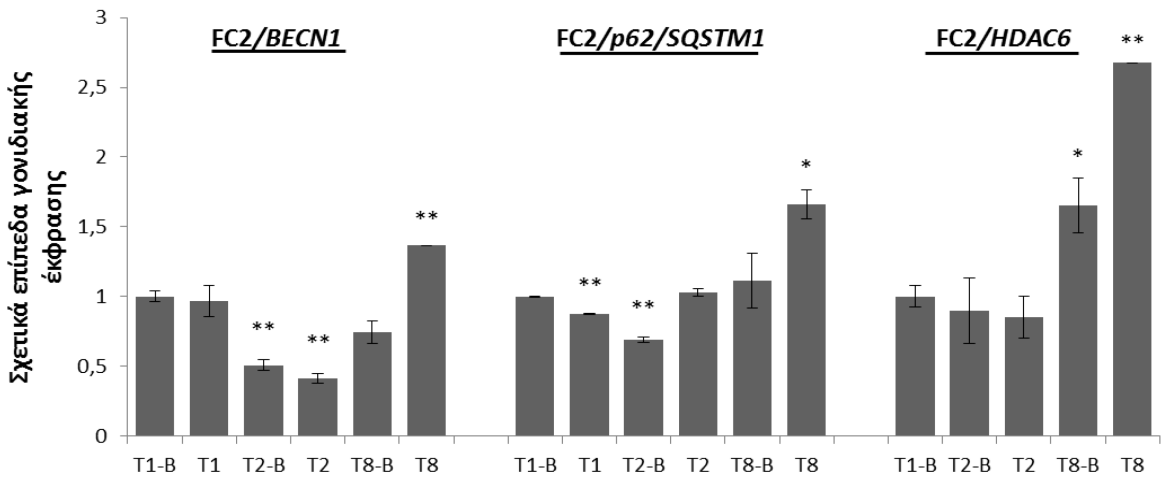
Κατά τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση μετά την τρίτη χορήγηση του αναστολέα (T8) (Εικ. 10B), ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου καταγράφονται υψηλότερα μετά από κάθε αναστολή του πρωτεασώματος (T1, T2), με εξαίρεση το χρονικό σημείο T8 κατά το οποίο τα πρωτεϊνικά επίπεδα σημειώνουν πτώση σε σχέση με το χρονικό σημείο T8-B (σημαντικά υψηλότερα από το χρονικό σημείο T1-B παρόλα αυτά) (Εικ. 10A) και η μεταγραφική ρύθμιση άνοδο (Εικ. 10B). Στα επίπεδα mRNA του *TXNRD1* γονιδίου δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις το πρώτο 24ωρο, αλλά στις 7 ημέρες από τη θεραπεία και απουσία αναστολέα φάνηκε η μείωση της μεταγραφικής ρύθμισής του και η μετέπειτα αύξησή της, πιθανώς ως απόκριση στην τρίτη χορήγηση

(T8) του αναστολέα (Εικ. 10Β). Στο χρονικό σημείο Τ8, παράλληλα με την αυξημένη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, παρατηρείται και μείωση στην έκφραση των οξειδωμένων πρωτεινών, σε σχέση με το σημείο Τ2 (Εικ. 8Α)

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

Το σύστημα αυτοφαγίας–λυσοσώματος αποτελεί μια μεταβολική διαδικασία κατά την οποία αποικοδομούνται πρωτεϊνικά συσσωματώματα, μακρομόρια και ολόκληρα οργανίδια. Στο σύστημα της αυτοφαγικής διαδικασίας συμμετέχουν η πρωτεΐνη αποακετυλάση 6 της ιστόνης (HDAC6) και η P62/Sequestosome 1 (SQSTM1), οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του σχηματισμού και της ωρίμανσης των συσσωματωμάτων και στην εκκαθάριση του κυττάρου από αυτά. Επιπλέον, στη ρύθμιση του αυτοφαγικού μονοπατιού ενεργό ρόλο φέρει και η πρωτεΐνη Beclin 1 (γονίδιο *BECN1*). Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων αυτών κατά τη γενωμική απόκριση των ΜΚΠΑ στην αναστολή της ενεργότητας της β5 υπομονάδας.

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων έδειξαν μια αρχική σημαντική πτώση της έκφρασης τους μέχρι και το πρώτο 24ωρο της αναστολής, όπου παράλληλα συμβαίνει η άνοδος των πρωτεασωμικών γονιδίων. Στη συνέχεια της θεραπείας και κατά την τρίτη αναστολή του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA και των τριών αυτοφαγικών γονιδίων, η οποία συνάδει και με τα μειωμένα επίπεδα mRNA της β5 υπομονάδας, αλλά και με τη μείωση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεινών (Εικ. 11).

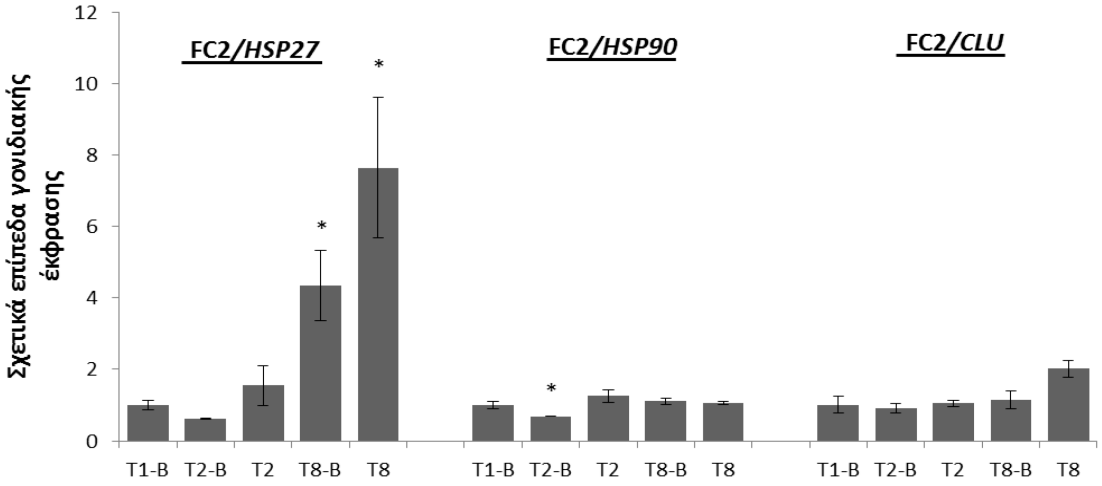


Εικόνα 11. Ασθενής FC2: Σχετικά επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *BECN1, p62/SQSTM1* και *HDAC6* στα ΜΚΠΑ. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Η σωστή λειτουργία του πρωτεώματος βασίζεται στην εύρυθμη λειτουργία τόσο του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) όσο και του πρωτεασώματος. Το ER ενεργοποιείται μετά την αναστολή του πρωτεασώματος και τη δημιουργία πρωτεοτοξικού και οξειδωτικού στρες και το κύτταρο οδηγείται βαθμιαία στη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και στην αύξηση της έκφρασης των μοριακών συνοδών και των συστατικών του πρωτεασώματος. Σύμφωνα με αυτό, εξετάστηκαν στα ΜΚΠΑ η γονιδιακή έκφραση των μοριακών συνοδών HSP27, HSP90 και Clusterin (CLU).

Η έκφραση των *HSP27, HSP90* και *CLU* γονιδίων στα ΜΚΠΑ, 24 ώρες μετά την πρώτη αναστολή του πρωτεασώματος παρατηρείται μειωμένη, ενώ κατά τη δεύτερη χορήγηση του φαρμάκου, η έκφραση αυξάνεται. Στα χρονικά σημεία T8-B και T8, τα επίπεδα mRNA του *HSP90* γονιδίου επανέρχονται στα βασικά, ενώ η έκφραση του *HSP27* γονιδίου και του γονιδίου της πρωτεΐνης CLU παρατηρείται αυξημένη σε σχέση το χρονικό σημείο T1-B (Εικ. 12).



Εικόνα 12. Ασθενής FC2: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27, HSP90* και *CLU.* Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

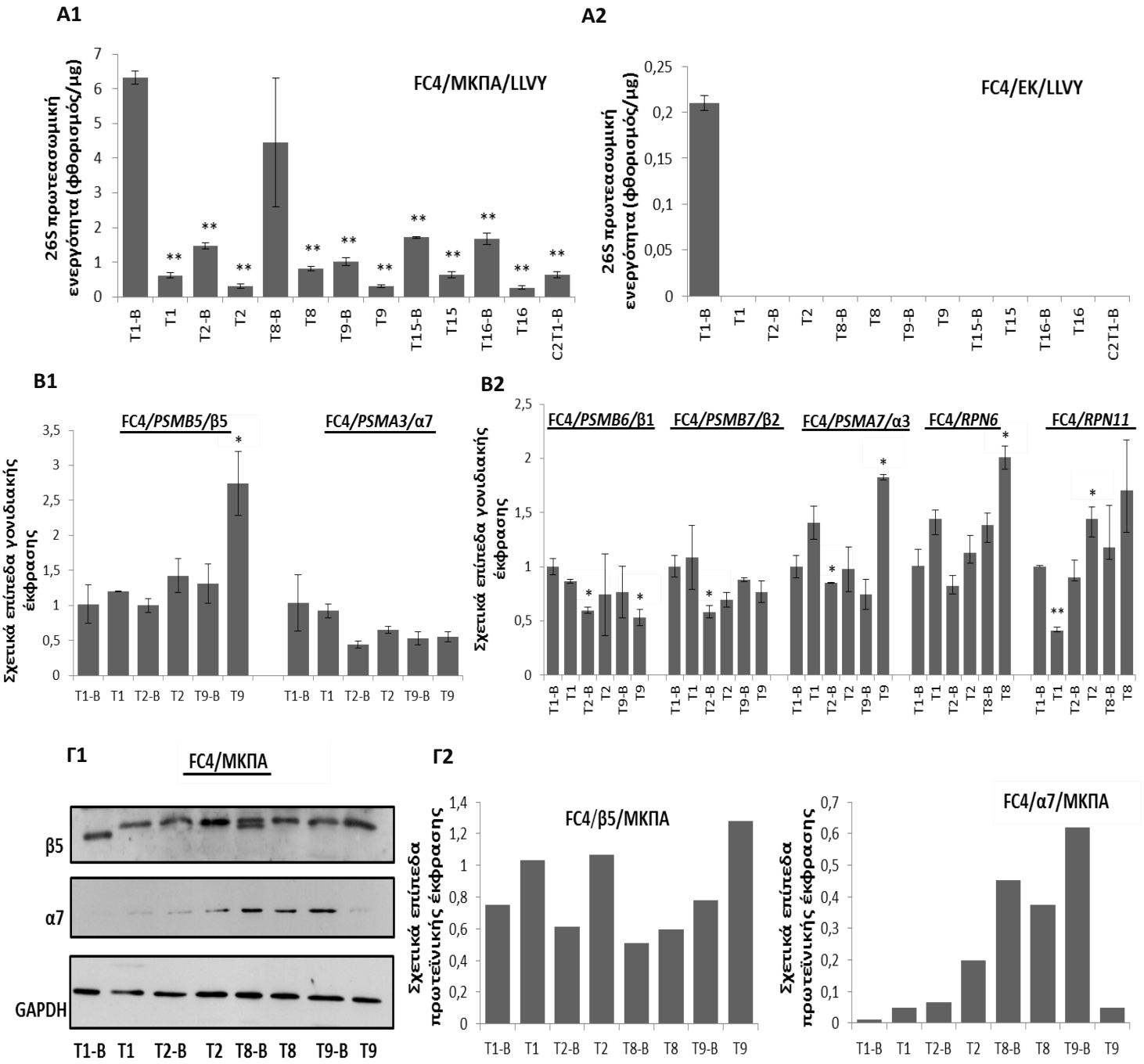
2. Ασθενής FC4 (Female Carfilzomib patient number 4)

Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

Μετά την πρωτεασωμική αναστολή παρατηρούμε σημαντική μείωση στην ενεργότητα χυμοθρυψίνης στα ΜΚΠΑ, η οποία παραμένει σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και την 2η κατά σειρά χορήγηση του φαρμάκου. Στις 7 ημέρες από τη 1^{η} θεραπεία και στο χρονικό σημείο Τ8-Β σημειώνεται η επαναφορά της ενεργότητας στα βασικά επίπεδα, η οποία έπειτα διατηρείται χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας (Εικ. 13Α1). Στην περίπτωση των ΕΚ, παρατηρήθηκε παρατεταμένα πλήρης αναστολή του πρωτεασώματος σε σχέση με το χρονικό σημείο Τ1-Β, καθώς σε κανένα άλλο χρονικό σημείο δε σημειώθηκε επαναφορά της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (Εικ. 13Α2).

Κατά τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων, παρατηρήθηκε αύξηση των σχετικών επιπέδων mRNA της β5 και α7 υπομονάδας του πρωτεασώματος μετά από κάθε χορήγηση του αναστολέα (Εικ. 13Β1). Αύξηση ακολουθούν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β5 και α7 υπομονάδας μετά την αναστολή, με εξαίρεση το χρονικό σημείο Τ8 και Τ9 της α7 πρωτεΐνης (Εικ. 13Γ2). Επιπλέον, οι υπομονάδες β1 και β2 (*PSMB6/β1* και *PSMB7/β2* γονίδια, αντίστοιχα) σημείωσαν μείωση της γονιδιακής τους έκφρασης κατά τη διάρκεια της θεραπείας, καθώς η

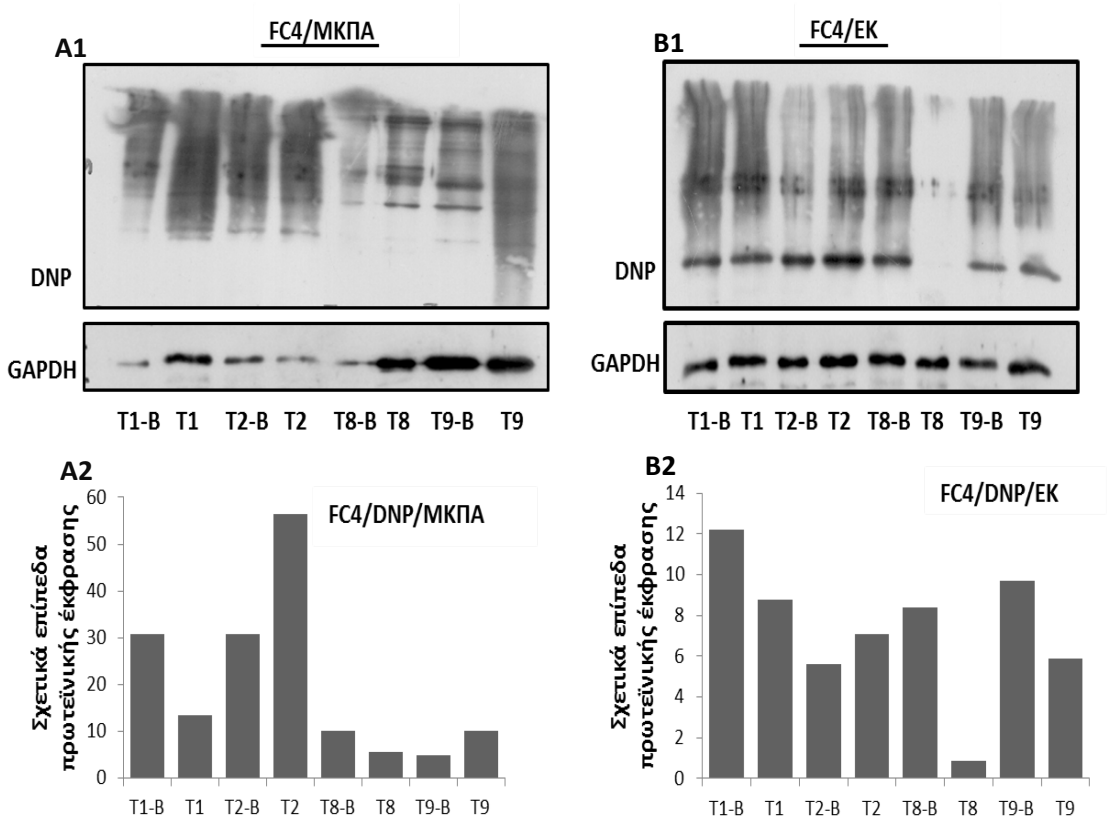
έκφρασή τους παρέμεινε σε χαμηλότερα επίπεδα από το χρονικό σημείο T1-B. Σχετικά με τα γονίδια *RPN6* και *RPN11* που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του 19S ρυθμιστικού τμήματος, παρατηρείται αύξηση της έκφρασής τους, σχεδόν μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Ίδια ρύθμιση παρουσιάζει και το γονίδιο *PSMA7* (Εικ. 13B2).



Εικόνα 13. Ασθενής FC4: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (Α1) και ΕΚ (Α2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB5/β5, PSMA3/α7* (Β1) και *PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA7/α3, RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (Β2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

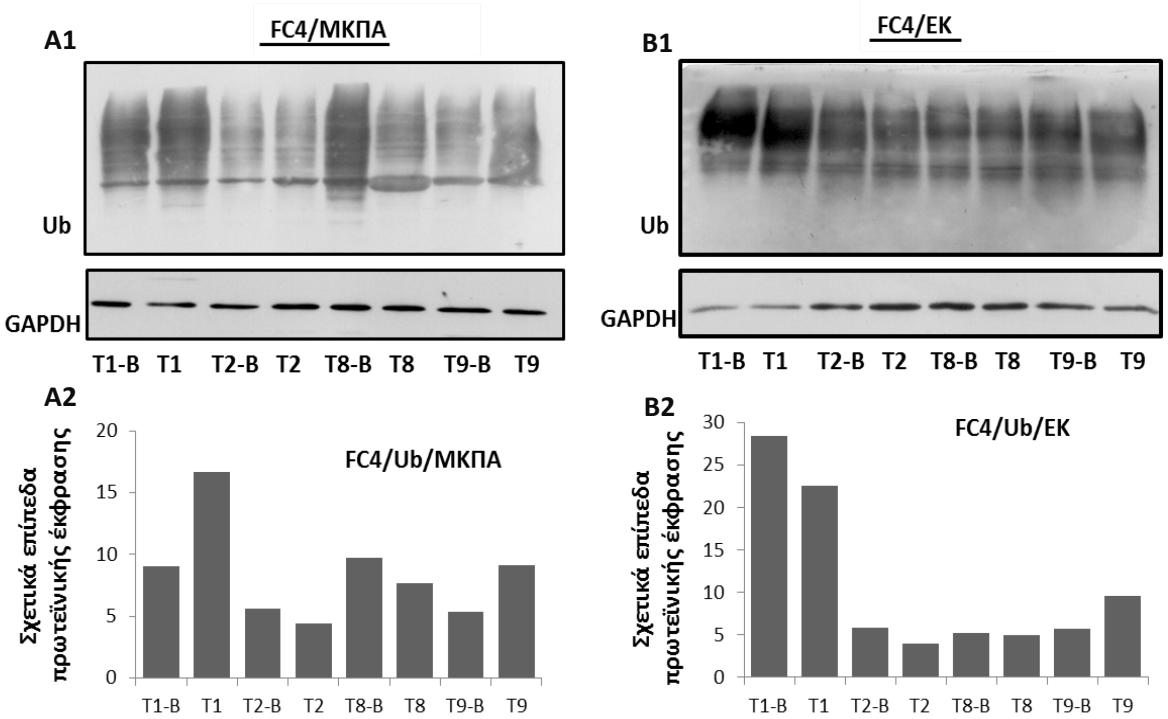
Στα ΕΚ, μετά την κάθε χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος παρατηρείται μείωση στο φορτίο των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, με εξαίρεση το χρονικό σημείο Τ2. Στην περίπτωση των ΜΚΠΑ, σημειώνεται μείωση μετά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου, αύξηση μετά τη δεύτερη και το ίδιο μοτίβο επαναλαμβάνεται και κατά τη δεύτερη εβδομάδα της θεραπείας (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Ασθενής FC4: Συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Α1, Β1) και ποσοτικοποίησή τους (Α2, Β2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ κατά τη διάρκεια της

θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Στην περίπτωση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα ΜΚΠΑ, παρατηρείται αύξηση στην πρώτη και τέταρτη κατά σειρά χορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα (T1 και T9), ενώ μείωση στα χρονικά σημεία T2 και T8. Στα ΕΚ, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών εμφανίζονται μειωμένα συγκρινόμενα με το χρονικό σημείο T1-B, ενώ παρατηρείται μια ήπια αύξηση των επιπέδων τους μετά την τέταρτη χορήγηση του αναστολέα (Εικ. 15).



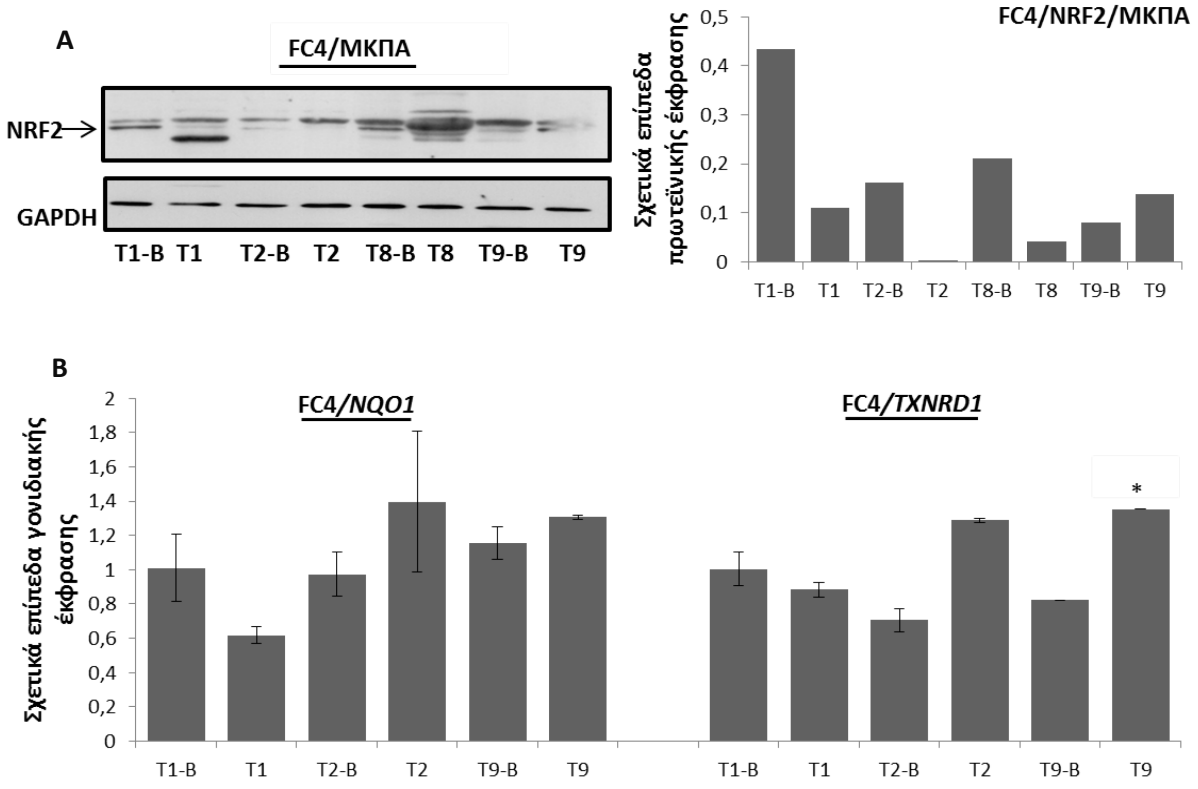
Εικόνα 15. Ασθενής FC4: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική απόκριση των ΜΚΠΑ εξετάζοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και τη γονιδιακή έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα παρατηρούνται μειωμένα σε σύγκριση με το χρονικό σημείο T1-B και έπειτα από κάθε χορήγηση σημειώνεται περαιτέρω μείωση. Συγκεκριμένα στο χρονικό σημείο T9, στο οποίο έχουμε

σημαντική αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της β5 υπομονάδας και αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, παρατηρείται και αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του NRF2 (Εικ. 16Α).

Η μεταγραφική ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων NQO1 και TXNRD1 είναι παρόμοια, καθώς τα επίπεδα mRNA και των δύο ενζύμων παρουσιάζουν μείωση μετά την πρώτη αναστολή και στη συνέχεια αύξηση. Στο χρονικό σημείο Τ9, η γονιδιακή έκφραση του *TXNRD1* αυξάνεται σημαντικά, όπου παράλληλα συμβαίνει και αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του NRF2 (Εικ. 16Β).

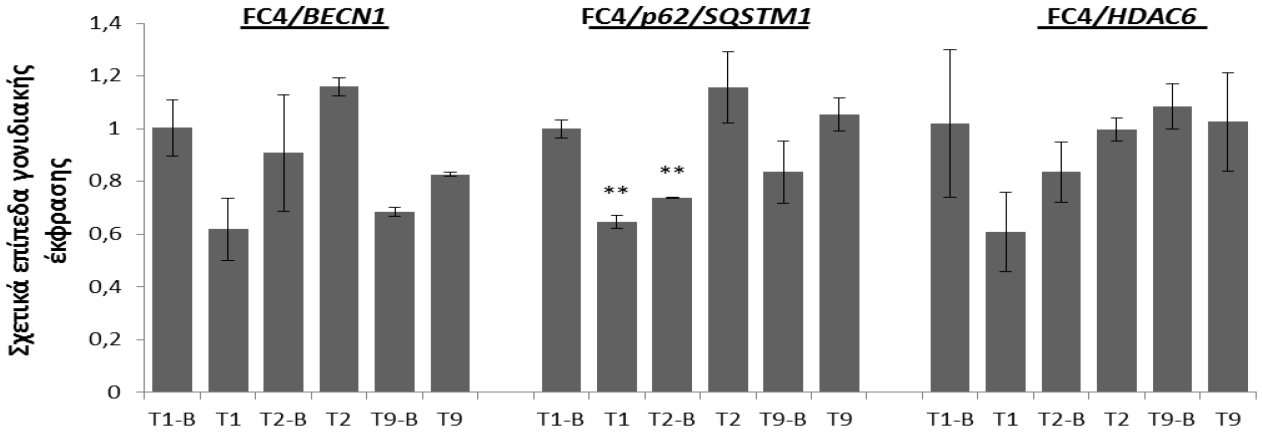


Εικόνα 16. Ασθενής FC4: Πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Α). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (Β). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

Και τα τρία αυτοφαγικά γονίδια, μετά την πρώτη χορήγηση του CFZ και μέχρι το πρώτο 24ωρο παρουσιάζουν μείωση στη γονιδιακή τους έκφραση, όπου παράλληλα

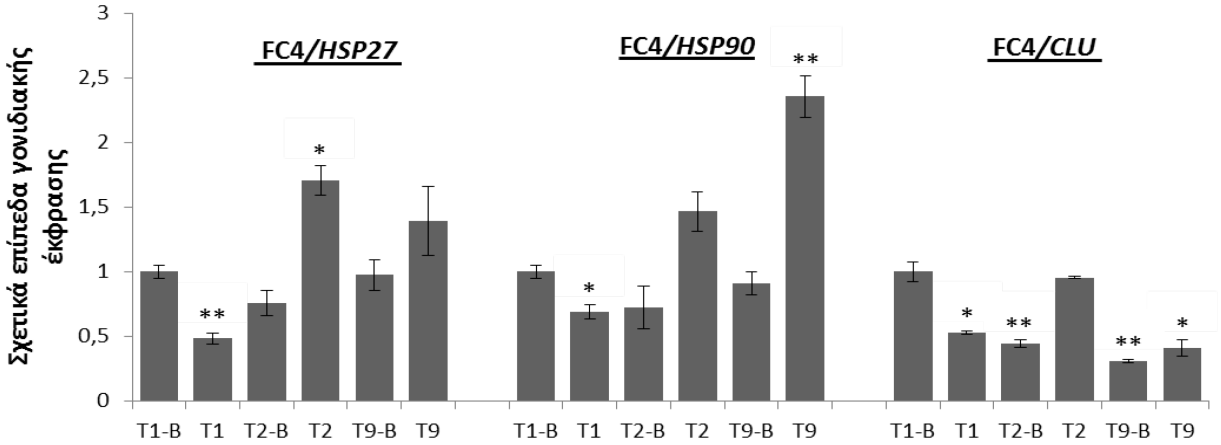
παρατηρείται η αύξηση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα ΜΚΠΑ και η αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της β5 υπομονάδας (Εικ. 13Β, Εικ. 15Α, Εικ. 17). Στη συνέχεια, μετά τη δεύτερη αναστολή η γονιδιακή έκφραση της Beclin1, η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι της αυτοφαγίας, και της P62/SQSTM1 και HDAC6, οι οποίες συμβάλλουν την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων, εμφανίζεται αυξημένη. Ταυτόχρονα, στο ίδιο χρονικό σημείο, οι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες παρατηρούνται μειωμένες (Εικ. 15Α). Στην τέταρτη κατά σειρά χορήγηση του αναστολέα, όπου έχουμε και σημαντική αύξηση στα επίπεδα mRNA των πρωτεασωμικών γονιδίων, παρατηρείται χαμηλή ή ίση η έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων, σε σχέση με το χρονικό σημείο Τ1-Β (Εικ. 13Β, Εικ. 17).



Εικόνα 17. Ασθενής FC4: Σχετικά επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *BECN1, p62/SQSTM1* και *HDAC6* στα ΜΚΠΑ. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Οι μοριακές συνοδοί HSP90 και HSP27 παρουσιάζουν κοινή αυξομείωση των επιπέδων mRNA τους και ακολουθούν τα επίπεδα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μετά την πρώτη αναστολή παρατηρείται μείωση στα επίπεδα της έκφρασής τους, ενώ στις επόμενες χορηγήσεις του αναστολέα, τη χαμηλή ενεργότητα την ακολουθεί και υψηλή γονιδιακή έκφραση των *HSP90* και *HSP27* (Εικ. 18).

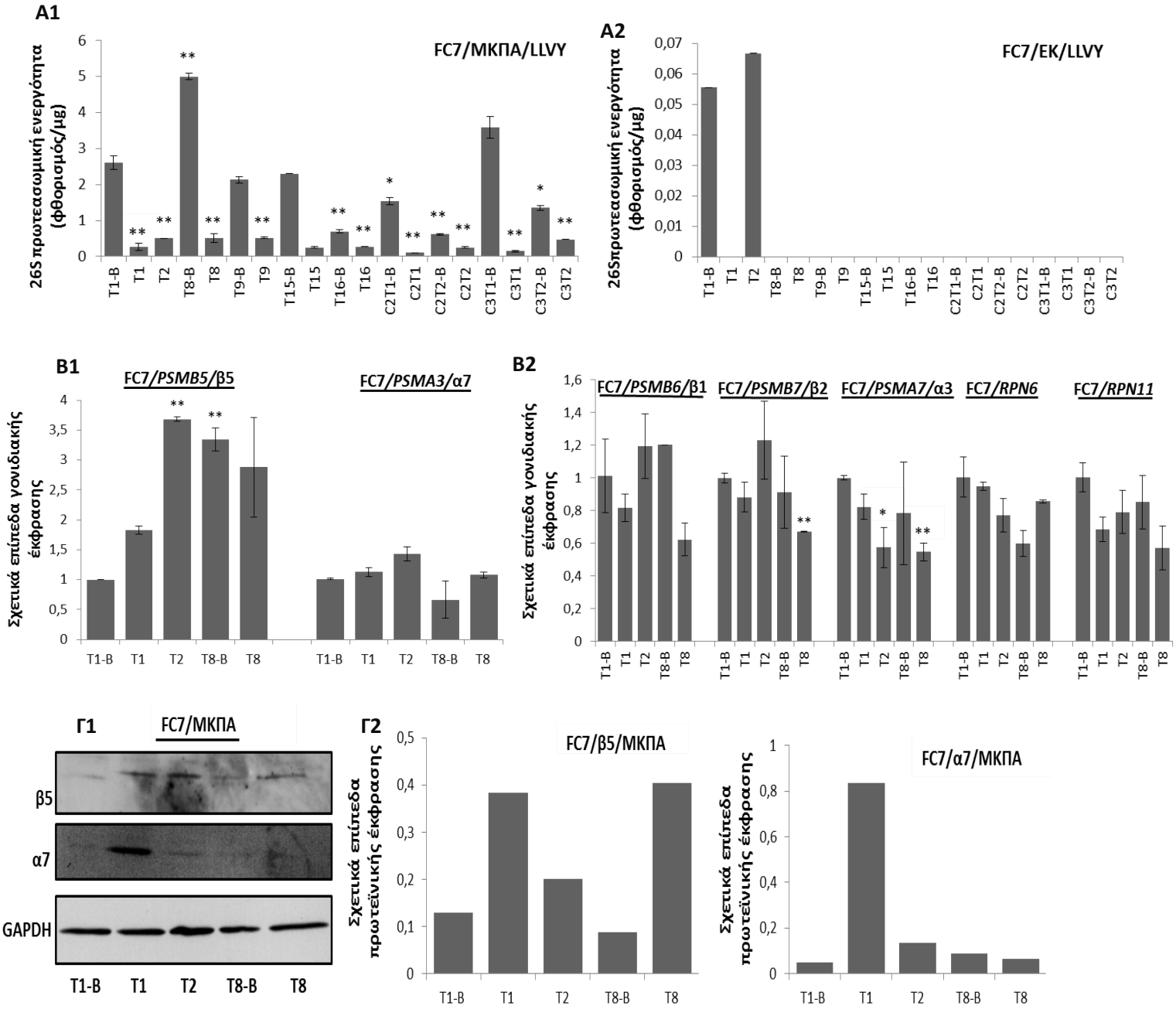


Εικόνα 18. Ασθενής FC4: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27*, *HSP90* και *CLU*. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

3. Ασθενής FC7 (Female Carfilzomib patient number 7)

Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

Η χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ ανέστειλε την ενεργότητα χυμοθρυψίνης στα ΜΚΠΑ, η οποία παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι το χρονικό σημείο T2. Στην έναρξη της δεύτερης εβδομάδας της θεραπείας και πριν τη χορήγηση του αναστολέα (T8-B) παρατηρείται σημαντική αύξηση στην ενεργότητα της β5 υπομονάδας, η οποία ξεπερνάει την ενεργότητα του χρονικού σημείου T1-B. Έπειτα, αυτή μειώνεται σημαντικά και στα χρονικά σημεία T9-B και T15-B επανέρχεται σε επίπεδα κοντά στα βασικά (Εικ. 19A1). Ανάκαμψη παρατηρείται και στο χρονικό σημείο C3T1-B. Στην περίπτωση των ΕΚ, παρατηρείται πλήρης αναστολή του πρωτεασώματος, με εξαίρεση το χρονικό σημείο T2 (Εικ. 19A2).



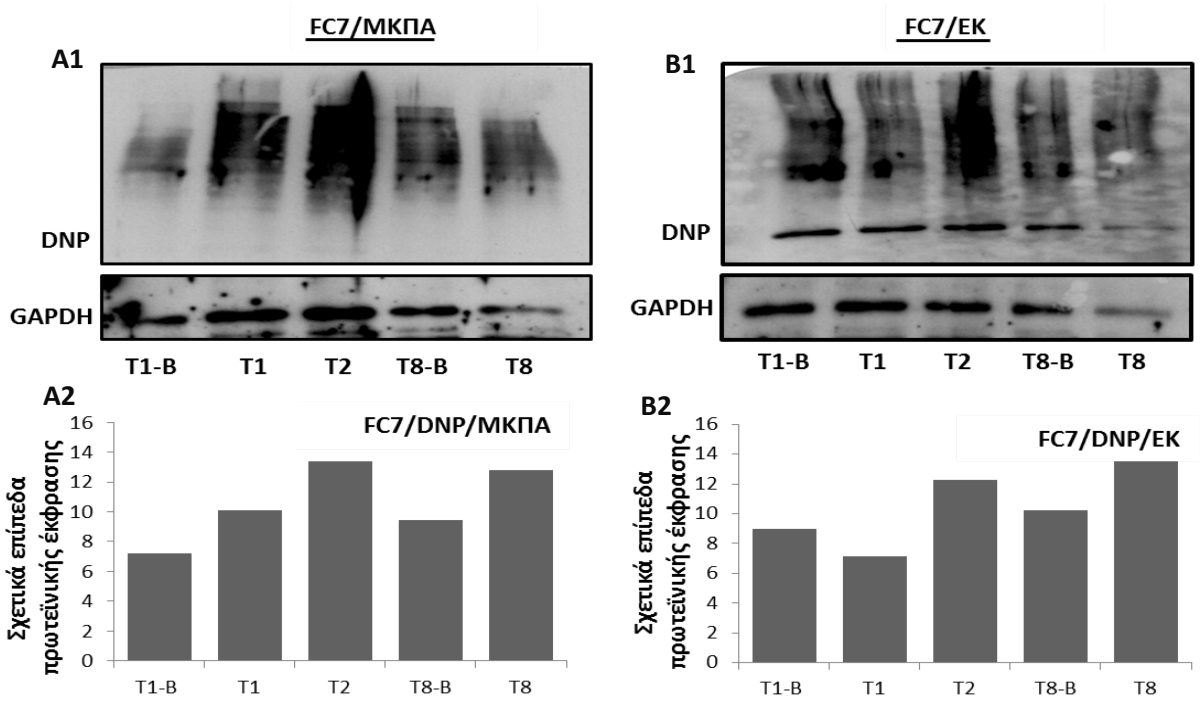
Εικόνα 19. Ασθενής FC7: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (Α1) και ΕΚ (Α2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB5/β5, PSMA3/α7* (Β1) και *PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA7/α3, RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (Β2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της β5 υπομονάδας αυξάνουν σημαντικά μετά την αναστολή του πρωτεασώματος. Στο χρονικό σημείο Τ8-Β, όπου σημειώνεται παράλληλα σημαντική αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης, παρατηρείται και σημαντικά αυξημένη μεταγραφική ρύθμιση της β5 υπομονάδας, η οποία παραμένει στα ίδια επίπεδα και μετά την τρίτη χορήγηση του αναστολέα (Εικ. 19Β1). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β5 υπομονάδας παρουσιάζουν αύξηση μετά από κάθε αναστολή, σε αντίθεση μετά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της α7 υπομονάδας, τα οποία αυξάνονται στο Τ1 χρονικό σημείο και έπειτα παραμένουν στα βασικά επίπεδα (Εικ. 19Γ).

Η έκφραση των υπόλοιπων πρωτεασωμικών γονιδίων στα χρονικά σημεία Τ1, Τ2 και Τ8 είναι μειωμένη, με εξαίρεση το χρονικό σημείο Τ2 των γονιδίων της β1 και β2 υπομονάδας (*PSMB6/β1* και *PSMB7/β2* γονίδια, αντίστοιχα) (Εικ. 19Β2).

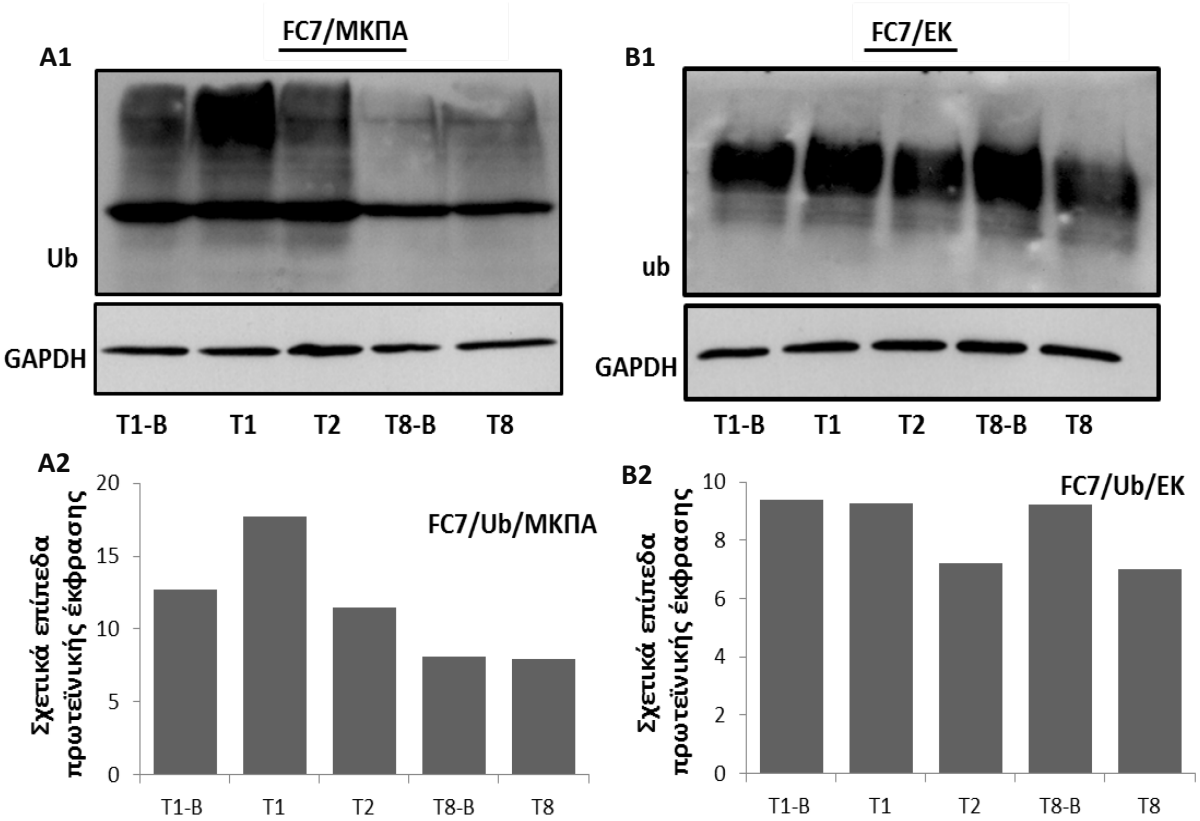
Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Κατά τη μελέτη της πρωτεόστασης μετά την αναστολή του πρωτεασώματος, οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες στα ΜΚΠΑ παρουσιάζονται αυξημένες σε σχέση με το χρονικό σημείο Τ1-Β. Στα ΕΚ, μετά την πρώτη χορήγηση του αναστολέα, παρατηρείται μείωση στο φορτίο των οξειδωμένων πρωτεϊνών, στη συνέχεια όμως κάθε χορήγηση αναστολέα ακολουθείται από την άνοδό τους (Εικ. 20).



Εικόνα 20. Ασθενής FC7: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

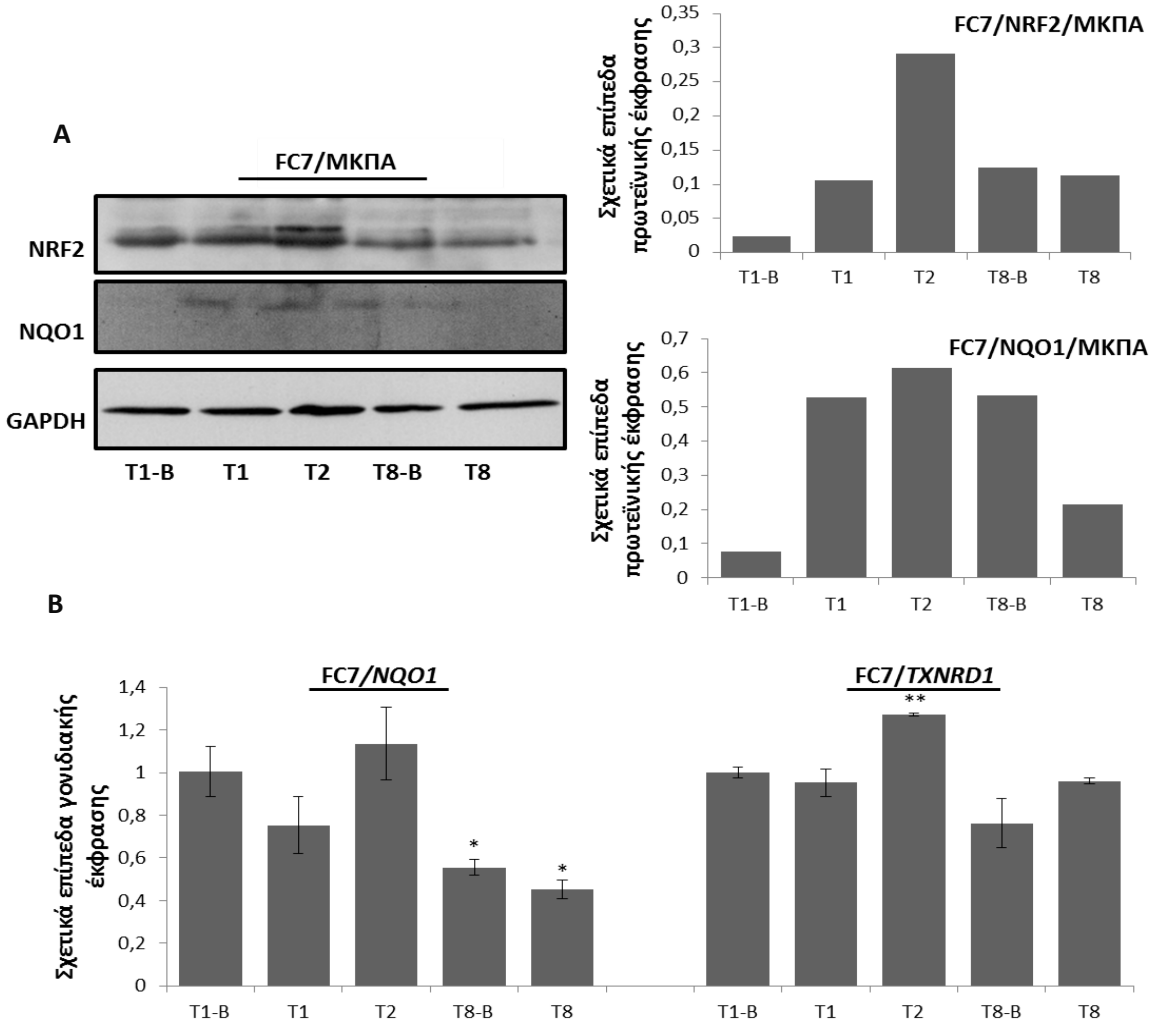
Στα ΜΚΠΑ παρατηρείται συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεινών μόνο μετά την πρώτη χορήγηση του αναστολέα. Στα επόμενα χρονικά σημεία, η συγκέντρωση τους παραμένει στα βασικά επίπεδα (T2) ή εμφανίζεται μειωμένη (T8-B, T8). Στα ΕΚ, δεν παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα τους μετα την πρώτη αναστολή του πρωτεασώματος, ενώ στις επόμενες δύο χορηγήσεις παρατηρείται σχετική μείωση (Εικ. 21).



Εικόνα 21. Ασθενής FC7: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Η απόκριση των ΜΚΠΑ στο οξειδωτικό στρες που προκάλεσε ο πρωτεασωμικός αναστολέας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, η οποία είναι ανάλογη της αύξησης των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεινών. Στο χρονικό σημείο T2 παρατηρείται η μέγιστη πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα, όπου παράλληλα υπάρχουν και υψηλά επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 22A). Στο ίδιο χρονικό σημείο, παρατηρούνται επίσης υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα (Εικ. 22A) και αυξημένη γονιδιακή έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1, καθώς και αυξημένη μεταγραφική ρύθμιση του *TXNRD1* γονιδίου (Εικ. 22B). Στο χρονικό σημείο T8-B, και ενώ οι οξειδωμένες πρωτεΐνες μειώνονται, παρατηρείται μείωση και στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2 και στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων των ενζύμων που ελέγχει. Επιπλέον, στο χρονικό σημείο T8 η αύξηση των επιπέδων των οξειδωμένων

πρωτεϊνών δεν ακολουθείται από αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του NRF2 και του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1.

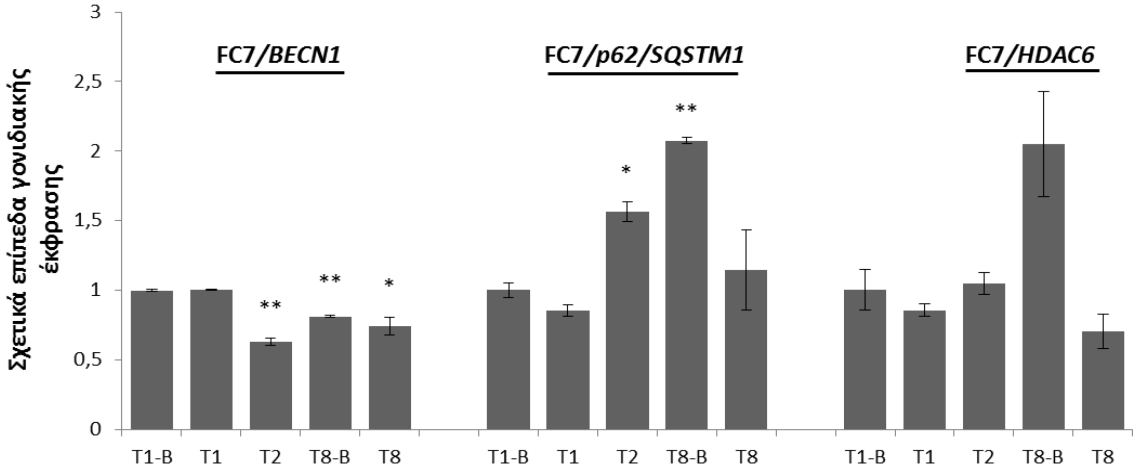


Εικόνα 22. Ασθενής FC7: Πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (A). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (B). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *BECN1* παρατηρούνται μειωμένα μετά την αναστολή του πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, στα χρονικά σημεία T2, T8-B και T8 η γονιδιακή έκφραση του *BECN1*σημειώνει σημαντική πτώση, ενώ παράλληλα στα ίδια

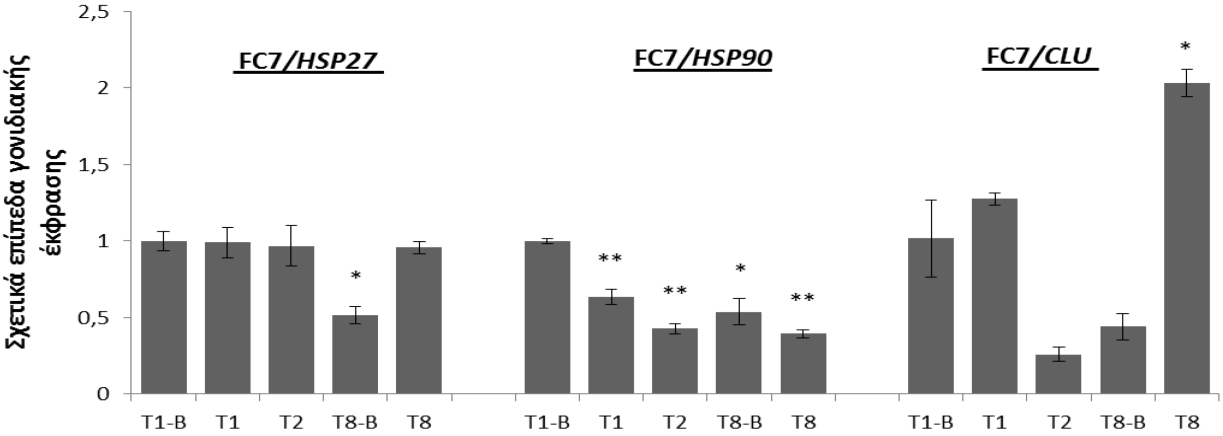
χρονικά σημεία τόσο η γονιδιακή όσο και η πρωτεϊνική έκφραση της β5 υπομονάδας (πλην του χρονικού σημείου Τ8-Β) εμφανίζεται σημαντικά αυξημένη (Εικ. 19Γ). Από την άλλη πλευρά, η P62/SQSTM1 πρωτεΐνη και η HDAC6, που συμμετέχουν στην ωρίμανση των συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών και της απομάκρυνσής τους από το κύτταρο παρουσιάζουν αύξηση της μεταγραφικής τους ρύθμισης στα χρονικά σημεία Τ2 και Τ8-Β, ενώ παράλληλα παρατηρείται μείωση στα επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 23).



Εικόνα 23. Ασθενής FC7: Σχετικά επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *BECN1, p62/SQSTM1* <u>*και*</u> *HDAC6* στα ΜΚΠΑ. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Η γονιδιακή έκφραση των μοριακών συνοδών HSP90 και HSP27 καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας, παρατηρείται είτε σημαντικά μειωμένη είτε στα βασικά επίπεδα. Στην περίπτωση του γονιδίου της πρωτεΐνης CLU, παρατηρείται ότι τα επίπεδα mRNA μειώνονται μετά τη δεύτερη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα σε αντίθεση με το χρονικό σημείο Τ8, όπου σημειώνεται σημαντική αύξηση σε σχέση με το χρονικό σημείο Τ1-Β (Εικ. 24).

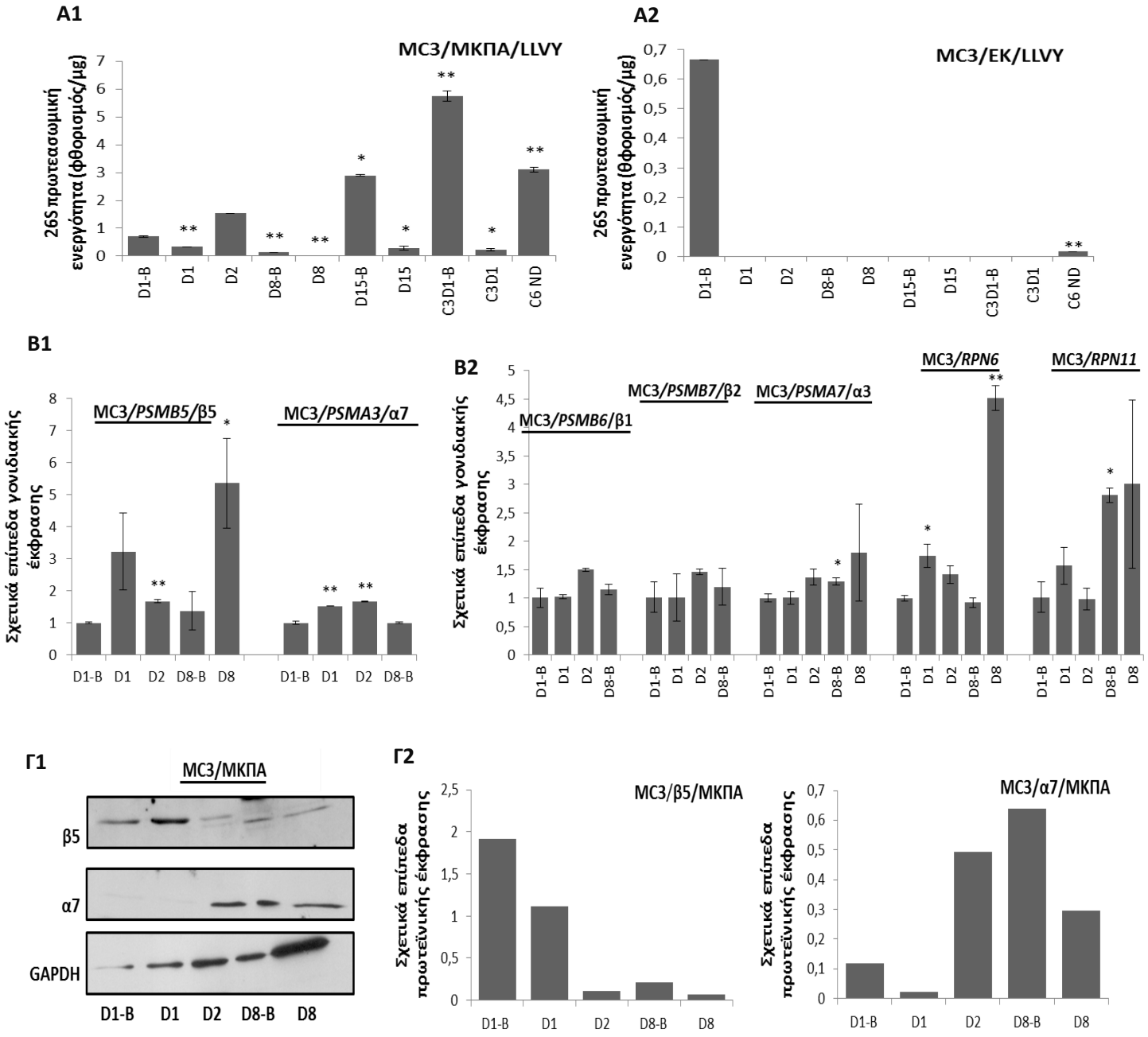


Εικόνα 24. Ασθενής FC7: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27*, *HSP90* και *CLU*. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

4. Ασθενής MC3 (Male Carfilzomib patient number 3)

Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

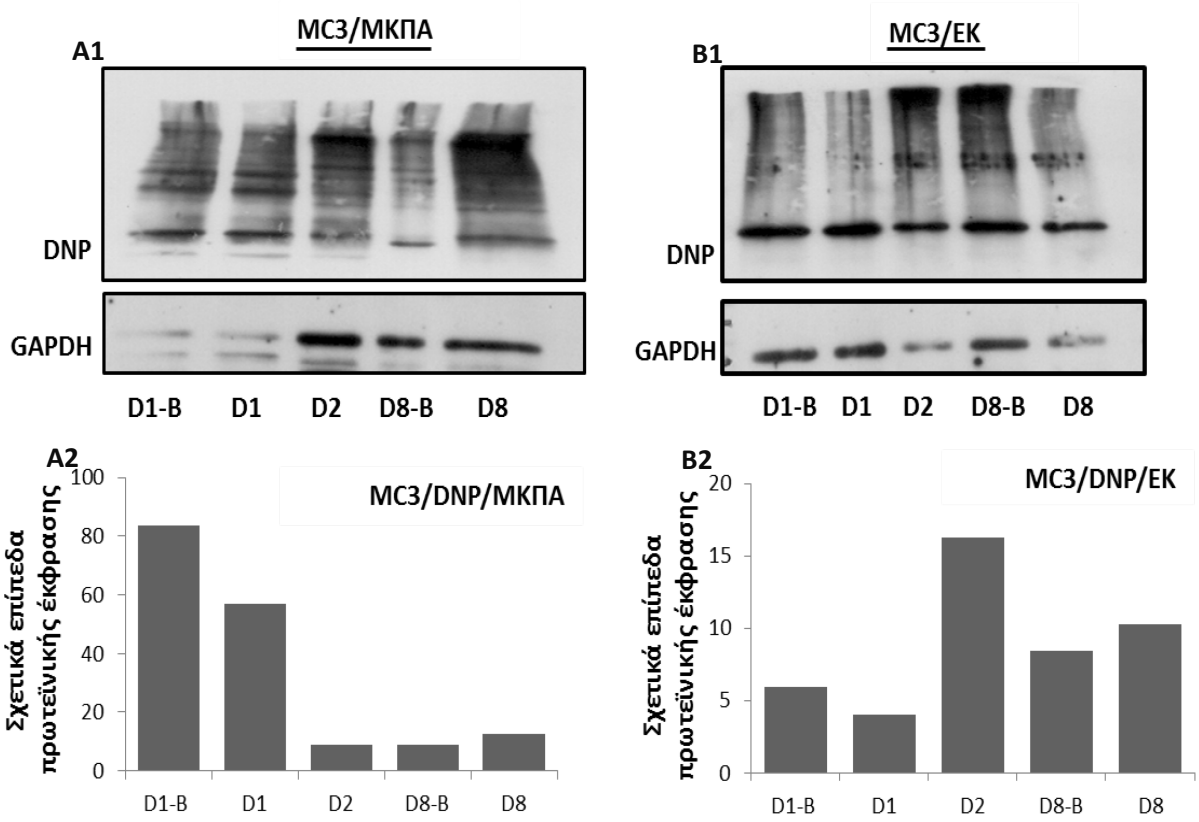
Μετά την αναστολή του πρωτεασώματος, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης, η οποία επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα μετά το πέρας των 24 ωρών. Στις 7 ημέρες από την πρώτη θεραπεία η ενεργότητα του πρωτεασώματος εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και διατηρείται σε αυτά και μετά τη δεύτερη χορήγηση του αναστολέα. Στα χρονικά σημεία D15-B, C3D1-B και C6 ND (no drug), όπου δεν έχει προηγηθεί χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα, παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της πρωτεασωμικής ενεργότητας, η οποία όμως μειώνεται μετά από κάθε χορήγηση πρωτεασωμικού αναστολέα (Εικ.25Α1). Στην περίπτωση των ΕΚ, παρατηρείται πλήρης αναστολή του πρωτεασώματος (Εικ. 25Α2).



Εικόνα 25. Ασθενής MC3: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (A1) και ΕΚ (A2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB5/β5, PSMA3/α7* (B1) και *PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA7/α3, RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (B2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

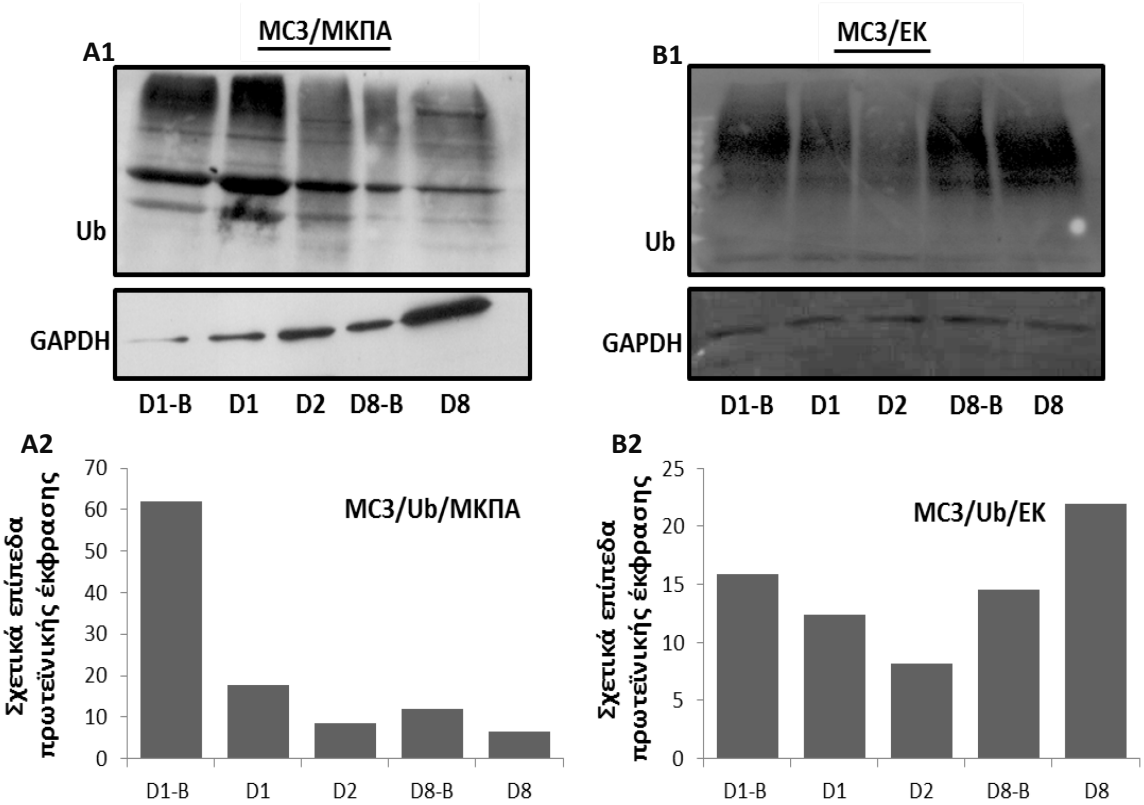
Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Στα ΜΚΠΑ παρατηρείται ότι η χορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα CFZ οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Σε αντίθεση, στα ΕΚ διαπιστώθηκε ότι ενώ αρχικά η πρωτεασωμική αναστολή προκαλεί μείωση του φορτίου των οξειδωμένων πρωτεϊνών, στις 24 ώρες από τη θεραπεία και έπειτα η συγκέντρωση ακολουθεί ανοδική πορεία σε σύγκριση με το χρονικό σημείο T1-B (Εικ. 26).



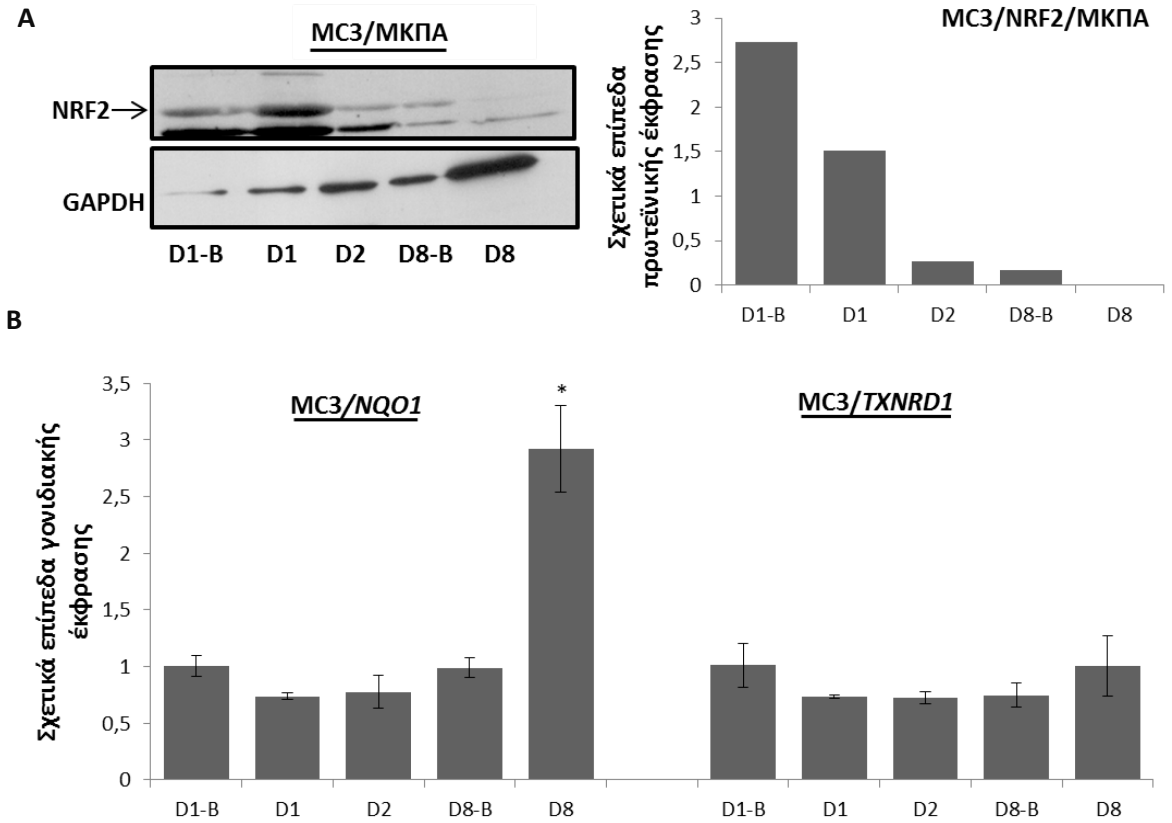
Εικόνα 26. Ασθενής MC3: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Στην περίπτωση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα ΜΚΠΑ σημειώνεται μείωση των επιπέδων τους μετά την κάθε χορήγηση του αναστολέα. Αντίθετα στα ΕΚ η αρχική μείωση που παρατηρείται στα χρονικά σημεία D1 και D2 ακολουθείται από επαναφορά στα βασικά επίπεδα και περαιτέρω αύξηση μετά τη δεύτερη χορήγηση του φαρμάκου (Εικ. 27).



Εικόνα 27. Ασθενής MC3: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

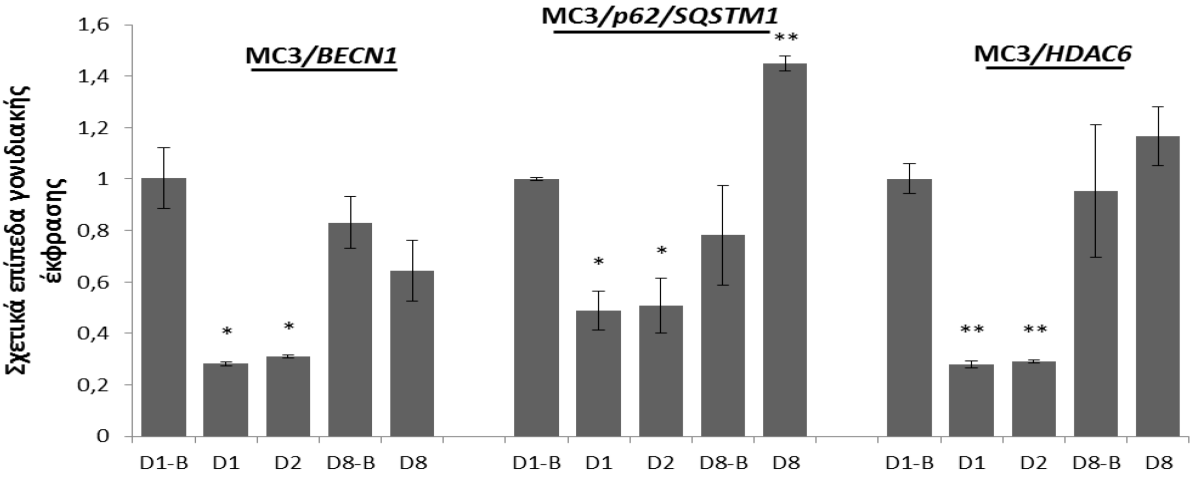
Κατά τη μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και την απόκριση των ΜΚΠΑ στην πρωτεασωμική αναστολή, παρουσιάσθηκε μείωση στην πρωτεϊνική του έκφραση (Εικ. 28A). Μειωμένα βρέθηκαν επίσης και τα επίπεδα των οξειδωμένων και ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών στα αντίστοιχα χρονικά σημεία. Η μεταγραφική ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενζύμων που επάγεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, κυμάνθηκε στα βασικά επίπεδα, με εξαίρεση να αποτελεί η έκφραση του *NQO1* γονιδίου στο χρονικό σημείο D8 (Εικ. 28B).



Εικόνα 28. Ασθενής MC3: Πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (A). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (B). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

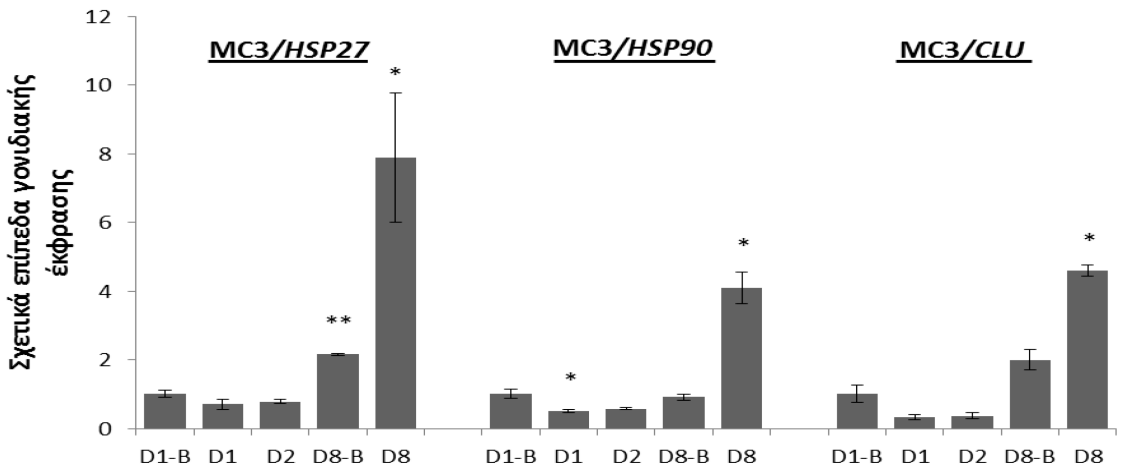
Η γονιδιακή έκφραση και των τριών αυτοφαγικών γονιδίων ακολουθεί κοινό μοτίβο. Μέχρι και το πρώτο 24ωρο μετά την αρχική αναστολή παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA, ενώ παράλληλα η έκφραση του γονιδίου της β5 υπομονάδας εμφανίζεται αυξημένη. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία, εντοπίζεται επαναφορά της γονιδιακής έκφρασης στα επίπεδα του χρονικού σημείου D1-B, και ακολουθεί η αύξηση της μετά τη δεύτερη αναστολή, με εξαίρεση το χρονικό σημείο D8 του γονιδίου *BECN1* (Εικ. 29).



Εικόνα 29. Ασθενής MC3: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BECN1*, *p62*/*SQSTM1* και *HDAC6* στα ΜΚΠΑ του ασθενούς MC3. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Κατά τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων των μοριακών συνοδών HSP90, HSP27 και CLU, παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων του mRNA των γονιδίων αμέσως μετά την αναστολή του πρωτεασώματος και παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και το πρώτο 24ωρο. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία, ακολούθησε αύξηση της έκφρασης σε υψηλότερα επίπεδα συγκρινόμενα με το χρονικό σημείο T1-B και έπειτα της δεύτερης αναστολής σημειώθηκε περαιτέρω σημαντική αύξηση (Εικ. 30).

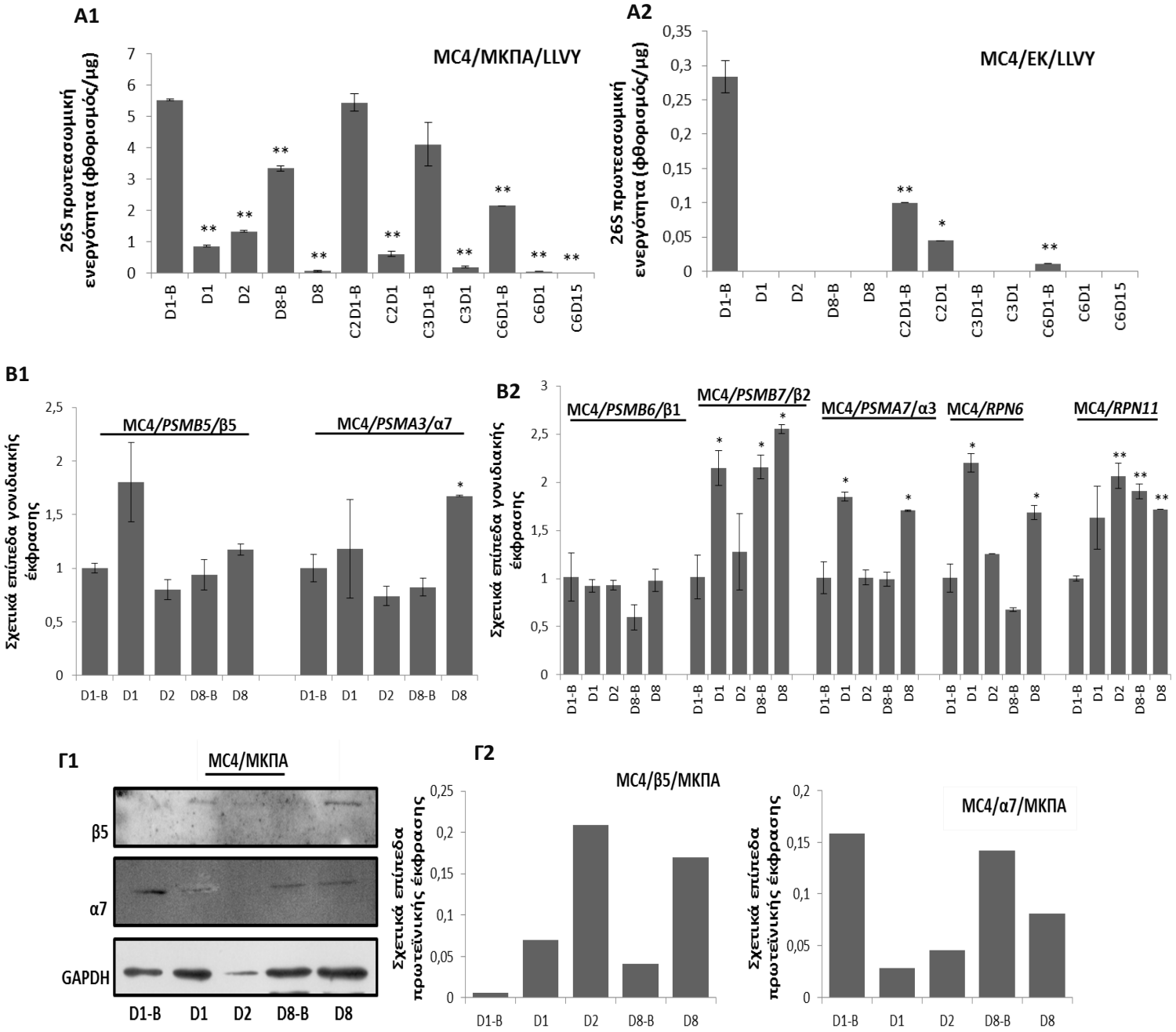


Εικόνα 30. Ασθενής MC3: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27*, *HSP90* και *CLU*. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

5. Ασθενής MC4 (Male Carfilzomib patient number 4)

Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

Η χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ ανέστειλε σημαντικά την ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος στα ΜΚΠΑ, η οποία παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και 7 ημέρες μετά τη θεραπεία. Στην έναρξη του 2^{ου} και 3^{ου} κύκλου παρατηρήθηκε επαναφορά της ενεργότητας (Εικ. 31Α1). Στα ΕΚ, η ενεργότητα του πρωτεασώματος σημείωσε πλήρη αναστολή στον πρώτο και τρίτο κύκλο, ενώ στην έναρξη του δευτέρου και έκτου κύκλου παρατηρήθηκε μία αύξηση στην πρωτεασωμική ενεργότητα, με τα επίπεδα του φθορισμού όμως να παραμένουν σημαντικά χαμηλά συγκριτικά με το χρονικό σημείο Τ1-Β (Εικ. 31Α2).



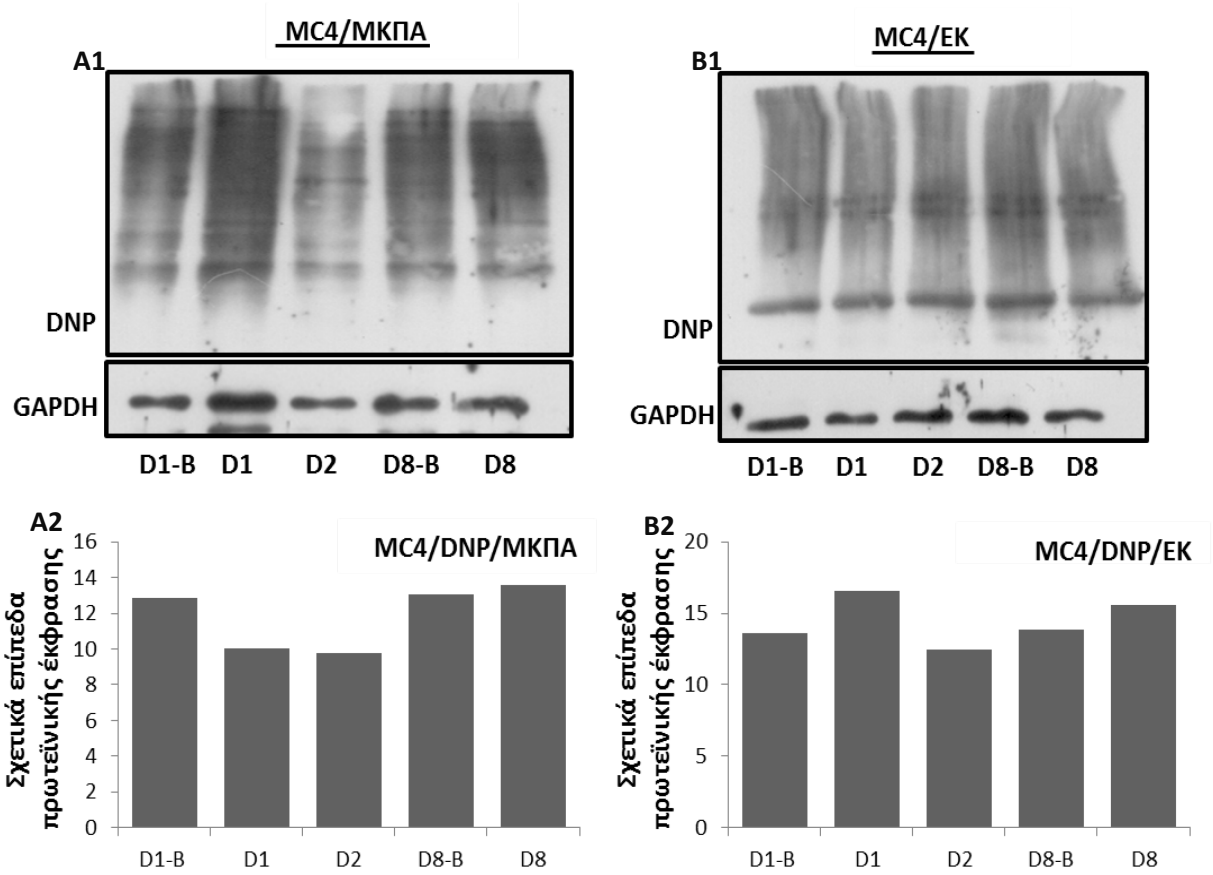
Εικόνα 31. Ασθενής MC4: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (Α1) και ΕΚ (Α2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB5/β5, PSMA3/α7* (Β1) και *PSMB6/β1, PSMB7/β2, PSMA7/α3, RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (Β2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Η πρωτεασωμική αναστολή προκάλεσε αύξηση της γονιδιακής (Εικ. 31Β1) και πρωτεϊνικής (Εικ. 31Γ) έκφρασης της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος. Σε αντίθεση, η πρωτεϊνική έκφραση της α7 υπομονάδας παρατηρείται μειωμένη μετά από τις χορηγήσεις του αναστολέα, ενώ η έκφραση του γονιδίου της παρουσιάζει σημαντική αύξηση στο χρονικό σημείο D8 (Εικ. 31Β1) (Εικ. 31. Γ).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η γονιδιακή έκφραση των λοιπών πρωτεασωμικών γονιδίων αυξήθηκε μετά από κάθε πρωτεασωμική αναστολή, με εξαίρεση να αποτελεί το *PSMB6/β1* γονίδιο, τα επίπεδα mRNA του οποίου κυμάνθηκαν στα βασικά επίπεδα (Εικ. 31Β).

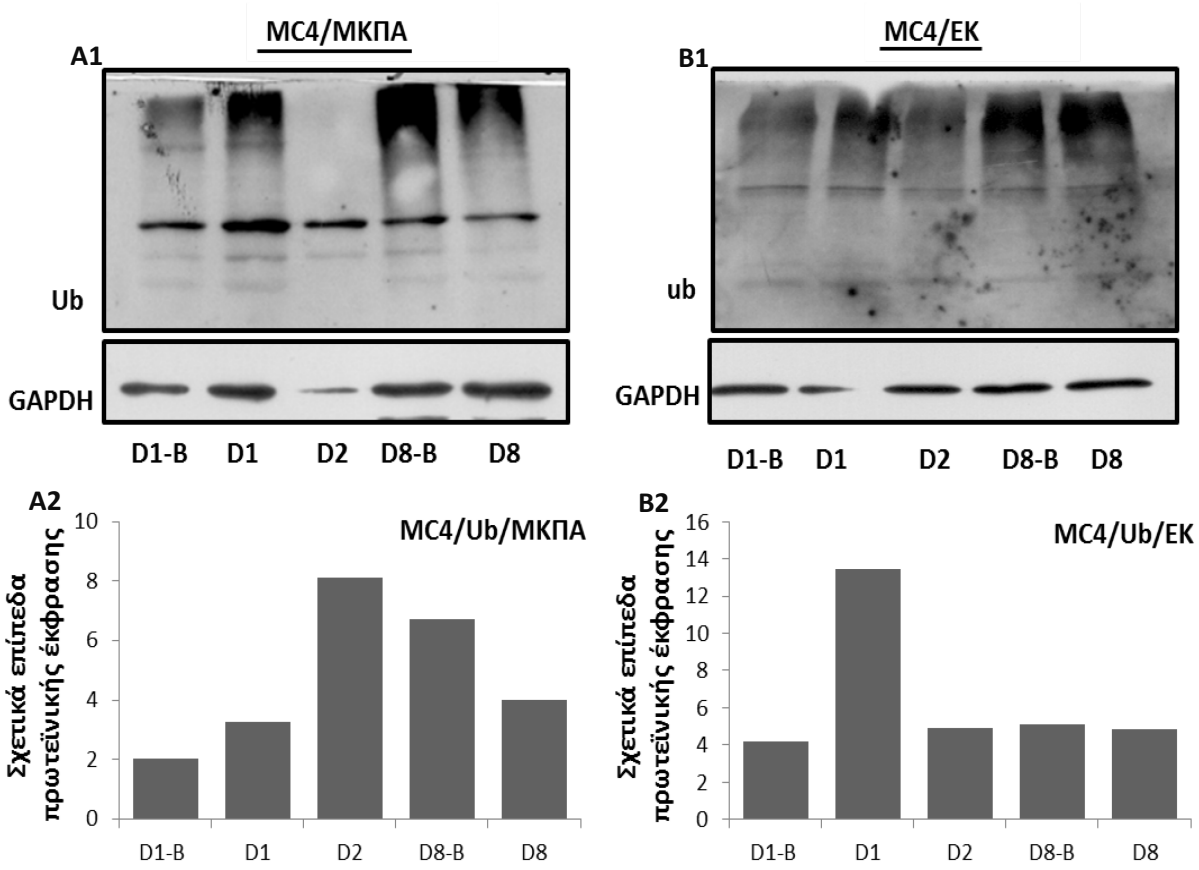
Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Στα ΜΚΠΑ μετά την πρώτη αναστολή του πρωτεασώματος, παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία, η οξειδωμένες πρωτεΐνες επανήλθαν στα βασικά επίπεδα και έπειτα της δεύτερης αναστολής παρατηρήθηκε η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων τους. Στα ΕΚ μετά από την πρώτη και τη δεύτερη αναστολή του πρωτεασώματος, σημειώθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 32).



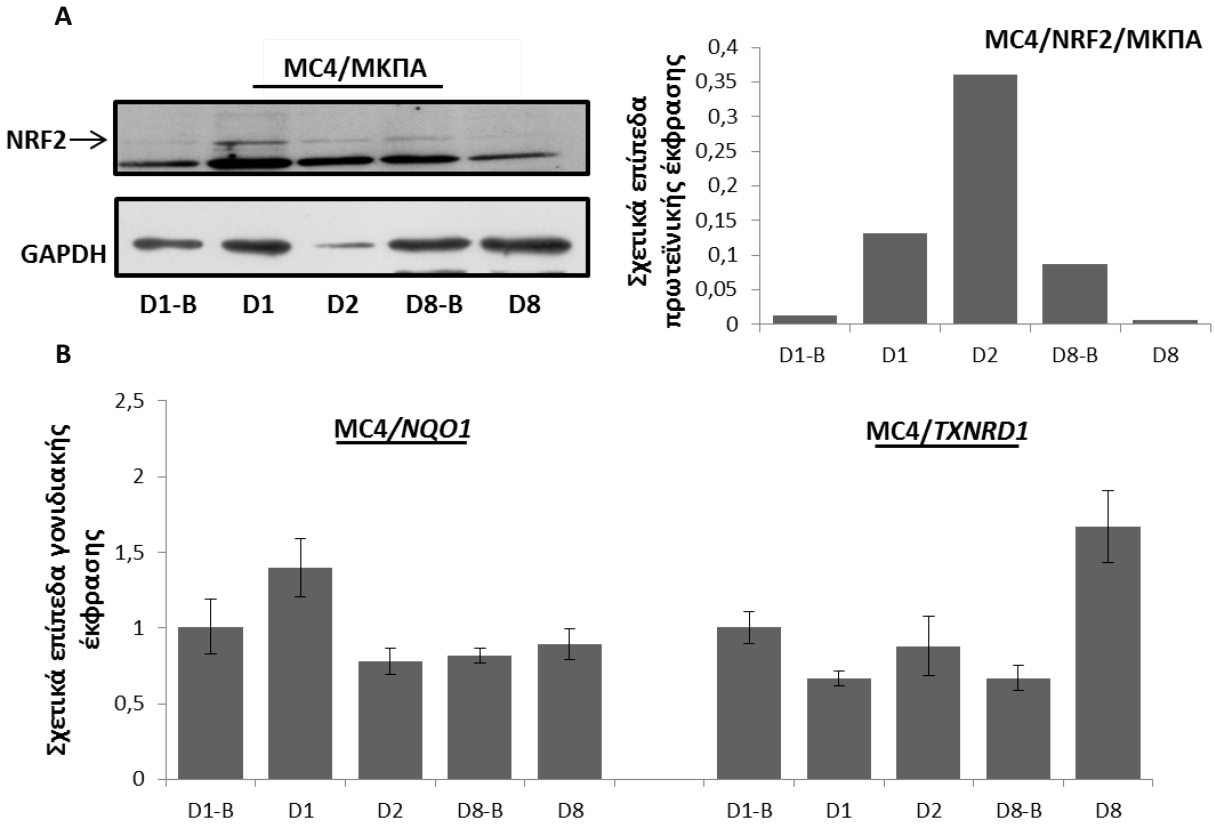
Εικόνα 32. Ασθενής MC4: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Και στους δύο τύπους κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι η πρώτη πρωτεασωμική αναστολή προκάλεσε την αύξηση στην έκφραση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών. Αντίθετα, η δεύτερη χορήγηση του αναστολέα προκάλεσε στα ΜΚΠΑ τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών, ενώ στα ΕΚ παρατηρήθηκε η διατήρηση τους στα βασικά επίπεδα (Εικ. 33).



Εικόνα 33. Ασθενής MC4: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, που ενεργοποιεί την αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες εμφανίζονται αυξημένα μετά την πρώτη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα, σε αντίθεση με τη δεύτερη χορήγηση, όπου παρατηρείται μείωση της πρωτεϊνικής του έκφρασης (Εικ. 34A). Το γονίδιο του αντιοξειδωτικού ενζύμου NQO1 του οποίου την έκφραση ελέγχει ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2, στο χρονικό σημείο D1 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση, ενώ στα ακόλουθα χρονικά σημεία η γονιδιακή του έκφραση παραμένει στα βασικά επίπεδα. Η γονιδιακή έκφραση του *TXNRD1* γονιδίου μειώνεται μετά την πρώτη χορήγηση του CFZ, ενώ ακολουθεί η αύξηση του στο χρονικό σημείο D8 (Εικ. 34B).

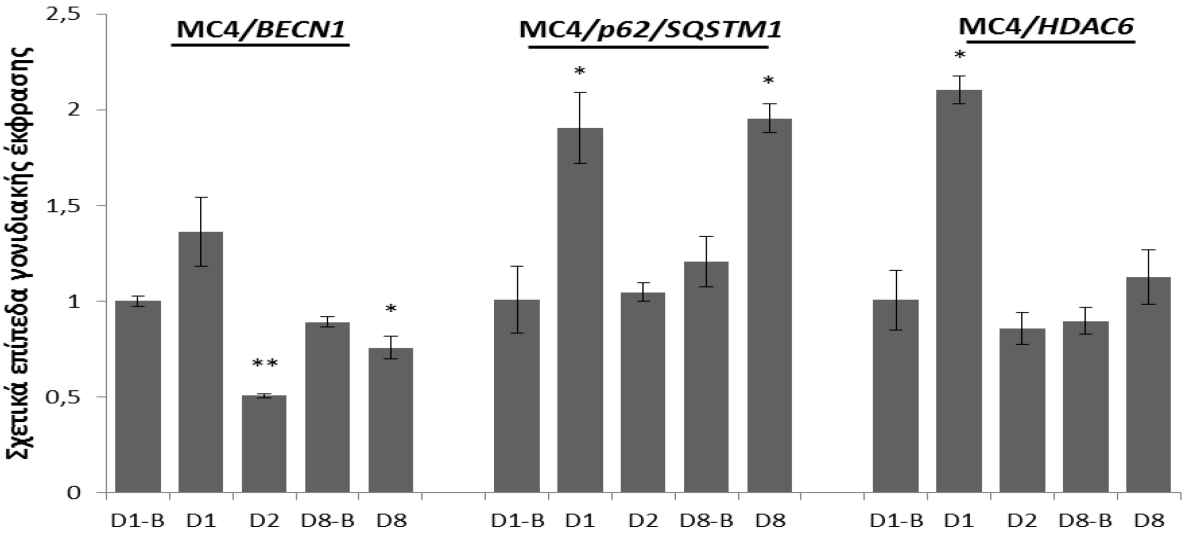


Εικόνα 34. Ασθενής MC4: Πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (A). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (B). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

Η γονιδιακή έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων, μετά την αρχική πρωτεασωμική αναστολή σημειώνεται αυξημένη σε σχέση με το χρονικό σημείο D1-B. Παράλληλα, στον ίδιο χρόνο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, το γονίδιο *BECN1* σημείωσε σημαντική μείωση στην έκφραση του παραμένοντας σε αυτά τα επίπεδα. Η έκφραση των γονιδίων *p62/SQSTM1* και *HDAC6* παρέμεινε σε βασικά επίπεδα στις 24 ώρες από τη θεραπεία

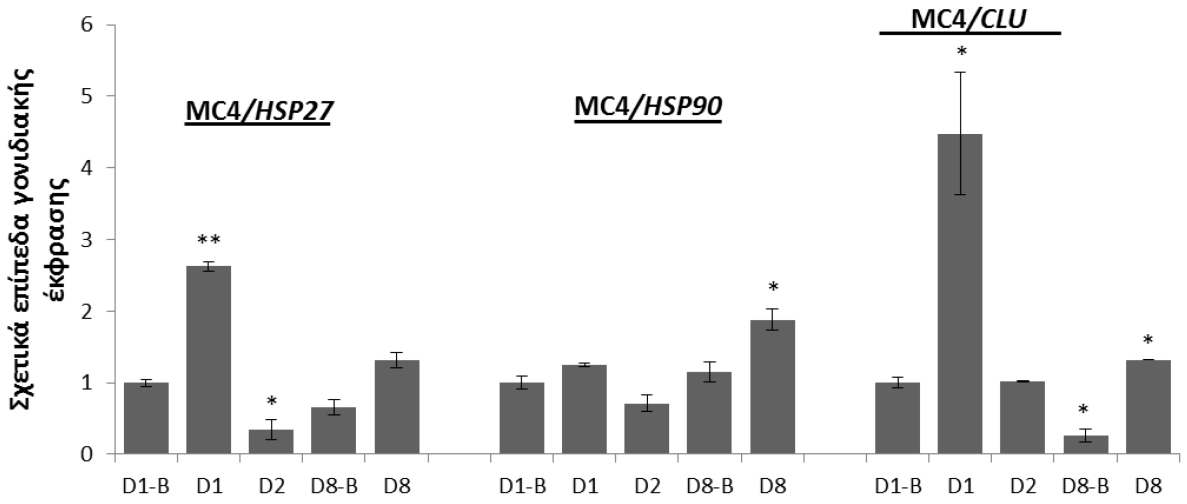
και μέχρι την έναρξη της δεύτερης εβδομάδας, ενώ η δεύτερη χορήγηση του CFZ οδήγησε σε αύξησή της (Εικ. 35).



Εικόνα 35. Ασθενής MC4: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BECN1*, *p62*/*SQSTM1* και *HDAC6* στα ΜΚΠΑ του ασθενούς MC4. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των μοριακών συνοδών εμφανίζεται αυξημένη μετά από τις χορηγήσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα CFZ. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA των γονιδίων της πρωτεΐνης HSP27 και της πρωτεΐνης CLU παρατηρούνται σημαντικά αυξημένα μετά την πρώτη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα. Στο χρονικό σημείο D8 και μετά τη δεύτερη λήψη της θεραπείας η έκφραση και των 3 γονιδίων συνεχίζει να εμφανίζεται αυξημένη (Εικ. 36).



Εικόνα 36. Ασθενής MC4: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27*, *HSP90* και *CLU*. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

6. Ασθενής MC5 (Male Carfilzomib patient number 5)

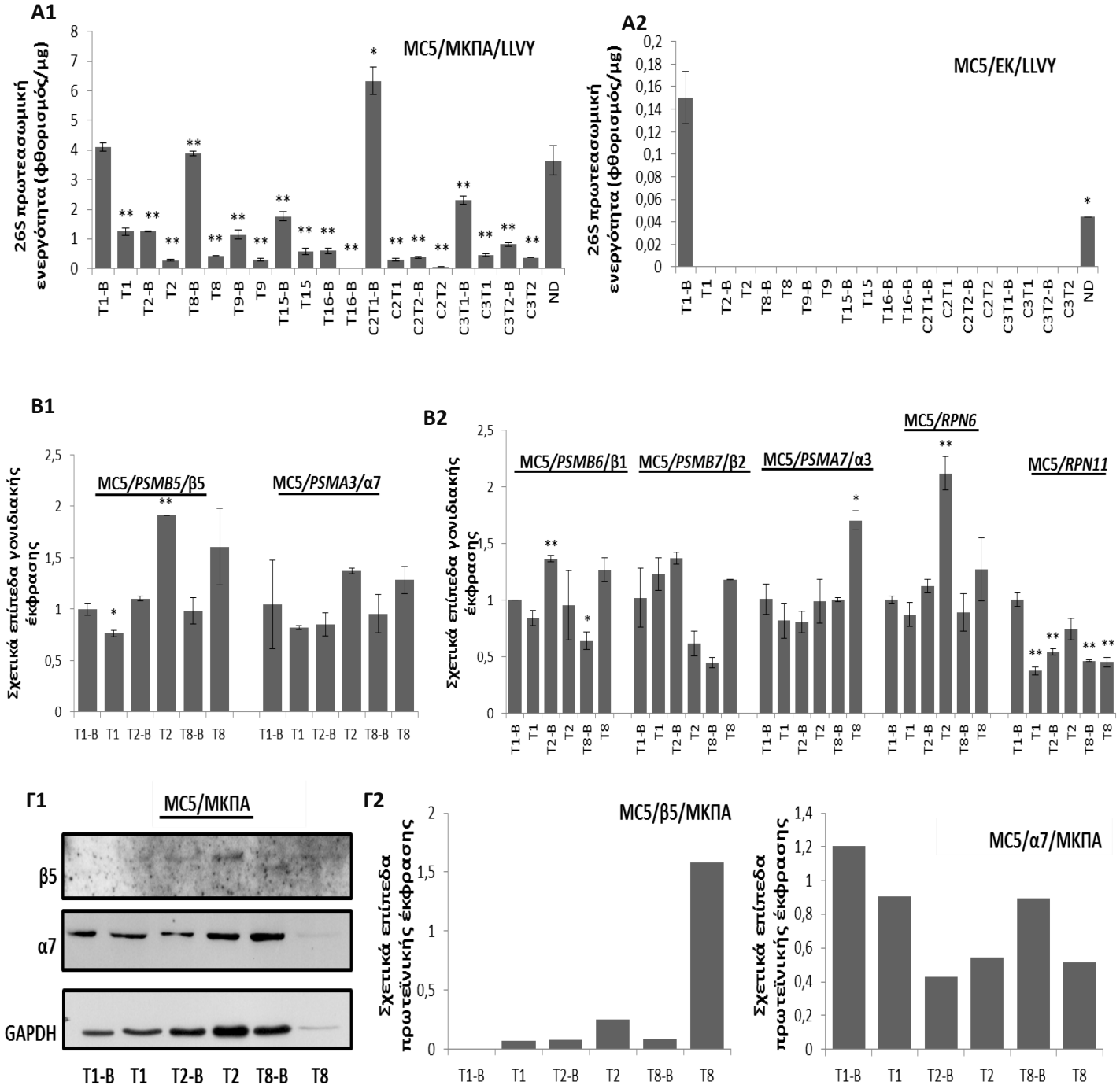
Έλεγχος της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (ΜΚΠΑ και ΕΚ) και των επίπεδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (σε ΜΚΠΑ) μετά τη χορήγηση CFZ.

Κατά τον έλεγχο της ενεργότητας χυμοθρυψίνης μετά την αναστολή του πρωτεασώματος στα ΜΚΠΑ, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας με τον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ (Εικ. 37Α1). Αντίστοιχα, πλήρης αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας παρατηρήθηκε και στα ΕΚ (Εικ. 37Α2).

Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η γονιδιακή έκφραση της β5 υπομονάδας μειώθηκε μετά την πρώτη λήψη του πρωτεασωμικού αναστολέα. Στις 24 ώρες από τη θεραπεία, η γονιδιακή έκφραση επανήλθε στα βασικά επίπεδα και μετά τη δεύτερη λήψη σημείωσε σημαντική αύξηση. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία, η έκφραση επανήλθε στα επίπεδα του χρονικού σημείου Τ1-Β, και ακολούθησε η αύξηση της μετά την τρίτη χορήγηση του αναστολέα. Η γονιδιακή έκφραση της α7 υπομονάδας του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη στο χρονικό σημείο Τ8 (Εικ. 37Β1). Τα υπόλοιπα πρωτεασωμικά γονίδια παρουσίασαν αύξηση της γονιδιακής τους

έκφρασης μετά από την τρίτη χορήγηση του αναστολέα, με εξαίρεση να αποτελεί το γονίδιο *RPN11*, του οποίου η έκφραση παρέμεινε συνεχώς μειωμένη (Εικ. 37Β2).

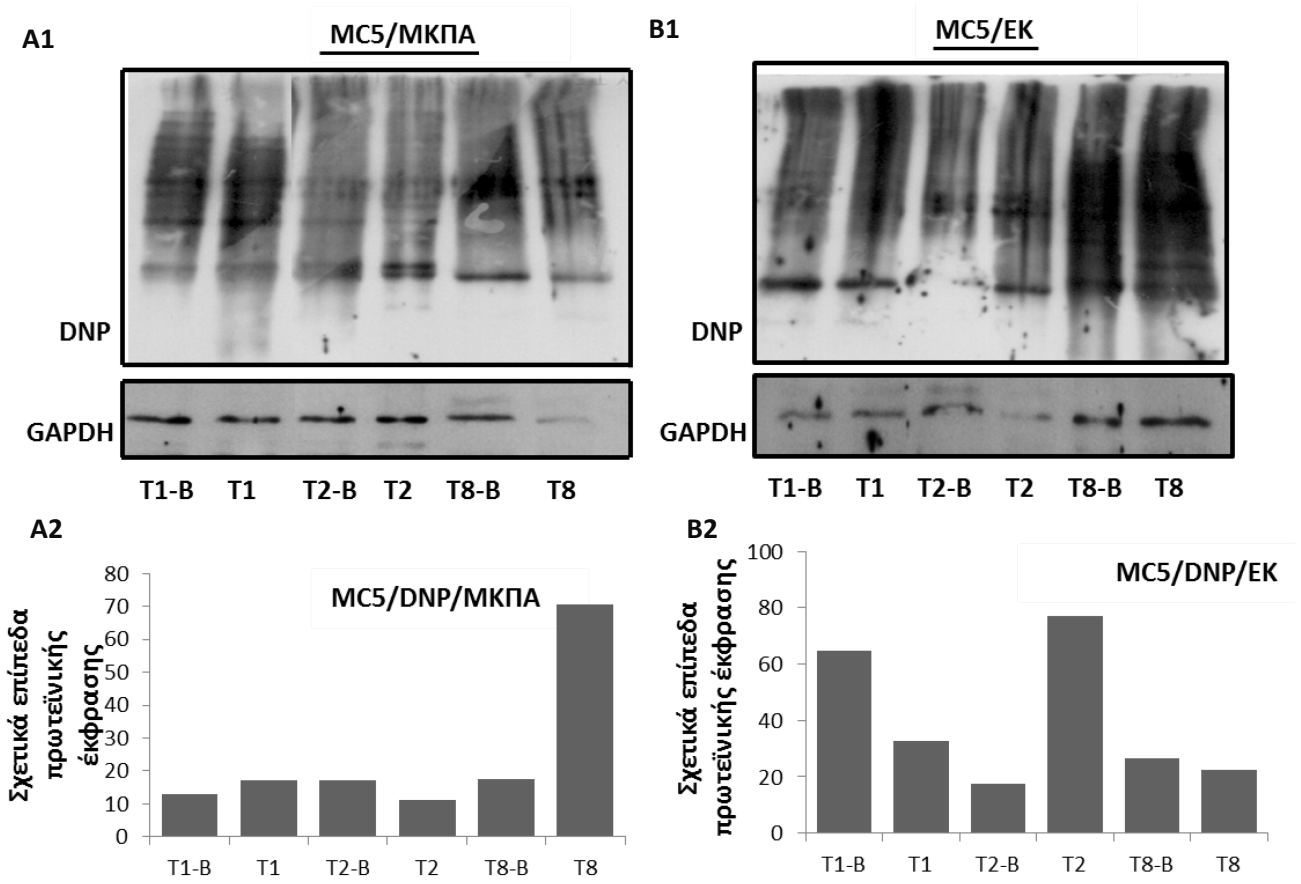
Όσον αφορά την πρωτεϊνική έκφραση της β5 υπομονάδας, η θεραπεία με πρωτεασωμικό αναστολέα οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της α7 υπομονάδας σημείωσαν μείωση μετά από κάθε χορήγηση CFZ με εξαίρεση το χρονικό σημείο Τ2 (Εικ. 37Γ).



Εικόνα 37. Ασθενής MC5: 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ΜΚΠΑ (Α1) και ΕΚ (Α2) πριν και δύο ώρες μετά από κάθε χορήγηση του CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB5/β5*, *PSMA3/α7* (Β1) και *PSMB6/β1*, *PSMB7/β2*, *PSMA7/α3*, *RPN6* και *RPN11* στα ΜΚΠΑ κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου θεραπείας (Β2). Πρωτεϊνική έκφραση των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) (Γ1) και ποσοτικοποίησή τους (Γ2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

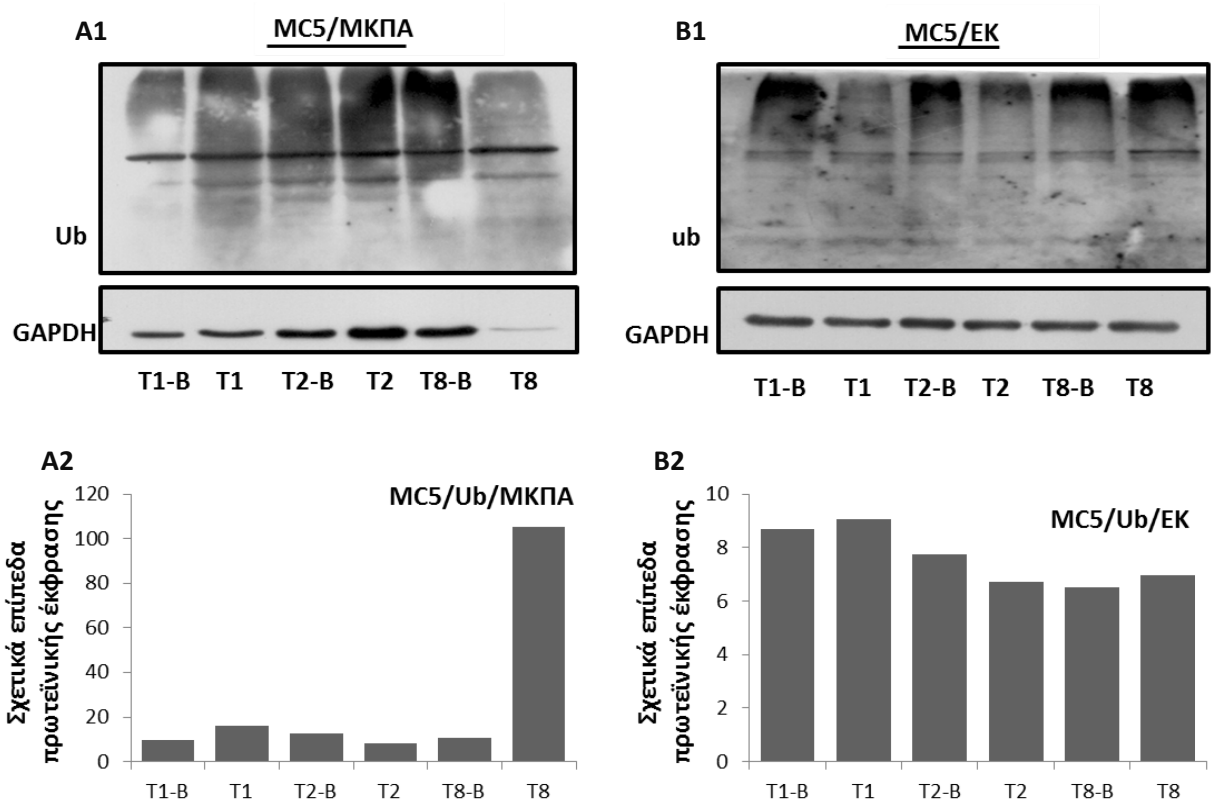
Έλεγχος της πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης στα ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από αναστολή της ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Στα ΜΚΠΑ, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα στα χρονικά σημεία Τ1 και Τ8, ενώ στο χρονικό σημείο Τ2, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών παρατηρούνται μειωμένα. Στα ΕΚ, μετά την πρώτη και τρίτη πρωτεασωμική αναστολή η συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών παρατηρείται μειωμένη, ενώ μετά τη δεύτερη χορήγηση του αναστολέα παρατηρείται αυξημένη (Εικ. 38).



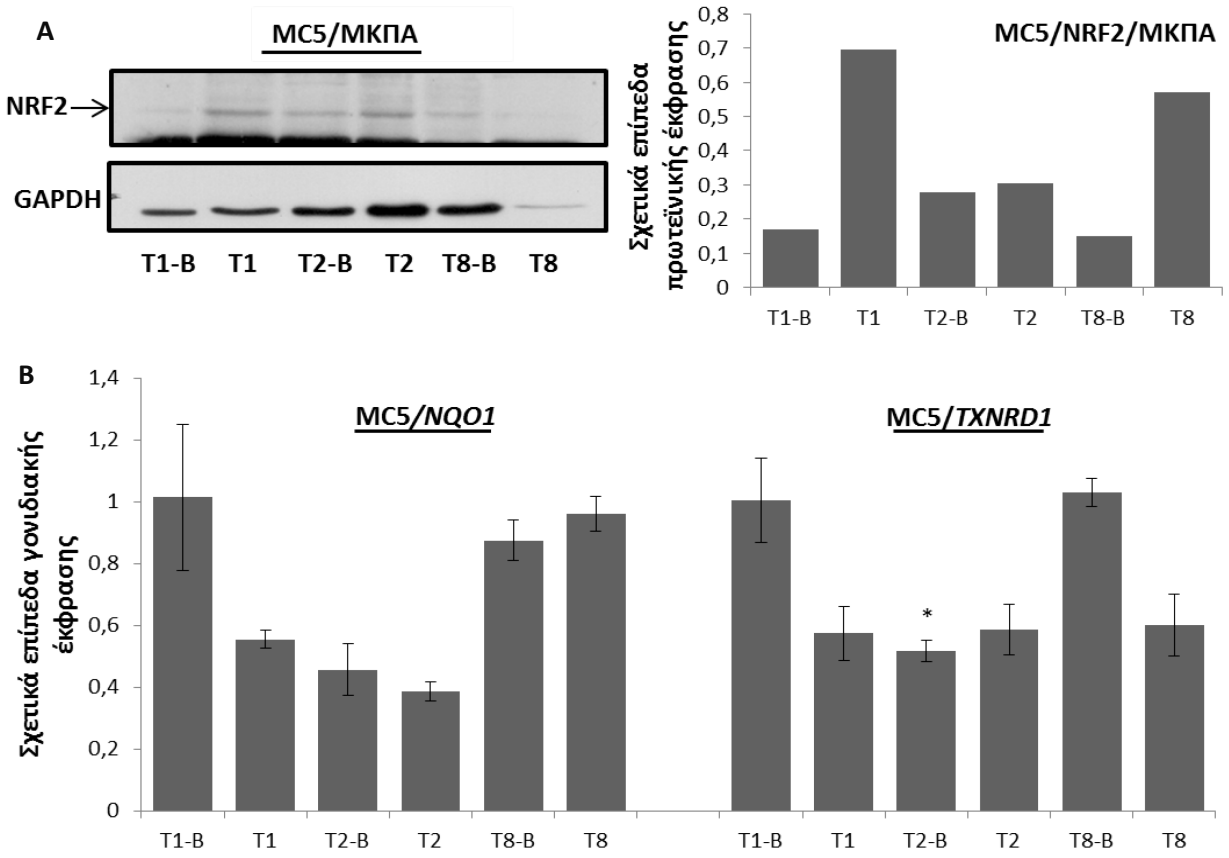
Εικόνα 38. Ασθενής MC5: Συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Στα ΜΚΠΑ, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών αυξήθηκαν στα χρονικά σημεία T1 και T8, ενώ στο χρονικό σημείο T2 παρατηρούνται μειωμένα. Στην περίπτωση των ΕΚ, παρατηρείται αύξηση μετά την πρώτη και την τρίτη πρωτεασωμική αναστολή, ενώ στο χρονικό σημείο T2 τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά του χρονικού σημείου T2-B (Εικ. 39).



Εικόνα 39. Ασθενής MC5: Συσσώρευση των ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών (A1, B1) και ποσοτικοποίησή τους (A2, B2) στα ΜΚΠΑ και ΕΚ της κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

Η έκφραση του γονιδίου *NQO1* σημειώνεται μειωμένη μετά από κάθε χορήγηση του αναστολέα, την πρώτη εβδομάδα θεραπείας. Αντίθετα, στα χρονικά σημεία T8-B και T8 τα επίπεδα γονιδιακής του έκφρασης επιστρέφουν στα βασικά. Το ίδιο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης εμφανίζει το *TXNRD1* γονίδιο, όπου μέχρι και το χρονικό σημείο T2 τα επίπεδα mRNA παρατηρούνται μειωμένα. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία, η έκφραση αυξάνεται στα βασικά επίπεδα αλλά μετά την τρίτη χορήγηση του αναστολέα σημειώνεται εκ νέου μείωση (Εικ. 40).

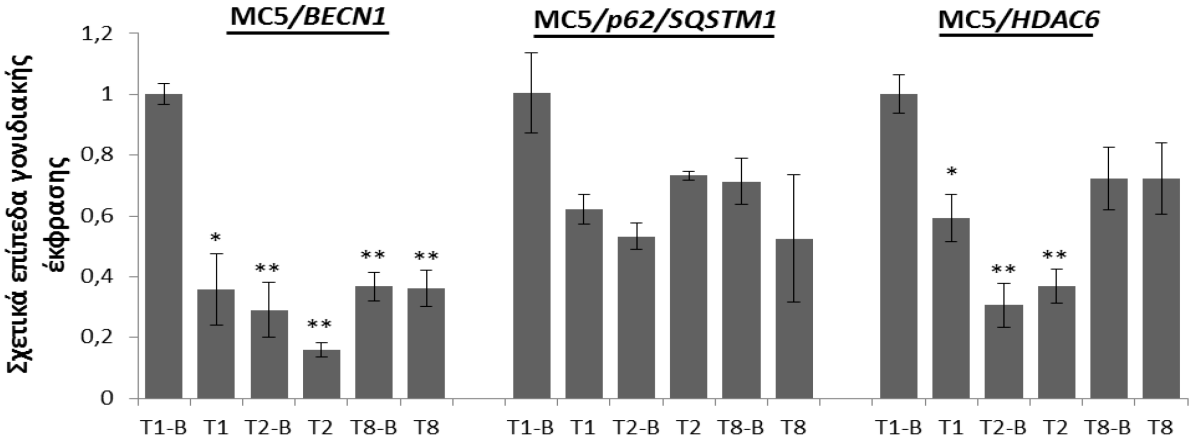


Εικόνα 40. Ασθενής MC5: Πρωτεϊνική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 στα ΜΚΠΑ (Ανοσοστύπωμα Western) και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών τους επιπέδων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (A). Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *NQO1* και *TXNRD1* στα ΜΚΠΑ. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος (B). Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01

Έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και την απομάκρυνση των συσσωματωμάτων μετά την αναστολή του πρωτεασώματος.

Η πρωτεασωμική αναστολή οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία. Συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων της πρωτεΐνης BECLIN1 και HDAC6 μέχρι και το χρονικό σημείο T2 κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία και μετά την τρίτη αναστολή του πρωτεασώματος σημειώνεται αύξηση της γονιδιακής τους έκφρασης, χωρίς όμως αυτή να ξεπερνάει τα επίπεδα του χρονικού σημείου T1-B. Η έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης P62/SQSTM1 εμφανίζεται μειωμένη μετά την πρώτη χορήγηση του

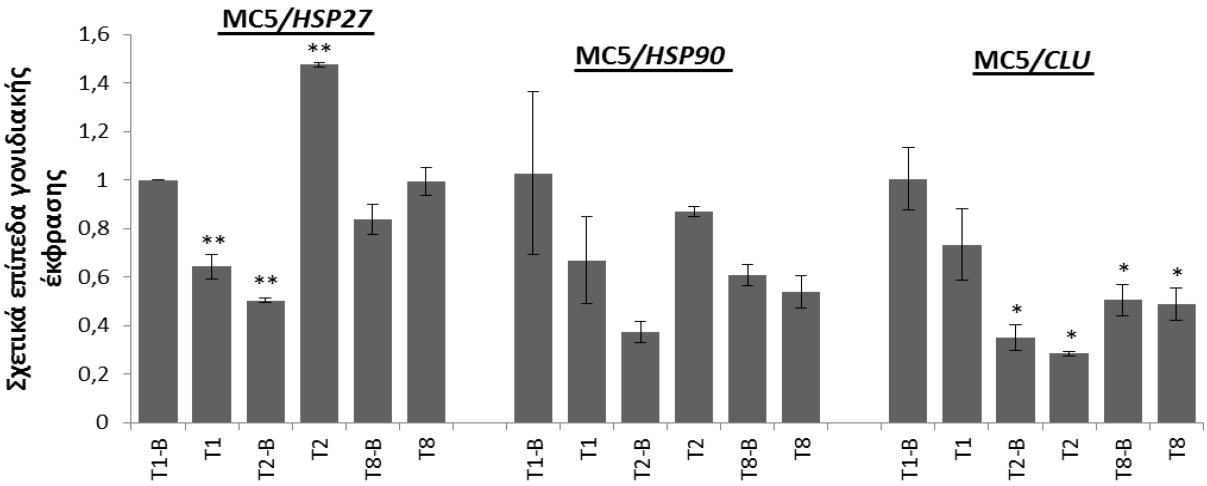
αναστολέα του πρωτεασώματος. Μετά τη δεύτερη χορήγηση του αναστολέα σημειώνεται αύξηση χωρίς να ξεπερνάει τα επίπεδα του χρονικού σημείου T1-B, ενώ η τρίτη χορήγηση ακολουθείται από εκ νέου μείωση (Εικ. 41).



Εικόνα 41. Ασθενής MC5: Σχετικά επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *BECN1, p62/SQSTM1* και *HDAC6* στα ΜΚΠΑ. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

Έλεγχος της μεταγραφικής ρύθμισης των μοριακών συνοδών έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος με CFZ.

Η έκφραση των γονιδίων των μοριακών συνοδών HSP90 και HSP27 μειώνεται μετά την πρώτη πρωτεασωμική αναστολή. Στο χρονικό σημείο T2, η έκφραση του γονιδίου της HSP27 παρατηρείται αυξημένη, ενώ της HSP90 επανέρχεται στα βασικά επίπεδα. Στις 7 ημέρες από τη θεραπεία και μετά την τρίτη λήψη αναστολέα, τα επίπεδα mRNA της HSP27 βρίσκονται στα βασικά επίπεδα, ενώ της HSP90 παρατηρούνται μειωμένα. Η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου *CLU* παρατηρείται σε σημαντικά χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας (Εικ. 42).



Εικόνα 42. Ασθενής MC5: Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *HSP27*, *HSP90* και *CLU*. Οι μπάρες υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση ± SD (n=2). Όπου*, P<0.05 και **, P<0,01.

IV. Συζήτηση

Ο αποτελεσματικός έλεγχος της ποιότητας του πρωτεώματος είναι κρίσιμος για την κυτταρική επιβίωση και διατηρείται μέσω του PN (Trougakos et al., 2013; Sala et al., 2017). Το πρωτεοτοξικό στρες ενεργοποιεί το δίκτυο αυτό προκειμένου είτε να διασώσει (όταν είναι εφικτό), είτε να αποικοδομήσει κατεστραμμένα πολυπεπτίδια. Βασικά συστατικά του PN είναι η απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στις μη διπλωμένες πρωτεΐνες, οι μοριακές συνοδοί, το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Powers et al., 2009; Tsakiri et al., 2015). Μέρος του δικτύου αποτελούν επίσης ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι κινητοποιούν την κυτταροπροστατευτική γενωμική απόκριση στο πρωτεοτοξικό στρες.

Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποτελείται από τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης και το 26S πρωτεάσωμα, ενώ εμπλέκεται στην ανακύκλωση φυσιολογικών ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών μικρού χρόνου ημιζωής, καθώς και των μη λειτουργικών ή μη σωστά διπλωμένων πολυπεπτιδίων (Tsakiri et al., 2015). Το σύστημα αυτό εξασφαλίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, όπως την ανάπτυξη, τις ανοσολογικές αντιδράσεις, το μεταβολισμό, τη μεταγωγή σήματος, τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό θάνατο (Tsakiri et al., 2015). Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος είναι μια ενδοκυτταρική καταβολική διεργασία, η οποία έχει ως στόχο την αποικοδόμηση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, μακρομορίων, κυτοσολικών τμημάτων και ολόκληρων οργανιδίων. Μέρος της αυτοφαγικής διεργασίας αποτελούν η αποακετυλάση 6 της ιστόνης (HDAC6) και η πρωτεΐνη P62 (Sequestosome 1, SQSTM1), οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του σχηματισμού και ωρίμανσης των συσσωματωμάτων, όπως επίσης και στην εκκαθάριση του κυττάρου από αυτά (Yao, 2010) .

Η απορρύθμιση του PN εμφανίζεται σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, συμπεριλαμβανομένου των νεοπλασιών (Trougakos et al., 2013) και έχει προταθεί ότι το πρωτεοτοξικό στρες αποτελεί χαρακτηριστικό τους γνώρισμα (Luo et al., 2009). Κατά συνέπεια, η υπερ-ενεργοποίηση των μονάδων του PN (συμπεριλαμβανομένου και του πρωτεασώματος) χαρακτηρίζει τους προχωρημένους όγκους, και συνεπώς η αναστολή τους παρέχει τη δυνατότητα για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών. Σύμφωνα με αυτό, οι πρωτεασωμικοί αναστολείς, όπως το CFZ, έχουν παρουσιάσει κλινική αποτελεσματικότητα στη θεραπεία του ΠΜ και

του λεμφώματος μανδύα και βρίσκονται υπό αξιολόγηση για τη θεραπεία και άλλων κακοηθειών (Dimopoulos et al., 2016, Manasanch et al., 2017). Παρ' όλα αυτά, και παρά την εισαγωγή νέων θεραπειών και της αξιοσημείωτης αύξησης των συνολικών ποσοστών επιβίωσης, το ΠΜ θεωρείται ανίατο. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία συνήθως γίνονται ανθεκτικοί στους θεραπευτικούς αναστολείς και εκδηλώνουν ανεπιθύμητα συμπτώματα (Richardson et al., 2006; Cavaletti et al., 2010), είναι επιτακτικής ανάγκης η κατανόηση της μοριακής απόκρισης των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων στην αναστολή του πρωτεασώματος καθώς και η ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας.

Συνεπώς, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας προχωρήσαμε στην ανάλυση της λειτουργικότητας του PN στα ΜΚΠΑ και ΕΚ ασθενών με ΠΜ που λαμβάνουν ως θεραπεία τον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ.

Για τη διερεύνηση της μοριακής επίδρασης των θεραπευτικών αναστολέων μελετήθηκε η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης της β5 υπομονάδας στα προαναφερθέντα κύτταρα σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Παρατηρήθηκε, λοιπόν, ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ μειώθηκε σε όλους τους ασθενείς αμέσως μετά τη θεραπεία (2 ώρες μετά) και για 24 ώρες. Στα επόμενα χρονικά σημεία, βρέθηκε ότι η ενεργότητα του πρωτεασώματος μετά τις χορηγήσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (και στους 2 τύπους κυττάρων). Σε ότι αφορά στα ΕΚ εμφανίσθηκαν ιδιαίτερα ευαίσθητα στους αναστολείς όπως και αναμενόταν εξαιτίας της έλλειψης γενωμικής απόκρισης.

Παράλληλα, βρέθηκε ότι τα ΜΚΠΑ εκφράζουν υψηλότερη πρωτεασωμική ενεργότητα σε σύγκριση με τα απύρηνα υψηλής διαφοροποίησης ΕΚ. Μελέτες σε πολλαπλασιαζόμενους και μη ιστούς της *Drosophila* υποστηρίζουν ότι η αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα στα πρώτα είναι ιδιότητα των κυτταρικών σειρών των ανώτερων μετάζωων. Μπορεί, λοιπόν, να υποτεθεί ότι η κλινική αποτελεσματικότητα των πρωτεασωμικών αναστολέων στους ασθενείς με ΠΜ πιθανότατα σχετίζεται και με το γεγονός ότι τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα (ή χαμηλής διαφοροποίησης) καρκινικά κύτταρα είναι ισχυρά εξαρτώμενα από την ενεργότητα του UPS (εξαιτίας της ενισχυμένης πρωτεϊνοσύνθεσης και του υψηλού πρωτεοτοξικού στρες) και για το λόγο αυτό περισσότερο ευαίσθητα στην αναστολή του.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι σε μερικούς ασθενείς, η πρωτεασωμική ενεργότητα τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ αυξήθηκε παρά την τακτική χορήγηση

του αναστολέα. Αυτή η απόκριση εμφανίστηκε είτε στον 1^{ο} κύκλο θεραπείας, ή ακόμα πιο συχνά στο 2^{ο} κύκλο και έπειτα. Στην περίπτωση των ΜΚΠΑ, τα ευρήματα αυτά ίσως σχετίζονται με τις μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες πυροδοτούν την υπερέκφραση των συστατικών του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος προκειμένου να ξεπεραστεί η ανασταλτική επίδραση των πρωτεασωμικών αναστολέων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η επαγωγή των πρωτεασωμικών γονιδίων είναι μια πρώιμη απόκριση, η οποία καταλήγει στην ενισχυμένη παραγωγή πρωτεασωμάτων, και επομένως στην αυξημένη ενζυμική ενεργότητα/μg ολικής κυτοσολικής πρωτεΐνης. Στην περίπτωση των απύρηνων ΕΚ, οι παρατηρήσεις από τα πειράματα ήταν πιο περίπλοκες, καθώς η αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα ενδέχεται να σχετίζεται με την εκκαθάριση των κατεστραμμένων ΕΚ μέσω της ερυθροφαγωκυττάρωσης, η οποία οδηγεί στην απόκριση του μυελού των οστών για αύξηση της ερυθροποίησης προκειμένου να αποκατασταθεί η φυσιολογική πρωτεασωμική ενεργότητα των ΕΚ στην κυκλοφορία. Σε μοντέλο ποντικού, μετά από οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε με γαλακτικό οξύ παρατηρήθηκε ενισχυμένη ερυθροποίηση στο μυελό των οστών (Luo et al., 2017). Αύξηση της ερυθροποίησης συμβαίνει και μετά από αιμόλυση, αιμορραγία (Koury, 2014) ή κατά την υποξία (Haase, 2013), υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση συστημικών αποκρίσεων έναντι στην έλλειψη ομοιοδυναμικής του περιφερικού αίματος. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της θεραπείας και πέραν της τοπικής κυτταρικής απόκρισης πρέπει να συνυπολογίζονται και οι αντισταθμιστικοί συστημικοί μηχανισμοί και να μελετώνται λεπτομερώς.

Όπως προαναφέρθηκε, η θεραπεία με τον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ. Επίσης, παρατηρήθηκε επαναφορά ή/και αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στα ΜΚΠΑ μετά από περιόδους μη χορήγησης φαρμάκου. Σε σχέση με αυτό, η αναστολή του πρωτεασώματος οδήγησε στην αύξηση της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την εύρυθμη λειτουργία και σταθερότητα του πρωτεώματος, δεικνύοντας ένα ρυθμιστικό κύκλωμα που λειτουργεί για να διατηρήσει την ομοιοδυναμική του κυττάρου υπό συνθήκες πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας. Συγκεκριμένα, η θεραπεία επέφερε στα ΜΚΠΑ όλων των ασθενών ενεργοποίηση της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος κυρίως μετά τη πρώτη χορήγηση του πρωτεασωμικού αναστολέα

αλλά και στις επόμενες. Σε παρόμοια ρύθμιση υπόκεινται και η πλειοψηφία των λοιπών πρωτεασωμικών γονιδίων όλων των ασθενών.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε μια αντισταθμιστική ρύθμιση της μεταγραφής μεταξύ των πρωτεασωμικών και αυτοφαγικών γονιδίων. Στα χρονικά σημεία της θεραπείας των ασθενών που παρουσιάζουν αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων αμέσως μετά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου, παρατηρείται (στην πλειοψηφία των ασθενών) είτε σημαντική μείωση στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων είτε διακύμανση στα βασικά επίπεδα. Αύξηση στη μεταγραφική ρύθμιση της αυτοφαγίας παρατηρήθηκε κυρίως μετά από τη 2^{η} χορήγηση του φαρμάκου, ενώ σε έναν ασθενή βρέθηκε αυξημένη γονιδιακή έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων αμέσως μετά από κάθε πρωτεασωμική αναστολή. Αύξηση της μεταγραφικής ρύθμισης παρατηρήθηκε και στα γονίδια των μοριακών συνοδών, καθώς και των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεικνύοντας ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία κινητοποιεί την επαγωγή των κυριότερων μονάδων του PN.

Σε συμφωνία με την παραπάνω διαπίστωση, έχει δειχθεί ότι οι πρωτεασωμικοί αναστολείς εμπλέκονται στην επαγωγή της μοριακής συνοδού HSP70 (Hanke et al., 2016; Imam et al., 2017), όπως επίσης και της αυτοφαγίας με στόχο την επιβίωση του κυττάρου, επάγωντας το σύστημα απόκρισης στις μη διπλωμένες πρωτεΐνες (Zang et al., 2012). Η ενεργοποίηση επιπρόσθετων μονάδων του PN, όπως το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος μετά από την αναστολή του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, υποστηρίζεται και από τα ευρήματα μας σχετικά με τα επίπεδα των ουβικιτινιλιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών και των επιπέδων της πρωτεασωμικής ενεργότητας. Σε αρκετά χρονικά σημεία, κατά τη διάρκεια της θεραπείας, παρατηρήθηκε διατήρηση των βασικών επιπέδων ή/και η μείωση των παραπάνω πρωτεϊνών παράλληλα με την αναστολή της λειτουργίας της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος. Αυτά τα δεδομένα ίσως διευρύνουν το θεραπευτικό παράθυρο για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των πρωτεασωμικών αναστολέων έναντι των κακοηθειών με την παράλληλη χρήση αναστολέων αυτοφαγίας. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι συνδυαστική θεραπεία με CFZ και χλωροκίνη (αναστολέας αυτοφαγίας) ήταν εξαιρετικά αποτελεσματική στη θεραπεία ΠΜ σε μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού (Jarauta et al., 2016).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω μπορούμε να οδηγηθούμε στο γεγονός ότι αυξάνεται η ανάγκη για λεπτομερή μελέτη ενός μεγαλύτερου δείγματος ασθενών καθώς και υπολογισμού των επιπέδων των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων μετά από τη

χορήγηση των πρωτεασωμικών αναστολέων, ώστε να προσαρμοστεί η δοσολογία οδηγώντας σε μία πιο εξατομικευμένη θεραπεία. Επιπλέον, θα πρέπει να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ της μεταγραφικής ρύθμισης της αυτοφαγίας, των αντιοξειδωτικών ενζύμων, των μοριακών συνοδών με τα κλινικά αποτελέσματα των ασθενών, όπως είναι η ολική επιβίωση και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου, για την πιθανή εύρεση προγνωστικών δεικτών και την ανάπτυξη συνδυαστικών θεραπειών.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Rollig C, Knop S, Bornhauser M 2015. Multiple myeloma. *Lancet* 385: 2197–2208

Adams J et al., 1999. Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. *Cancer research* 59(11):2615–22.

Agarwal A, Ghobrial IM 2013. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clin Cancer Res* 19:985–994.

Alsina M et al., 2012. A phase I single-agent study of twice-weekly consecutive-day dosing of the proteasome inhibitor carfilzomib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma or lymphoma. *Clin Cancer Res* 18(17):4830–4840.

Amerik AY, Hochstrasser M 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695:189–207.

Andersen TL, Søe K, Sondergaard TE et al., 2010. Myeloma cell-induced disruption of bone remodeling compartments leads to osteolytic lesions and generation of osteoclast-myeloma hybrid cells: research paper. *Br J Haematol* 148: 551–561.

Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y et al., 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF-κB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12:115-130.

Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M et al., 2011. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events . *Clin Cancer Res* 17: 2734– 2743.

Arendt CS, Hochstrasser M 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7156–7161.

Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L et al., 2012. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival., *J Clin Oncol* 30:1949–1952.

Badros A, Burger AM, Philip S et al., 2009. Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Res* 15: 5250– 5257.

Baker MJ, Tatsuta T, Langer T 2011. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7):a007559.

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A et al., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319:916–919.

Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G et al., 2004. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 103: 20–32.

Barton P, Lance F, Cruz M, Rangwala R et al., 2002. Regulation of Immunoproteasome Subunit Expression in Vivo Following Pathogenic Fungal Infection. *Journal of immunology* 169(6):3046–52.

Bennett MK, Kirk CJ 2008. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11:616-25.

Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F et al., 2005. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106:296–303.

Bianchi G, Oliva L, Cascio P et al., 2009. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* 113: 3040 – 3049.

Bommert, Kurt, Bargou R et al., 2006. Signalling and Survival Pathways in Multiple Myeloma. *European Journal of Cancer* 42(11):1574–80.

Brewer JW, Diehl JA 2000. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci* 97:12625–12630 .

Brioli A, Melchor L, Walker BA et al., 2014. Biology and treatment of myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 14:65-70.

Cavaletti G, Frigeni B, Lanzani F 2010. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity assessment: a critical revision of the currently available tools. *Eur J Cancer.* 46: 479-94.

Cenci S, Mezghrani A, Cascio P et al., 2006. Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J* 25:1104–1113.

Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ et al., 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471:467–72.

Chauhan D, Li G, Shringarpure R et al 2003. Blockade of Hsp27 overcomes bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res* 63:6174–6177.

Chen Z, Orlowski RZ, Wang M et al., 2014. Osteoblastic niche supports the growth of quiescent multiple myeloma cells. *Blood* 123:2204–2208.

Chesi M, Nardini E, Brents LA et al., 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260–264.

Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH et al., 2009. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica* 94:1708–1713.

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL 2000. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 34:40–51.

Cuadrado A, Nebreda AR 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochem J 429:403-417.*

de Jong MC, Slootstra JW, Scheffer GL et al., 2001. Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res* 61:2552–2557.

Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A et al., 2010. Classical and/or alternative NF-κB pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 115:3541–3552.

Demo SD, Buchholz TJ, Laidig GJ et al., 2005. Biochemical and cellular characterization of the novel proteasome inhibitor PR-171. *Blood* 106:1588.

Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA et al., 2007. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 67:6383-91.

Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A 2016. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 17: 27-38.

Dephoure N, Hwang S, O'Sullivan C et al., 2014. Quantitative proteomic analysis reveals posttranslational responses to aneuploidy in yeast. *E Life* 3:e03023.

Espinosa S, Enrique R, Pilar P et al., 2003. Classification of Anticancer Drugs - A New System Based on Therapeutic Targets. *Cancer Treatment Reviews* 29(6):515–23.

Feng X, McDonald JM 2011. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6:121–145.

Förster A, Frank G, Robinson H et al., 2005. The 1.9 Å Structure of a Proteasome-11S Activator Complex and Implications for Proteasome-PAN/PA700 Interactions. *Molecular Cell* 18(5):589–99.

Glavey SV, Ghobrial IM 2015. American Society of Hematology annual meeting 2014: highlights in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 8:273–275.

Glickman K, Michael H, Ciechanover A 2002. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological reviews* 82(2):373–428.

González D, van der Burg M, García-Sanz R et al., 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 110:3112–3121.

Groll M, Bajorek M, Kohler A 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7:1062–1067.

Groll M, Clausen T 2003. Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. *Curr Opin Struct Biol* 13:665–673.

Groll M, Ditzel L, Lowe J et al., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature* 386:463–471.

Guo JY, Xia B, White E 2013. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* 155:1216–1219.

Haase VH 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27: 41-53.

Hanke NT, Garland LL, Baker AF 2016. Carfilzomib combined with suberanilohydroxamic acid (SAHA) synergistically promotes endoplasmic reticulum stress in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 142: 549-60.

Hideshima T, Anderson KC 2012. Biologic impact of proteasome inhibition in multiple myeloma cells -from the aspects of preclinical studies. *Semin Hematol* 49:223-7.

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P et al., 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277:16639–166347.

Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G et al., 2007. Understanding Multiple Myeloma Pathogenesis in the Bone Marrow to Identify New Therapeutic Targets. *Nature reviews Cancer* 7(8):585–98.

Hideshima T, Richardson P, Anderson K 2011. Mechanism of Action of Proteasome Inhibitors and Deacetylase Inhibitors and the Biological Basis of Synergy in Multiple Myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics* 10(11):2034–42.

Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H et al., 2005. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437:1381–1385.

Hohn TJ, Grune T 2014. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol* 2:388–394.

Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A et al., 2004. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 5:191–199.

Ikeda F, Crosetto N, Dikic I 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell* 143:677–681.

Imam F, Al-Harbi NO, Al-Harbia MM 2017. Rutin Attenuates Carfilzomib-Induced Cardiotoxicity Through Inhibition of NF-κB, Hypertrophic Gene Expression and Oxidative Stress. *Cardiovasc. Toxicol.* 17: 58-66.

Jain S, Diefenbach C, Zain J et al., 2011. Emerging role of carfilzomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma. *Core Evid* 6:43-57.

Jankowska E, Stoj J, Karpowicz P et al., 2013. The proteasome in health and disease. *Curr Pharm Des* 19:1010–1028.

Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O et al., 2016. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 382: 1-10.

Kimura, Hiroaki J et al., 2009. Immunoproteasome Overexpression Underlies the Pathogenesis of Thyroid Oncocytes and Primary Hypothyroidism: Studies in Humans and Mice. *PLoS ONE* 4(11).

Kisselev AF, van der Linden WA, et al., 2012. Proteasome inhibitors:an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 19:99–115.

Koury MJ 2014. Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. *Blood Rev*. 28: 49-66.

Kubiczkova L, Pour L, Sedlarikova L et al., 2014. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 18(6):947-61.

Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM et al., 2007. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitinproteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 110:3281-90.

Kunjappu J, Hochstrasser M 2014. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys Acta* 1843:2–12.

Lander, Gabriel C et al., 2012. Complete Subunit Architecture of the Proteasome Regulatory Particle. *Nature.*

Landgren O, Gridley G, Turesson I et al., 2006. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined signifi cance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* 107:904–06.

Lehmann C, Begley TP, Ealick SE 2006. Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis. *Biochemistry* 45:11–19.

Li J, Favata M, Kelley JA, Caulder E et al., 2010. A JAK1/2 selective inhibitor, is efficacious against multiple myeloma cells and reverses the protective effects of cytokine and stromal cell support. *Neoplasia* 12:28-38.

Li X, Matilainen O, Jin C, Glover-Cutter KM, Holmberg CI, Blackwell TK et al., 2011. Specific SKN-1/NrF stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genet* 7:9-11.

Liu FT, Agrawal SG, Gribben JG, et al., 2008. Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. *Blood* 111:2797–2805.

Lohr JG, Stojanov P, Carter LS et al., 2014 Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 25:91–101.

Loven J, Hoke HA, Lin CY et al., 2013 Selective inhibition of tumor oncogenesis by disruption of super-enhances. *Cell* 153:320–334.

Luo J, Solimini NL, Elledge SJ 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell. 136: 823–37.

Luo ST, Zhang DM, Qin Q et al., 2017. The Promotion of Erythropoiesis via the Regulation of Reactive Oxygen Species by Lactic Acid. *Sci Rep*. 7: 38105.

Malloy MT, McIntosh DJ, Walters TS, Flores A, Goodwin JS, Arinze IJ, et al., 2013. Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: Implications for degradation of nrf2 in the nucleus. *J Biol Chem* 288:14569- 14583.

Manasanch EE, Orlowski RZ 2017. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 14: 417-33.

Martinez-Garcia E, Popovic R, Min DJ et al., 2011. The MMSET histone methyltransferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 117:211–220.

Maupin-Furlow JA 2013. Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends Microbiol* 21:31–38.

Meiners S, Heyken D, Weller A et al., 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 278:21517-21525.

Meister S, Schubert U, Neubert K et al., 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 67:1783–1792.

Melnick J, Dul JL, Argon Y 1994. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370:373 – 375.

Meng L et al., 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(18):10403–10408.

Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S et al., 2011. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol* 12:431–440.

Morimoto, R.I., 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22, :11427–1438.

Nedi, O, Rattan SI, Grune T et al., 2013. Molecular effects of advanced glycation end products (AGEs) on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res* 47(Suppl. 1):28–38.

Neubert K, Meister S, Moser K et al., 2008. Th e proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis . *Nat Med* 14:748–755.

Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP 2014. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol* 2:323–332.

Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J et al., 2011 The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol* 23:341–349.

O'Connor OA et al., 2009. A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 15(22):7085–7091.

Obeng EA, Carlson LM , Gutman DM et al., 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells . *Blood* 107:4907–4916.

Ocio, Enrique M, Jesús F, San Miguel JF 2010. The DAC System and Associations with Multiple Myeloma. *Investigational New Drugs* 28(SUPPL. 1).

Ocio, E. M. et al., 2014. New Drugs and Novel Mechanisms of Action in Multiple Myeloma in 2013: A Report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 28(3):525–42.

Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG et al., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112:2489–2499.

Ortega J, Heymann JB, Kajava V et al., 2005. The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. *J Mol Biol* 346:1221–1227.

Pickart CM 2000. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25:544–548.

Pickering AM, Davies JA 2012. Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 alpha beta, Pa28 gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys* 523:181–190.

Pieper K, Grimbacher B, Eibel H 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959–971.

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A et al 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem*. 78: 959-91

Raab MS, Podar K, Breitkreutz I et al., 2009. Multiple myeloma. *Lancet* 374 (9686):324–39.

Radhakrishnan SK, Lee CS, Young P et al., 2010. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol Cell* 38:17-28.

Ramos PC, Hockendorff J, Johnson ES et al., 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92:489–499.

Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S 2006. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol*. 24: 3113-20.

Richardson PG, Weller E, Lonial S et al., 2010. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma . *Blood* 116:679–686.

Rollig C, Knop S, Bornhauser M 2015. Multiple myeloma. *Lancet* 385:2197–2208.

Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP et al., 2009. Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19:109–124.

Saeki Y, Tanaka K 2012. Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol. Biol*. 832:315–337.

Sala A, Bott L, Morimoto R 2017. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J. Cell Biol.* 216: 1231-41.

Sha Z, Goldberg AL 2014. Proteasome-mediated processing of Nrf1 is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97. *Curr Biol* 24:1573-1583.

Shringarpure R, Tilman G, Jana M et al., 2003. Ubiquitin Conjugation Is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278(1):311–18.

Sims NA, Martin TJ 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey* Rep 3:481.

Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C et al., 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98:2229–2238.

Stadtmueller BM, Kish-Trier E, Ferrell K et al., 2012. Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function. *J Biol Chem* 287:37371–37382.

Stapnes C, Døskeland AP, Hatfield K et al., 2007. The proteasome inhbitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 136:814-28.

Steffen J, Seeger M, Koch A et al., 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol Cell* 40:147-158.

Steinbrunn T, Stühmer T, Gattenlöhner S et al., 2011. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival., *Blood* 117:1998-2004.

Tanahashi NN et al., 2000. Hybrid Proteasomes. Induction by Interferon-Gamma and Contribution to ATP-Dependent Proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 275(19):14336–45.

Tanaka, Keiji 2013. The Proteasome: From Basic Mechanisms to Emerging Roles. *Keio Journal of Medicine* 62(1):1–12.

Torres EM, Dephoure N, Panneerselvam A et al., 2010. Identification of aneuploidy-tolerating mutations. *Cell* 143:71–83.

Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM et al 2007. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317:916–924.

Trougakos IP, Sesti F, Tsakiri E. et al., 2013. Non-enzymatic posttranslational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J Proteomics* 92:274–298.

Tsakiri E, Sykiotis G, Papassideri I et al., 2013. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of Drosophila during aging or oxidative stress. *FASEB J.* 27(6):2407-20.

Tsakiri EN, Trougakos IP 2015. The Amazing Ubiquitin-Proteasome System: Structural Components and Implication in Aging. *Int Rev Cell Mol Biol* 314:171-237.

van Anken E, Romijn EP, Maggioni C et al., 2003. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* 18:243–253.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al., 2013. Cancer genome landscapes. *Science* 339:1546–1558.

von Mikecz AA 2006. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* 119:1977–1984.

Walker BA, Wardell CP, Johnson DC et al., 2013 Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood* 121:3413–3419.

Walker BA, Wargell CP, Brioli A et al., 2014. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J* 4:e191.

Wang Y, Ai L, Cui G et al., 2012. Once- versus twice-weekly bortezomib induction therapy with dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma . J Huazhong Univ Sci Technolog *Med Sci* 32:495– 500.

Weaver BA, Cleveland DW 2006. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 18:658–667.

Weber M, Donna M. et al., 2007. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America. *N Engl J Med* 357(21):2133-42.

Whitesell L, Lindquist SL, 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5:761-772.

Williams BR, Amon A 2009. Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res* 69:5289–5291.

Yang J, Wang Z, Fang Y et al., 2012. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, distribution, and excretion of carfilzomib in rats.

Yao TP 2010. The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. *Genes Cancer.* 1: 779-86.

Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K et al., 2008. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* 15:, 228–236.

Zang Y, Thomas SM, Chan ET 2012. The next generation proteasome inhibitors carfilzomib and oprozomib activate prosurvival autophagy via induction of the unfolded protein response and ATF4. *Autophagy*. 8: 1873-4.

Zeng R, Chen Y, Zhao S et al., 2012. Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin in vitro via regulating intracellular ROS and SIRT1 . *Acta Pharmacol* Sin 33:91–100.

Zhu, Yuan Xiao et al., 2011. RNAi Screen of the Druggable Genome Identifies Modulators of Proteasome Inhibitor Sensitivity in Myeloma Including CDK5. *Blood* 117(14):3847–57.

Zonder, Jeffrey A et al., 2012. A Phase 1, Multicenter, Open-Label, Dose Escalation Study of Elotuzumab in Patients with Advanced Multiple Myeloma. *Blood* 120(3):552–59.