



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

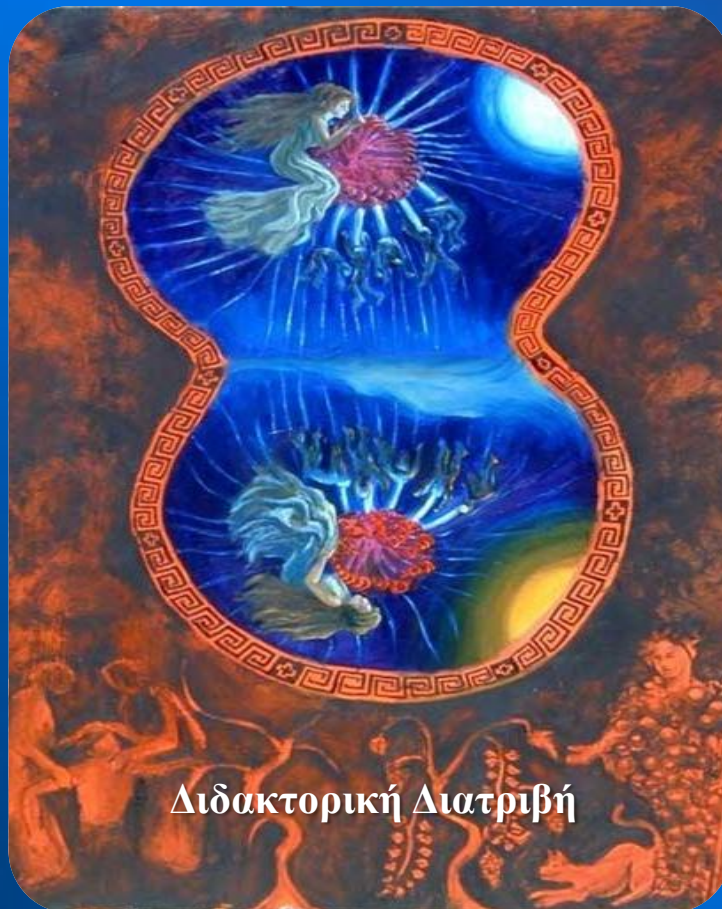
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Κυτταροβιολογική Μελέτη της Επίδρασης Συμβατικών και Στοχευμένων  
Χημειοθεραπευτικών Φαρμάκων σε Πρότυπα Βιολογικά Συστήματα με  
Έμφαση στον Καρκίνο της Ουροδόχου Κύστης

Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου, *B.Sc.*

Βιολόγος



Διδακτορική Διατριβή

ΑΘΗΝΑ  
Μάρτιος 2013



**ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

**Κυτταροβιολογική Μελέτη της Επίδρασης Συμβατικών και  
Στοχευμένων Χημειοθεραπευτικών Φαρμάκων σε Πρότυπα  
Βιολογικά Συστήματα με Έμφαση στον Καρκίνο της  
Ουροδόχου Κύστης**

Διδακτορική Διατριβή

**Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου, *B.Sc.***

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ

Μάρτιος 2013



**NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS**

**SCHOOL OF NATURAL SCIENCES**

**FACULTY OF BIOLOGY**

Department of Cell Biology & Biophysics

**Biological Assessment of the Effects of Conventional and Targeted  
Chemotherapeutic Drugs in Model Systems with Emphasis in  
Bladder Cancer**

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

**Eumorphia G. Konstantakou, *B.Sc.***

Biologist

ATHENS

March 2013

### **Επιβλέπων Καθηγητής**

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης      Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης      Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης      Ομότιμος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης      Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Λουκάς Χ. Μαργαρίτης      Ομότιμος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς      Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Βασιλική Αλεπόρου      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Παπαζαφείρη      Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Γεράσιμος Ε. Βουτσινάς      Ερευνητής Β', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

*Στον Καθηγητή μου,  
έναν εξαιρετικό Επιστήμονα  
έναν υπέροχο Άνθρωπο*

*Το να αντιγράφεις την ιστορία θέλει τρόπο  
Το να γράφεις Ιστορία θέλει χρόνο*

*Το να αντιγράφεις την ιστορία είναι λάθος  
Το να γράφεις Ιστορία είναι πάθος*

*Το να αντιγράφεις την ιστορία θέλει κόπο  
Το να γράφεις Ιστορία θέλει κόπο*

*2007 - 2013: μία μικρή Ιστορία ζωής,  
γεμάτη κόπο, πάθος  
και χρόνο*

*ΔΙΣ*

*Ευχαριστίες*

## Ευχαριστίες

Το πιο μεγάλο, εγκάρδιο και ουσιαστικό ευχαριστώ θέλω να το αποδώσω στον άνθρωπο στον οποίο αφιερώνω την Διδακτορική μου Διατριβή, στον επιβλέποντα Καθηγητή αυτής, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη**. Στον αρχιτέκτονα όλης αυτής της πολύχρονης και πολύκοπης ερευνητικής προσπάθειας, με τον οποίον είχα την τιμή, την τύχη και την ευτυχία να συνεργαστώ μαζί του. Είναι ο Καθηγητής που μου έμαθε να σκέφτομαι επιστημονικά, να «φαντάζομαι» βιολογικά και να μαγεύομαι από την πολυπλοκότητα, την άρτια οργάνωση και λειτουργία των κυττάρων, των ιστών και των οργανισμών. Είναι ο Άνθρωπος που μου παρείχε όχι μόνο ένα εξαιρετικό ερευνητικό περιβάλλον, αλλά φρόντιζε συνεχώς να δουλεύουμε σε ένα κλίμα ευνοϊκό, εποικοδομητικό και ευχάριστο. Είναι ο Συνάδελφος που πάντα με είχε μπροστά του και δίπλα του, ποτέ πίσω του, δίνοντάς μου πάντα την ευκαιρία να εκφράζω τις απόψεις μου και να εξελίσσομαι. Είναι ο Φίλος που άκουγε κι αφουγκραζόταν τις ανησυχίες και τους προβληματισμούς μου και ήταν πάντα εκεί να προτείνει και να δίνει λύσεις στο πιο απλό έως και στο πιο δύσκολο πρόβλημα που ανέκυπτε. Δεν νιώθω τυχερή που γνώρισα απλώς τον συγκεκριμένο καθηγητή: νιώθω ευτυχής που γνώρισα τον Καθηγητή πρότυπο, για μένα τουλάχιστον. Έναν Καθηγητή με βαθειά και ουσιαστική γνώση της Βιολογίας, με πολλαπλή και άριστη τεχνική κατάρτιση, με αυθεντική και ειλικρινή αγάπη γι' αυτό που κάνει, και που συνεχώς σε προσκαλεί και σε συμπαρασύρει να κάνεις βήματα προς τα μπροστά. Ότι και όσα και να πω θα είναι λίγα. Τον ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου και είμαι σίγουρη πως θα αποτελέσει για πολλούς ακόμα σπουδαστές, προπτυχιακούς ή μεταπτυχιακούς, το κίνητρο να αγαπήσουν την επιστήμη της Βιολογίας και να παλέψουν μέσα από τις όποιες αντιξοότητες για την επίτευξη και ικανοποίηση, πάνω απ' όλα, των εσωτερικών τους αναγκών. Ελπίζω και εύχομαι να μπορέσω έστω και στο ελάχιστο, να του ανταποδώσω έμπρακτα όλα αυτά που έχει κάνει για μένα και για τα δικά μου όνειρα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Λουκά Χ. Μαργαρίτη**, μέλος της



Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την συνεχή προσφορά και αληθινό ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια της Διδακτορικής μου Διατριβής. Για όλες τις στιγμές που βοήθησε, αποδέχθηκε, προσπάθησε, συμφώνησε και στάθηκε σε μικρότερα ή μεγαλύτερα θέματα που προέκυψαν και που ακόμα συνεχίζει να μου συμπαρίσταται.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη**, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς με την αισιοδοξία και τη γαλήνη που την διέπει με ενθάρρυνε, ενώ με την «ήρεμη» δυναμική της με στήριζε και με υποστήριζε όποτε αυτό ήταν αναγκαίο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Ερευνητή Β', του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», κ. **Γεράσιμο Ε. Βουτσινά**, καθώς ήταν ο πρώτος άνθρωπος που μου «άνοιξε» την πόρτα του εργαστηρίου του και όλα αυτά τα χρόνια ήταν πάντα δίπλα μου, φιλοξενώντας με στον επιστημονικό του χώρο και παρέχοντάς μου όλες τις ανέσεις ενός άρτια εξοπλισμένου εργαστηρίου. Τον ευγνωμονώ ιδιαίτερα για την επιστημονική και προσωπική του στήριξη, για την επίλυση βασικών προβλημάτων που ανέκυψαν αυτά τα χρόνια και για το συνεχές ενδιαφέρον του σε επιστημονικά και προσωπικά θέματα.

Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον Καθηγητή του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, κ. **Κωνσταντίνο Ε. Βοργιά**, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, κ. **Βασιλική Αλεπόρου** και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, κ. **Παναγιώτα Παπαζαφείρη**, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή, καθώς και για την πολύτιμη και απόλυτη στήριξή τους.

Τις ένθερμες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην Ερευνήτρια Δ', του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Έρευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), κ. **Έμα Αναστασιάδου**, της οποίας η υποστήριξη τα τελευταία χρόνια υπήρξε πολλαπλή και ιδιαίτερα σημαντική. Με τη γνώση και την άριστη τεχνική της κατάρτιση ήταν και συνεχίζει να είναι δυνατή η επιτυχημένη ολοκλήρωση ανάπτυξης προ-κλινικών αντικαρκινικών βιολογικών συστημάτων, μέσω χορήγησης χημειοθεραπευτικών

παραγόντων σε αλλομοσχεύματα κακοήθους ουροθηλίου στο περιβάλλον ζωικών προτύπων ανοσο-ανεπαρκών (SCID) ποντικών.

Καίρια θέση όλα αυτά τα χρόνια κατείχαν συνάδελφοι και συνεργάτες με τους οποίους μοιραστήκαμε κοινό ερευνητικό χώρο, παρόμοιες ανησυχίες, συναφή προβλήματα και συγγενείς στόχους. Θα ήθελα να ξεχωρίσω τον Δρ. **Παναγιώτη Καρκούλη**, καλό φίλο και συνάδελφο, με τον οποίον ξεκινήσαμε μαζί την ερευνητική αυτή προσπάθεια και μέσα σε ένα περιβάλλον φιλικό και εποικοδομητικό, η καθημερινότητα με τις ευχάριστες αλλά και με τις πιο ανήσυχες στιγμές της γινόταν πιο εύρυθμη και τελεσφόρα. Επίσης, την κ. **Στεφανία Μπασογιάννη**, η οποία ως προπτυχιακή φοιτήτρια τα δύο τελευταία χρόνια αποτέλεσε σημαντικό άνθρωπο στην καθημερινότητα στο εργαστήριο και πολλές φορές υπήρξε «κυματοθραύστης» της έντασης και του άγχους. Ευχαριστώ και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, νυν και πρώην, όπως τον Δρ. **Αντώνη Λαμπιδόνη**, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ. **Κατερίνα Βεστάκη** και κ. **Σοφία Μελαχροινού**, καθώς και τον τεχνικό κ. **Σωκράτη Αυγέρι**.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τον πολύ καλό συνάδελφο και φίλο Δρ. **Αθανάσιο Βελέντζα**, του οποίου η βοήθεια τόσο σε επιστημονικά και πρακτικά όσο και σε προσωπικά θέματα υπήρξε καθοριστική και αναντικατάστατη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. **Αγγελική Θανασοπούλου**, για τη βοήθεια και συμμετοχή της σε σημαντικές τεχνικές και για την προσωπική της στήριξη το χρονικό αυτό διάστημα. Επίσης, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. **Παναγιώτη Βελέντζα**, του οποίου η τεχνική εμπειρία υπήρξε σημαντική για την αποτελεσματική διεξαγωγή συγκεκριμένων πειραματικών διαδικασιών, καθώς και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. **Αδαμαντία Φραγκοπούλου** για τη βοήθειά της τόσο σε διεκπεραιωτικά όσο και προσωπικά ζητήματα.

Ο άρτιος χειρισμός και η επιτυχής εκτέλεση των *in vivo* πειραμάτων σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό και στους κ. **Ευθύμη Παρόνη** και κ. **Ευάγγελο Μπαλάφα**, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά για την ιδιαίτερη προσήλωση και αποτελεσματικότητά τους.

Σημαντική υπήρξε η αρωγή της Ερευνήτριας Γ', του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ), κας **Πόπης Συντιχάκη**, σε θέματα βιο-ενέργειας, του Ερευνητή Γ', του Ιδρύματος

Ιατροβιολογικών Έρευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ), κ. **Κώστα Βεκρέλλη**, για την επιτυχή ολοκλήρωση μέτρησης της πρωτεασωμικής αδρανοποίησης, καθώς και του Ειδικού Λειτουργικού Επιστήμονα Α΄, του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Έρευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ), κ. **Γεώργιου Τσάγκαρη**, ο οποίος συνέβαλε καθοριστικά στην πρωτεωμική ανάλυση, που βρίσκεται υπό φάση ολοκλήρωσης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Σταύρο Χαμόδρακα**, καθώς και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. **Ζωή Λίτου**, για την πολύτιμη βοήθειά τους σε θέματα που αφορούσαν βιο-πληροφορική ανάλυση και επεξεργασία.

Πολύτιμη υπήρξε και η συμμετοχή του Δρ. **Γεράσιμου Αραβαντινού**, Ιατρού Παθολόγου – Ογκολόγου και Διευθυντή του Β' Τμήματος Παθολογικής Ογκολογίας του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι», για τις σημαντικές συμβουλές του σε κλινικό επίπεδο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα και διαπρεπείς επιστήμονες τους εξωτερικού, των οποίων η υποστήριξη υπήρξε καθοριστική, όπως του Ομότιμου Καθηγητή, στο Johns Hopkins University, MD, USA, κ. **Ευάγγελου Μουδριανάκη**, ο οποίος αποτέλεσε την αφορμή ενασχόλησής μας με τον μεταβολισμό του καρκίνου. Επίσης, τον Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο VIB-K.U.Leuven του Βελγίου, κ. **Jean C. Marine**, ο οποίος πέρα από τις πολύτιμες συμβουλές του μας προμήθευσε με τις ισογονιδιακές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και τον Ερευνητή Α΄, στο St. Jude Children's Research Hospital, TN, USA, κ. **Gerry Zambetti**, για τα σημαντικά «μοριακά εργαλεία» που μας παρείχε στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης.

Ευχαριστώ θερμά το **Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)**, για την σημαντική προσωπική οικονομική ενίσχυση, μέσω της ευγενούς χορήγησης Μεταπτυχιακής Υποτροφίας Εσωτερικού, για Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, με Ειδίκευση στις «Βιολογικές Επιστήμες», τα έτη 2008 – 2011. Καθοριστική για την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών υπήρξε, επίσης, η οικονομική στήριξη τόσο της **Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ)** όσο και του Ερευνητικού Προγράμματος «**Καποδίστριας**» (Ε.Λ.Κ.Ε., ΕΚΠΑ). Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην φαρμακευτική εταιρεία **Janssen-Cilag A.E.B.E.**, για την ευγενική χορηγία του φαρμακευτικού σκευάσματος Bortezomib (*Velcade*).

Όλες οι προσπάθειες, οι στόχοι και οι φιλοδοξίες μου έχουν ως απαρχή και βάση τους γονείς μου, **Γιώργο** και **Ελένη**, οι οποίοι αποτελούν άμεσο ή έμμεσο κίνητρο για κάθε μου βήμα. Είναι οι άνθρωποι που, σιωπηλά τις περισσότερες φορές, αλλά καθοριστικά, στηρίζουν την κάθε μου επιλογή, θεμιτή ή όχι για τους ίδιους, που με συμβουλεύουν όποτε τους το ζητάω και που ανέχονται την ένταση αλλά και την απουσία μου όλα αυτά τα χρόνια. Σημαντική για την, ενίοτε δύσκολη, καθημερινότητα, η συμβολή, ιδιαίτερα της αδερφής μου **Μαρίνας**, καθώς και των αδερφών μου **Χρήστου** και **Γιώργου**, που με τον δικό τους τρόπο, ο καθένας τους ξεχωριστά, ενισχύει και ενθαρρύνει την προσπάθεια αυτή.

ΕΓΚ

# *Πρόλογος*

## Πρόλογος

Η Διδακτορική Διατριβή αποτελεί μία υπερ-προσπάθεια κάθε νέου ερευνητή. Μία αναζήτηση και εξερεύνηση σε «μονοπάτια» ποικίλα, ενδιαφέροντα και καινοτόμα. Αποτελώντας τη «μάστιγα» της σημερινής εποχής, ο ανθρώπινος καρκίνος προσελκύει το ενδιαφέρον πληθώρας ερευνητών, ενώ η εξεύρεση του τρόπου και των μηχανισμών με τους οποίους τα κακοήθη κύτταρα δημιουργούνται, αναπτύσσονται και λειτουργούν εντυπωσιάζει τον καθένα. Σε μία εποχή πολλών δυσκολιών, έντονων προβληματισμών και μεγάλων απαιτήσεων δεν πρέπει να χάνεται η αισιοδοξία και η προσπάθεια για την επίτευξη κάθε στόχου. Η πολύχρονη και δημιουργική αυτή πορεία με αφήνει πιο ολοκληρωμένη και ώριμη επιστημονικά, αλλά και πιο γεμάτη προσωπικά. Ελπίζω και εύχομαι κάθε νέος επιστήμονας να έχει την τύχη να «γευτεί» αυτό που ένιωσα και εγώ: *τη Μαγεία της Βιολογίας*.

**Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου**

Μάρτιος 2013

# *Περιεχόμενα*

<b>Συντομογραφίες - Λεξιλόγιο</b> .....	2
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	15
<b>1.1 Ουροποιητικό Σύστημα</b> .....	15
1.1.1 Γενικά.....	15
1.1.2 Ουροδόχος Κύστη.....	16
1.1.2.1 Θέση και περιγραφή της ουροδόχου κύστης.....	16
1.1.2.2 Αγγείωση, λεμφική παροχέτευση και νεύρωση της ουροδόχου κύστης.....	20
1.1.2.3 Ιστολογική δομή της ουροδόχου κύστης.....	21
1.1.2.4 Παθήσεις της ουροδόχου κύστης.....	24
<b>1.2 Καρκίνος της ουροδόχου κύστης</b> .....	26
1.2.1 Επιδημιολογία.....	26
1.2.2 Παράγοντες κινδύνου.....	27
1.2.3 Κατηγοριοποίηση και σταδιοποίηση κακοήθων νεοπλασμάτων ουροδόχου κύστης.....	30
1.2.3.1 Προ-καρκινικές αλλοιώσεις του ουροθηλίου.....	39
1.2.4 Μοριακή και κυτταρική γενετική του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.....	43
<b>1.3 Μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης</b> .....	51
1.3.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι υποδοχέα ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3 ( <i>FGFR3</i> ).....	51
1.3.2 Μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/Akt.....	55
1.3.3 Κυτταρική σηματοδότηση μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK.....	57
1.3.4 Σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK.....	59
1.3.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 σε θεμελιώδη ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης.....	62
1.3.6 Φαινόμενο Warburg – Μεταβολισμός καρκίνου.....	65
1.3.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου.....	68



1.3.7.1	Απόπτωση.....	68
1.3.7.2	Αυτοφαγία.....	73
1.3.7.3	Προγραμματισμένη νέκρωση.....	77
<b>1.4</b>	<b>Θεραπεία του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου</b>	
	<b>κύστης.....</b>	<b>81</b>
1.4.1	Χημειοθεραπεία ανθρώπινου καρκίνου.....	83
1.4.1.1	Cisplatin (Σισπλατίνη).....	83
1.4.1.2	Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη).....	90
1.4.1.3	3-Bromopyruvate (3-Βρωμοπυροσταφυλικό οξύ).....	99
	<b>Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής.....</b>	<b>106</b>
<b>2.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>108</b>
<b>2.1</b>	<b>Κυτταροκαλλιέργειες.....</b>	<b>108</b>
2.1.1	Καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης.....	108
2.1.2	Διατήρηση και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης <i>in vitro</i> .....	110
2.1.3	Φύλαξη, κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων καρκίνου ουροδόχου κύστης.....	113
<b>2.2</b>	<b>Ποσοτική ανάλυση κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω</b>	
	<b>δοκιμασίας MTT.....</b>	<b>114</b>
<b>2.3</b>	<b>Κυτταρομετρία ροής (FACS).....</b>	<b>117</b>
<b>2.4</b>	<b>Ημι-ποσοτική αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης</b>	
	<b>(Semi-quantitative RT-PCR).....</b>	<b>118</b>
2.4.1	Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα.....	118
2.4.2	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT: Reverse <i>Transcription</i> ).....	120
2.4.3	Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	121
2.4.4	Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA και προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	125

<b>2.5 Συλλογή, ανίχνευση και μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών</b> .....	127
2.5.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα.....	127
2.5.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford.....	129
2.5.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης.....	129
2.5.4 Στύπωμα Western ( <i>Western blot</i> ).....	132
2.5.5 Επώσεις με αντισώματα.....	134
<b>2.6 Παροδική διαμόλυνση ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου ουροδόχου κύστης</b> .....	136
<b>2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομορίων ενέργειας και προϊόντων γλυκολυτικού μεταβολισμού</b> .....	137
2.7.1 Δοκιμασία ποσοτικοποίησης ενεργειακής αναλογίας ADP/ATP.....	137
2.7.2 Μέθοδος ποσοτικοποίησης λακτικού οξέος.....	138
<b>2.8 Ανάλυση αλληλουχίας DNA προϊόντων PCR</b> .....	140
2.8.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	140
2.8.2 Ηλεκτροφόρηση του γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	142
2.8.3 Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης ( <i>PCR: Polymerase Chain Reaction</i> ).....	142
2.8.4 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	142
2.8.5 Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσ(ιδ)ωτής αντίδρασης πολυμεράσης ( <i>PCR</i> ).....	142
2.8.6 Κυκλική αντίδραση αλληλούχισης DNA ( <i>Cycle DNA Sequencing</i> ).....	143
2.8.7 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης κυκλικής	

αλληλούχισης DNA.....	145
2.8.8 Προετοιμασία των καθαρισμένων προϊόντων και φόρτωση αυτών στον Αυτόματο Γενετικό Αναλυτή.....	146
<b>2.9 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας πρωτεασώματος.....</b>	<b>147</b>
<b>2.10 Αλλομοσχεύματα (“Xenografts”) καρκίνου ουροδόχου κύστης σε ανοσο-ανεπαρκείς (SCID) ποντικούς.....</b>	<b>150</b>
2.10.1 Δημιουργία της κυτταρικής σειράς T24-X (T24- Xenograft).....	150
2.10.2 Χορήγηση χημειοθεραπευτικού παράγοντα και αξιολόγηση της κυτταροτοξικής (θεραπευτικής) του δράσης σε πειραματικούς όγκους.....	150
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>153</b>
<b>3.1 Cisplatin (Σισπλατίνη).....</b>	<b>153</b>
3.1.1 Κυτταροτοξικές επιδράσεις της Cisplatin ενάντια στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.....	153
3.1.2 Βαθμο-εξαρτώμενη απόπτωση επαγόμενη από τη Cisplatin.....	154
3.1.3 Μεσολαβούμενη από τη Cisplatin επαγωγή και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p53.....	156
3.1.4 Απορρύθμιση της σηματοδοτικής ακεραιότητας της Akt κινάσης και του XIAP αποπτωτικού αναστολέα σε απόκριση στη δράση της Cisplatin.....	158
3.1.5 Επαγόμενη δια μέσου της Cisplatin πρωτεόλυση της Hsp90 από την πρωτεάση σερίνης Granzyme B.....	160
3.1.6 Οι δια μέσου της Cisplatin επαγόμενες μεταγραφικές αποκρίσεις που εμπλέκονται στα αποπτωτικά μονοπάτια μέσω των μιτοχονδρίων («ενδογενές»	

μονοπάτι) και των υποδοχέων θανάτου της κυτταρικής μεμβράνης («εξωγενές» μονοπάτι).....	161
3.1.7 p53-ανεξάρτητες μεταγραφικές δραστηριότητες που σχετίζονται με τη «διακίνηση» (“ <i>trafficking</i> ”) της Cisplatin.....	166
3.1.8 Συγκριτική ανάλυση της κυτταροτοξικής δράσης των Cisplatin, Carboplatin και Oxaliplatin σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.....	167
<b>3.2 Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη).....</b>	<b>170</b>
3.2.1 Επαγωγή κυτταροτοξικότητας μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στον αναστολέα του πρωτεασώματος Bortezomib: μία κυτταρο-ειδική απόκριση.....	170
3.2.2 Επαγωγή ενός Κασπασο-εξαρτώμενου προγράμματος αποπτωτικού θανάτου μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στο Bortezomib.....	172
3.2.3 Απουσία καθοριστικής εμπλοκής του p53 μεταγραφικού παράγοντα στην προκαλούμενη από το Bortezomib γονιδιωματική τοξικότητα στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24.....	180
3.2.4 Ο διττός ρόλος της αυτοφαγίας στην κυτταροτοξική δράση του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο των RT4 και T24 κυττάρων.....	183
3.2.5 Κυτταρο-ειδική απορρύθμιση της λειτουργικής ακεραιότητας σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου RT4 και T24 ως απόκριση στη δράση του Bortezomib.....	185

3.2.6	Γονιδιο-ειδικά πρότυπα μεταγραφικής ενεργότητας του κακοήθους ανθρώπινου ουροθηλίου των RT4 κυττάρων σε περιβάλλον πρωτεασωμικής αδρανοποίησης....	195
3.2.7	Η έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στο Bortezomib οδηγεί σε ισχυρή αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος και συσσώρευση ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών.....	198
3.2.8	Κυτταροτοξική ενεργότητα του Bortezomib στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP.....	201
3.2.9	Τα RT112 και TCCSUP ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου υπόκεινται σε ένα Κασπασο-εξαρτώμενο πρόγραμμα αποπτωτικού θανάτου ως απόκριση στην έκθεση στο Bortezomib.....	203
3.2.10	Η επαγωγή του γονιδιωματικού στρες στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP ως απόκριση στο Bortezomib δεν συνοδεύεται από ενεργοποίηση του p53 μεταγραφικού παράγοντα.....	207
3.2.11	Η διαφορική συμμετοχή του μηχανισμού της αυτοφαγίας ως καθοριστική απόκριση στην κυτταροτοξική δράση του Bortezomib στο ανθρώπινο κακοήθες ουροθήλιο των RT112 και TCCSUP κυττάρων.....	209
3.2.12	Απορρύθμιση της λειτουργικής ακεραιότητας κρίσιμων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP μετά από χορήγηση	

Bortezomib.....	211
3.2.13 Ισχυρή αναστολή της ενδογενούς ενεργότητας του πρωτεασώματος μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP στο Bortezomib.....	219
3.2.14 <i>In vivo</i> θεραπευτική δυναμική του Bortezomib σε πειραματικούς όγκους κακοήθους ουροθηλίου τύπου αλλομοσχεύματος (“ <i>Xenograft</i> ”) σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς.....	221
<b>3.3 3-BrPA (3-Βρωμοπυροσταφυλικό οξύ).....</b>	<b>225</b>
3.3.1 Το 3-BrPA επάγει κυτταρο-ειδική τοξικότητα και θάνατο σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.....	225
3.3.2 Τα T24-X κύτταρα παρουσιάζουν συγκριτικά μέτρια ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA.....	229
3.3.3 Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης υπόκεινται σε επαγόμενο από το 3-BrPA αποπτωτικό και μη-αποπτωτικό θάνατο με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.....	231
3.3.4 Έκθεση καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή καταστολή της αυτοφαγίας.....	239
3.3.5 Ισχυρή κατάρρευση δικτύων σηματοδοτικής ακεραιότητας με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης υπό την επίδραση του 3-BrPA.....	241
3.3.6 Το 3-BrPA επάγει γενotoξικές αποκρίσεις σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης χωρίς τη συμμετοχή του p53 μεταγραφικού παράγοντα – κυτταροτοξική συνέργεια των 3-BrPA και PRIMA-1.....	252

3.3.7	Μειορρύθμιση καθοριστικών στοιχείων της ομοιόστασης της γλυκόζης μετά από έκθεση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA – φαρμακο-εξαρτώμενη επαγωγή της αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου ( <i>exon splicing silencing</i> ) του <i>GLUT4</i> γονιδίου.....	262
3.3.8	Το 3-BrPA μειώνει δραματικά τα επίπεδα ATP σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, ενώ η κυτταροτοξική του ενεργότητα αποδυναμώνεται από την λειτουργική παρεμπόδιση της Akt- και p44/42 MAPK-εξαρτώμενης σηματοδότησης.....	283
3.3.9	Κυτταροτοξική δυναμική του 3-BrPA στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του θυρεοειδούς αδένος: μία p53-ανεξάρτητη διεργασία.....	287
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση</b> .....	292
<b>4.1</b>	<b>Cisplatin (Σισπλατίνη)</b> .....	292
<b>4.2</b>	<b>Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη)</b> .....	310
<b>4.3</b>	<b>3-BrPA (3-Βρωμοπροσταφυλικό οξύ)</b> .....	334
	<b>Επίλογος</b> .....	362
	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	366
	<b>Παράρτημα</b>	

# *Συντομογραφίες - Λεξιλόγιο*



## Συντομογραφίες - Λεξιλόγιο

ABC	ATP-binding cassette, Κασέτα πρόσδεσης στο ATP
ADC	Adenocarcinoma, Αδενοκαρκίνωμα
ADP	Adenosine diphosphate, Διφωσφορική αδενοσίνη
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside, 5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο 1-β-D-ριβοφουρανοσίδη
AIF	Apoptosis-inducing factor, Παράγοντας επαγωγής απόπτωσης
AJCC	American Joint Committee on Cancer, Αμερικάνικη Κοινή Επιτροπή για τον Καρκίνο
Akt	v-Akt murine thymoma viral oncogene, Ιικό ογκογονίδιο μυϊκού θυμώματος
AML	Acute myeloid leukemia, Οξεία μυελογενής λευχαιμία
AMP	Adenosine monophosphate, Μονοφωσφορική αδενοσίνη
AMPK	AMP-activated protein kinase, Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από AMP
ANT	Adenine nucleotide translocase, Νουκλεοτιδική τρανσλοκάση αδερίνης
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1, Παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικής πρωτεάσης 1
APS	Ammonium persulfate, Υπερθειικό αμμώνιο
AS160	Akt substrate 160, Υπόστρωμα της Akt 160
ATCC	American Type Culture Collection, Αμερικανικού Τύπου Συλλογή Καλλιεργειών
Atg	Autophagy-related genes, Γονίδια που σχετίζονται με αυτοφαγία
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase, Μεταλλαγμένη κινάση αταξίας τελαγγειεκτασίας
ATP	Adenosine triphosphate, Τριφωσφορική αδενοσίνη
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, Πρωτεΐνη που σχετίζεται με τις αταξία τελαγγειεκτασία και Rad3
Bad	Bcl-2-associated death promoter, Προαγωγέας θανάτου σχετιζόμενος με την Bcl-2 οικογένεια
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer, Bcl-2-ομόλογος ανταγωνιστής «δολοφόνος»

Bax	Bcl-2-associated X protein, Πρωτεΐνη X σχετιζόμενη με την Bcl-2 οικογένεια
Bcl-X <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-extra large, Υπερμέγεθες λέμφωμα Β-κυττάρων
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, Λέμφωμα Β-κυττάρων 2
BER	Base-excision repair, Επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής βάσης
Bid	BH3 interacting-domain death agonist, Αγωνιστής θανάτου BH3-αλληλεπιδρώσας περιοχής
Bik	Bcl-2-interacting killer, Bcl-2 αλληλεπιδρών «δολοφόνος»
Bnip3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, Πρωτεΐνη 3 αλληλεπιδρώσα με την Bcl-2 και την 19 kDa πρωτεΐνη του E1B αδενοϊού
BSA	Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease, Δεοξυ-ριβο(ζο)νουκλεάση ενεργοποιημένη από Κασπάση ( <i>DFF-40</i> )
Cdc	Cell division cycle, Κύκλος κυτταρικής διαίρεσης
Cdk	Cyclin-dependent kinase, Κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη
cDNA	Complementary DNA, Συμπληρωματικό DNA
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, Ομόλογο ιϊκού ογκογονιδίου οστεοσαρκώματος FBJ μύς
cIAPs	Cellular inhibitors of apoptosis, κυτταρικοί αναστολείς απόπτωσης
CK2	Casein kinase 2, Κινάση καζεΐνης 2
Cis	Carcinoma <i>in situ</i> , Επί τόπου καρκίνωμα
cMOAT	Canalicular multispecific organic anion transporter, Σωληνοειδής πολυ-εξειδικευμένος μεταφορέας οργανικών ανιόντων ( <i>MRP2</i> ή <i>ABCC2</i> )
COX-2	Cyclooxygenase-2, Κυκλοοξυγενάση-2
CTK	Cytokine, Κυτ(ταρ)οκίνη
CTR1	Copper transporter 1, Μεταφορέας χαλκού 1 ( <i>SLC31A1</i> )
CYLD	Cylindromatosis, Κυλινδρομάτωση
CYP1A2	Cytochrome p450 1A2, Κυτόχρωμα p450 1A2
DAMP	Damage-associated molecular pattern, Μοριακό πρότυπο σχετιζόμενο με καταστροφή

DAPK	Death-associated protein kinase, Πρωτεϊνική κινάση σχετιζόμενη με θάνατο
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water, Νερό διπλής απόσταξης
ddNTP	Dideoxynucleotide Triphosphate, Τριφωσφορικό διδεοξυ-νουκλεοτίδιο
DISC	Death-inducing signaling complex, Σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγωγής θανάτου
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Καλλιεργητικό μέσο του Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλ-σουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid, Δεοξυ-ριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase, Πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από DNA
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate, Τριφωσφορικό δεοξυ-νουκλεοτίδιο
DRAM	Damage-regulated autophagy modulator, Αυτοφαγικός διαμορφωτής ρυθμιζόμενος από καταστροφή
DRP1	Dynamin-related protein 1, Πρωτεΐνη 1 σχετιζόμενη με δυναμίνη
DR4	Death receptor 4, Υποδοχέας θανάτου 4 ( <i>TRAIL-R1</i> )
DR5	Death receptor 5, Υποδοχέας θανάτου 5 ( <i>TRAIL-R2</i> )
DSBR	Double-strand-break repair, Επιδιορθωτικός μηχανισμός δίκλωνης ρήξης/θραύσης
DTT	Dithiothreitol, Διθειοθρεϊτόλη
DUB	Deubiquitinase, Απο-ουμπικουϊτινάση
E-cad	E-cadherin, E-καδερίνη
ECL	Enhanced chemiluminescence, Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid, Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
EGF	Epidermal growth factor, Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Epidermal growth factor receptor, Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ , Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 2 $\alpha$
EndoG	Endonuclease G, Ενδονουκλεάση G
ERCC1	Excision repair cross-complementing-1, Επιδιόρθωση με εκτομή διασταυρωτής συμπληρωματικότητας-1

ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2, Κινάσες 1/2 ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα
ESS	Exon splicing silencing, Αποσιώπηση ματίσματος (επεξεργασίας) εξωνίου
EtBr	Ethidium bromide, Βρωμιούχο αιθίδιο
Ex	Exon, Εξόνιο
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Κυτταρομετρία ροής ενεργοποιημένου φθορισμού
FADD	Fas-associated protein with death domain, Fas-σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου
FAP	Fas-associated phosphatase, Fas-σχετιζόμενη φωσφατάση
FasL	Fas ligand, προσδέτης του Fas ( <i>CD95L</i> )
FBS	Fetal bovine serum, Ορός εμβρύου βοός
FDA	Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Η.Π.Α.)
FGF	Fibroblast growth factor, Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3, Υποδοχέας ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3
FITC	Fluorescein isothiocyanate, Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη
FLIP	FLICE-like inhibitory protein, FLICE-προσομοιάζουσα ανασταλτική πρωτεΐνη
FoxO	Forkhead box protein O, Πρωτεΐνη O φέρουσα επικράτεια διχαλωτής κεφαλής
GAP	GTPase-activating protein, Πρωτεΐνη που ενεργοποιεί GTPάση
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερ(ιν)αλδεΐδης
GC	Gemcitabine-Cisplatin, Τζεμισταμπίνη-Σισπλατίνη
gDNA	Genomic DNA, Γενομικό/Γονιδιωματικό (Πυρηνικό) DNA
GDP	Guanosine diphosphate, Διφωσφορική γουανοσίνη
GF	Growth factor, Αυξητικός παράγοντας
GlcNAc	N-acetyl-glucosamine, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη
GLUL	Glutamate-ammonia ligase, Λιγάση γλουταμινικού οξέος-αμμωνίας

GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, Αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος 1
GLUT1/2/3/4	Glucose transporter type 1/2/3/4, Μεταφορέας γλυκόζης τύπου 1/2/3/4 ( <i>SLC2A1/2/3/4</i> )
GLS2	Glutaminase 2, Γλουταμινάση 2
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2, Πρωτεΐνη 2 προσδεμένη σε υποδοχέα αυξητικού παράγοντα
GSH	Glutathione, Γλουταθειόνη
GSK-3α/β	Glycogen synthase kinase 3α/β, Κινάση συνθ(ετ)άσης γλυκογόνου 3α/β
GST	Glutathione-S transferase, Μεταφοράση/Τρανσφεράση γλουταθειόνης-S
GSTM1	Glutathione-S-transferase Mu 1, Τρανσφεράση γλουταθειόνης-S Mu 1
GTP	Guanosine triphosphate, Τριφωσφορική γουανοσίνη
G-6-P	Glucose-6-phosphate, 6-φωσφορική γλυκόζη
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης
HDAC	Histone deacetylase, Απο-ακετυλάση ιστόνης
HEPA	High-Efficiency Particulate Air, Υψηλής απόδοσης αέρας σωματιδίων
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4 - (2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1, Παράγοντας 1 επαγόμενος από υποξία
HK2	Hexokinase II, Εξωκινάση 2
HMG	High-mobility group, Ομάδα υψηλής κινητικότητας
hnRNP K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, Ετερογενής πυρηνική ριβο(ζο)νουκλεοπρωτεΐνη K
H-Ras	v-Ha-Ras, Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, Ομόλογο ιϊκό ογκογονίδιο σαρκώματος αρουραίου Harvey
HRP	Horseshoe peroxidase, υπεροξειδάση χρένου
Hsp	Heat shock protein, Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
H2AX	H2A histone family-member X, H2A οικογένεια ιστονών-μέλος X
IARC	International Agency for Research on Cancer, Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για Καρκίνο

ICAD	Inhibitor of CAD, Αναστολέας CAD νουκλεάσης ( <i>DFP-45</i> )
IGF	Insulin-like growth factor, Αυξητικός παράγοντας προσομοιάζων με ινσουλίνη
IκB	Inhibitor of NFκB, Αναστολέας του NFκB
IKK	IκB kinase, Κινάση του IκB
IL-8	Interleukin 8, Ιντερλευκίνη 8
In	Intron, Εσώνιο/Ιντρόνιο
IR	Insulin receptor, Υποδοχέας ινσουλίνης
IRS	Insulin receptor substrate, Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης
IVP	Intravenous pyelography, Ενδοφλέβια πυελογραφία
JAK	Janus kinase, κινάση τύπου Ιανός (Διπρόσωπος μυθικός ρωμαίος θεός)
JNK	c-Jun amino terminal kinase, Αμινοτελική κινάση του c-Jun
K-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene, Ίικό ογκογονίδιο σαρκώματος του αρουραίου Kirsten
LAMC2	Laminin subunit gamma-2, Γάμμα υπομονάδα λαμινίνης 2
LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους 1A/1B ελαφριάς αλυσίδας 3B ( <i>MAP1LC3B</i> )
LDH	Lactate dehydrogenase, Λακτική αφυδρογονάση
LMP	Lysosomal membrane permeabilization, Διαπερατότητα λυσοσωμικών μεμβρανών
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, Ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1, Ακολουθία μυελογενούς κυτταρικής λευχαιμίας 1
MCTs	Monocarboxylate transporters, Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς
MDM2	Murine double minute oncogene 2, Διπλού λεπτού ογκογονίδιο μυός 2
MDR	Multidrug resistant, Ανθεκτική/ός σε πληθώρα φαρμάκων ( <i>ABCB</i> )
MEFs	Mouse embryo fibroblasts, Ινοβλάστες εμβρύου ποντικού
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase/ERK kinase, Ενεργοποιημένη από μιτογόνο κινάση της πρωτεϊνικής κινάσης/κινάση της ERK
miRs	micro-RNAs, μικρο- RNAs
MLH1	MutL homologue-1, Ομόλογο του MutL (Mutual L) 1

MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein, Πρωτεΐνη φέρουσα επικράτεια προσομοιάζουσα με κινάση μικτής γενεάς
MMP	Matrix metalloproteinase, Μεταλλοπρωτεϊνάση θεμέλιας ουσίας/στρώματος
MMR	Mismatch repair, Επιδιορθωτικός μηχανισμός ανορθόδοξης συμπληρωματικότητας - αναντιστοιχίας
MRI	Magnetic resonance imaging, Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
mRNA	Messenger RNA, Αγγελιοφόρο RNA
MRP	Multidrug resistant-associated protein, Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με ανθεκτικότητα σε πληθώρα φαρμάκων
MSH	Homologue of the bacterial protein MutS, Ομόλογη της βακτηριακής πρωτεΐνης MutS
mt	Mutant, Μεταλλαγμένος(η) τύπος/μορφή
mTOR	Mammalian target of rapamycin, Στόχος ραπαμκίνης θηλαστικών
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2, Σύμπλοκο στόχου ραπαμκίνης θηλαστικών 2
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], [3-(4,5-διμεθυλ-θειαζόλ-2-υλ)-2,5-διφαινυλ-τετραζόλιο βρωμίδιο]
M-VAC	Methotrexate - Vinblastine - Adriamycin (Doxorubicin) - Cisplatin, Μεθοτρεξάτη - Βινμπλαστίνη - Αδριαμυκίνη (Δοξορουβικίνη) - Σισπλατίνη
Myc	Myelocytomatosis, Μυελοκυτομάτωση
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Φωσφο-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide, Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NAT	N-acetyltransferase, N-ακετυλο-τρανσφεράση
NER	Nucleotide-excision repair, Επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίου
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ενισχύει την «κ» ελαφριά αλυσίδα ενεργοποιημένων Β-κυττάρων
NFM	Non-fat milk, Άπαχο (χωρίς λιπαρά) γάλα

NIH	National Institute of Health, Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (Η.Π.Α.)
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay, Αποσύνθεση/αποικοδόμηση mRNA φέρον πρώιμο(α) κωδικό(α) λήξης
NSCLC	Non-small cell lung cancer, Μη-μικρο-κυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
OD	Optical density, Οπτική πυκνότητα
OMM	Outer mitochondrial membrane, Εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυ-ακρυλαμίδης
PAK	p21 <sup>rac/cdc42</sup> -activated kinase, Κινάση ενεργοποιημένη από την p21 <sup>rac/cdc42</sup>
PAR	Poly(ADP-ribose), Πολυ(ADP-ριβόζη)
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase, Γλυκοϋδρολάση πολυ(ADP-ριβόζης)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase, Πολυμεράση πολυ-(ADP-ριβόζης)
PBS	Phosphate buffered saline, Φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα
PCD	Programmed cell death, Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
PCR	Polymerase chain reaction, Αλυσ(ιδω)τή αντίδραση πολυμεράσης
PDGF	Platelet-derived growth factor, Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, 3-φωσφοϊνοσιτιδο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση-1
PFK	Phosphofructokinase, Φωσφο-φρουκτοκινάση
PGC1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$ , Συν-ενεργοποιητής 1 $\alpha$ του ενεργοποιημένου από τον πολλαπλασιαστή του υπεροξυσώματος υποδοχέα γάμμα ( $\gamma$ )
PGM	Phosphoglycerate mutase, Μουτάση γλυκερινοφωσφορικού ( <i>PGAM</i> )
PGPH	Post-glutamyl peptide hydrolase-like, Προσομοιάζουσα της πεπτιδικής υδρολάσης σε «μετα-γλουταμική» θέση
PH	Pleckstrin homology, Ομολογία πλεξτρίνης
PHGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase, Φωσφογλυκερινική αφυδρογονάση
Pi	Phosphate, (Mono-)Φωσφορικό



PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη	4,5-Διφωσφορική-
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη	3,4,5-Τριφωσφορική-
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase, Κινάση φωσφοϊνοσιτίδης-3	
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ , ενεργοποιημένος από τον πολλαπλασιαστή του υπεροξυσώματος	Υποδοχέας γάμμα ( $\gamma$ )
PPi	Pyrophosphate, Δι-φωσφορικό/Πυροφωσφορικό	
PPP	Pentose phosphate pathway, Κύκλος φωσφορικών πεντοζών	
PP2A	Protein phosphatase 2A, Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A	
pRb	Retinoblastoma protein, Πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος	
PTC	Premature termination codon, Πρώιμο κωδικόνιο/κωδικό λήξης	
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, Φωσφατάση φέρουσα περιοχές ομολογίας με τενσίνη	
PTP	Permeability transition pore, Πόρος παροδικής διαπερατότητας	
PTPN1	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1, Πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης τύπου μη-υποδοχέα 1	
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis, p53 αυξορρυθμιζόμενος διαμορφωτής απόπτωσης	
PUNLMP	Papillary urothelial neoplasia of low-malignant potential, Θηλωματώδης νεοπλασία του ουροθηλίου με δυναμικό χαμηλής κακοήθειας	
PYGL	Glycogen phosphorylase, Γλυκογονοφωσφορυλάση	
PYK2	Proline-rich tyrosine kinase, Κινάση τυροσίνης πλούσια σε προλίνες	
Rab	Ras-related protein, Πρωτεΐνη που σχετίζεται με την Ras	
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma, Ινοσάρκωμα γρήγορης επιτάχυνσης/εξέλιξης	
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR, Πρωτεΐνη mTOR σχετιζόμενη με ρύθμιση	
Ras	Rat sarcoma gene, Γονίδιο σαρκώματος αρουραίου	
RIP1/3	Receptor-interacting protein kinase 1/3, Πρωτεϊνική κινάση 1/3 αλληλεπιδρώσα με υποδοχέα	
RNA	Ribonucleic acid, Ριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ	

RNAi	RNA interference, Αποσιώπηση RNA
ROS	Reactive oxygen species, Ενεργές ρίζες οξυγόνου
rpm	Rounds per minute, Στροφές ανά λεπτό
RSE	RSV stability element, Στοιχείο σταθεροποίησης ιού RSV
RSV	Rous sarcoma virus, Ιός σαρκώματος Rous
RT	Reverse transcriptase, Αντίστροφη μεταγραφή
RTK	Receptor tyrosine kinase, Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης
SCC	Squamous Cell Carcinoma, Καρκίνωμα πλακωδών (φολιδωτών) κυττάρων
SCID	Severe combined immunodeficiency, Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
SCO2	Synthesis of cytochrome <i>c</i> oxidase 2, Οξειδάση 2 της σύνθεσης του κυτοχρώματος <i>c</i>
SDH	Succinate dehydrogenase, Αφυδρογονάση ηλεκτρικού οξέος
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Θεϊκό δωδεκυλικό νάτριο
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results, Οργανισμός Εποπτείας, Επιδημιολογίας και Τελικών Αποτελεσμάτων
SMase	Sphingomyelinase, Σφιγγομυελινάση
SMCT1	Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, Μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας 1 συζευγμένος με νάτριο
Sq	Semi-quantitative, Ημι-ποσοτική
SREBF1	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1, Μεταγραφικός παράγοντας 1 που συνδέεται στο ρυθμιστικό στοιχείο της στερόλης
Src	Sarcoma, Σάρκωμα
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3, Σηματοδοτικός μεταγωγέας και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3
Sv	Splicing variant, Ισομορφή/παραλλαγή ματίσματος/επεξεργασίας
S6K	S6 kinase, S6 κινάση
TBE	Tris/Borate/EDTA, Τρις/Βορικό οξύ/Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ
TBC1D1	TBC1 domain family member 1, Μέλος 1 της οικογένειας φέρουσας TBC1 επικράτεια

TBS	Tris-buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/άλατος
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle, Κύκλος τρι-καρβοξυλικού οξέος
TCC	Transitional Cell Carcinoma, Καρκίνωμα μεταβατικού επιθηλίου
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'- τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
THBS1	Thrombospondin 1, Θρομβοσπονδίνη 1
TIGAR	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator, p53-επαγόμενος ρυθμιστής γλυκόλυσης και απόπτωσης
Tm	T melting, Θερμοκρασία τήξης
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$ , Παράγοντας νέκρωσης όγκου $\alpha$
TNFR	Tumor necrosis factor receptor, Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκου
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein, Πρωτεΐνη με επικράτεια θανάτου σχετιζόμενη με τον υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου τύπου 1
TRAF	TNF receptor associated factor, Παράγοντας σχετιζόμενος με τον TNF υποδοχέα
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand, TNF-σχετιζόμενος προσδέτης επαγωγής απόπτωσης
TSC1/2	Tuberous Sclerosis 1/2, Οζώδης σκλήρυνση 1/2
TUR	Transurethral resection, Διουρηθρική εκτομή
UICC	Union for International Cancer Control, Ένωση για τον Έλεγχο του Καρκίνου Διεθνώς
ULK1	Unc-51-like kinase 1, Κινάση 1 προσομοιάζουσα με την Unc-51
VDAC	Voltage-dependent anion channel, Κανάλι ανιόντων εξαρτώμενο από τάση
VEGF	Vascular endothelial growth factor, Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
wt	Wild-type, Φυσικό(ή) τύπος/μορφή
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein, Πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης συνδεόμενη με το X χρωμόσωμα
XPF	Xeroderma pigmentosum (XP) complementation group F, Ομάδα συμπληρωματικότητας μελαγχρωματικής ξηροδερμίας F

---

2D	2-Dimensional, Δύο διαστάσεων/Δισδιάστατος/η/ο
3-BrOP	3-Bromopyruvate propyl ester, 3-Βρωμο-πυροσταφυλικός προπυλεστέρας
3-BrPA	3-Bromopyruvate, 3-Βρωμο-πυροσταφυλικό οξύ
4E-BP1	eIF4E-binding protein 1, eIF4E-συνδεόμενη πρωτεΐνη 1
7AAD	7-Amino-actinomycin D, 7-Αμινο-ακτινομυκίνη D

*Εισαγωγή*

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ουροποιητικό Σύστημα

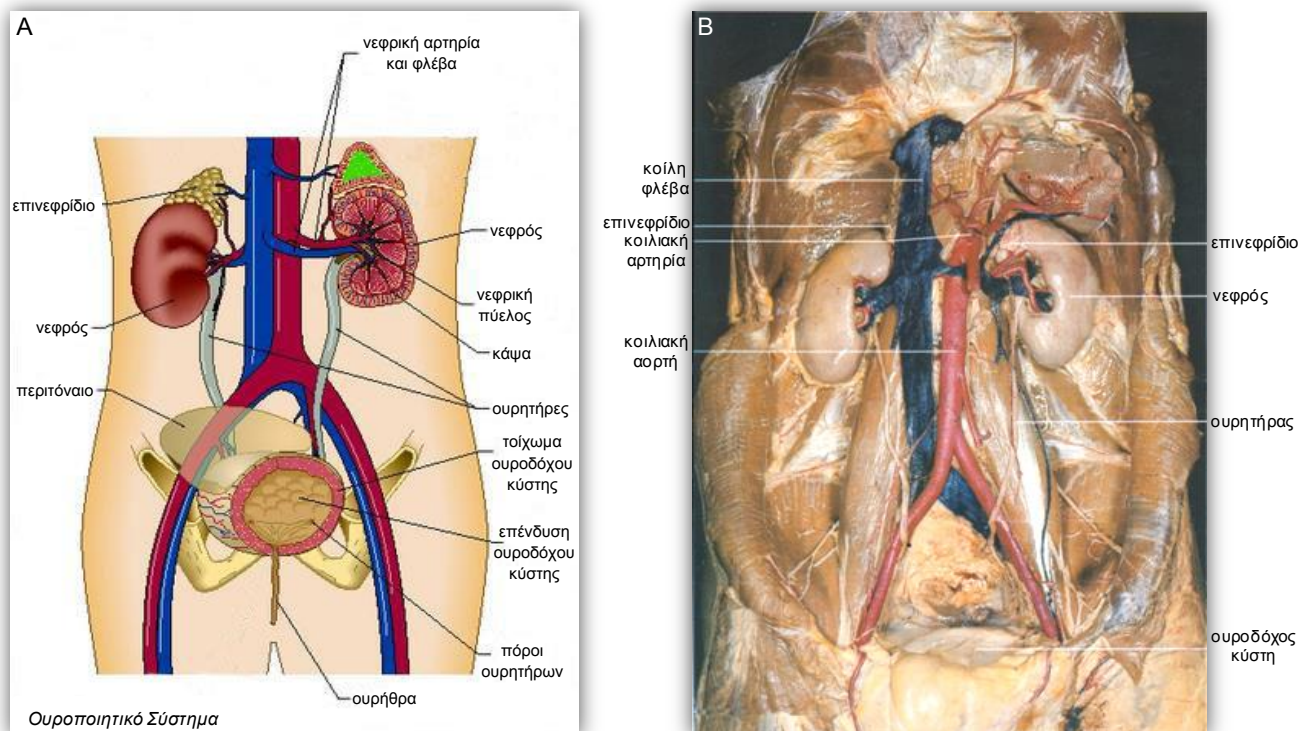
### 1.1.1 Γενικά

Το ουροποιητικό σύστημα (*urinary system*) του ανθρώπου αποτελεί ένα σύστημα οργάνων το οποίο έχει ως σκοπό να παράγει, να αποθηκεύει και να αποχετεύει τα ούρα. Μέσω αυτών των διαδικασιών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση βλαβερών και άχρηστων καταλοίπων του μεταβολισμού, η ρύθμιση του ισοζυγίου του ύδατος και των ηλεκτρολυτών στο ανθρώπινο σώμα, καθώς και η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας. Τα τοξικά μεταβολικά προϊόντα παράγονται κατά τις σωματικές λειτουργίες, το μεταβολισμό των τροφών, τις καύσεις και εν γένει από την καθημερινή λειτουργία του σώματός μας, με βασικότερα εξ αυτών τις αζωτούχες ενώσεις, όπως η ουρία και η αμμωνία, που προκύπτουν από το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Η σωστή λειτουργία των επιμέρους οργάνων συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης και περιλαμβάνει τη διήθηση συστατικών του πλάσματος του αίματος, την ενεργητική και παθητική επαναπορρόφηση ποσότητας νερού και τέλος την απέκκριση προϊόντων από το αίμα. Αποτέλεσμα των διεργασιών αυτών αποτελεί η παραγωγή των ούρων [1, 2].

Τα όργανα που απαρτίζουν το ουροποιητικό σύστημα είναι οι δύο νεφροί (*kidneys*), οι δύο ουρητήρες (*ureters*), η ουροδόχος κύστη (*urinary bladder*) και η ουρήθρα (*urethra*) (**Εικόνα 1.1**). Στο ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου διακρίνονται δύο οργανικές ενότητες: τα όργανα παραγωγής των ούρων που αποτελούνται από τους νεφρούς, και τα όργανα αποχέτευσης των ούρων που συνίστανται από τους νεφρικούς κάλυκες, τη νεφρική πύελο, τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και την ουρήθρα [1-4].

Όλα τα όργανα του ουροποιητικού συστήματος είναι εξωπεριτοναϊκά. Οι νεφροί με τους νεφρικούς κάλυκες και τη νεφρική πύελο (μία για κάθε νεφρό), καθώς και οι ουρητήρες (ένας από κάθε νεφρό) βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Οι τελικές μοίρες των ουρητήρων διέρχονται στην

μικρή πύελο και καταλήγουν στην ουροδόχο κύστη, στον υποπεριτοναϊκό χώρο. Τα μη ωφέλιμα (προς αποβολή) προϊόντα απεκκρίνονται από τους νεφρούς στα ούρα, και ακολούθως διέρχονται από τους ουρητήρες, την ουροδόχο κύστη και τελικά αποβάλλονται από το σώμα διά της ουρήθρας [1-5].



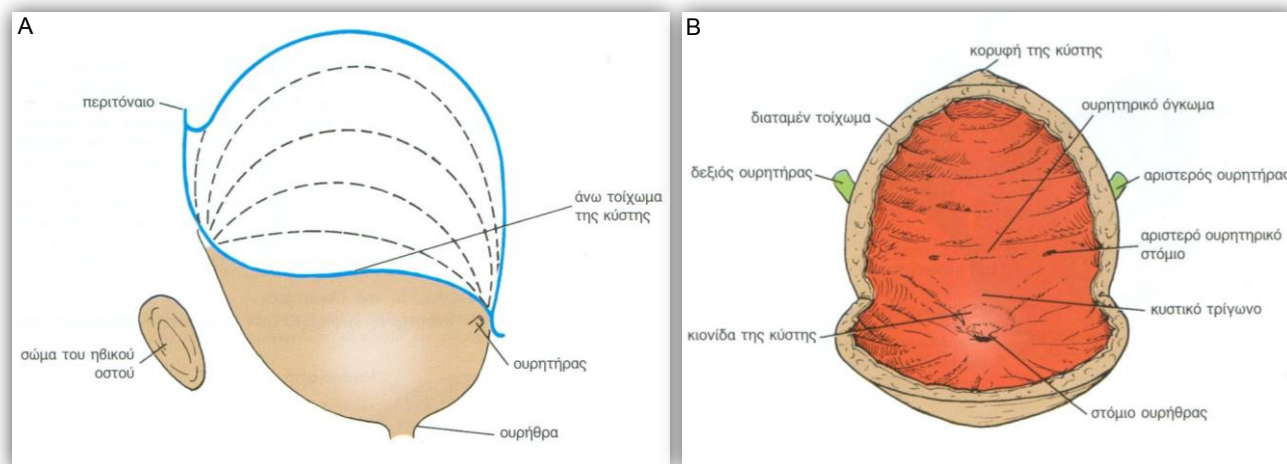
**Εικόνα 1.1** Το ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου σε εικονογραφημένη αναπαράσταση (A) και νεκροτομική απεικόνιση (B) μετά από επεξεργασία ψευδοχρωματισμού (A: <http://classofjeong.wikispaces.com>, B: Human Anatomy by Johannes W. Rohen and Chihiro Yokochi, 3<sup>rd</sup> Edition, 1993).

## 1.1.2 Ουροδόχος Κύστη

### 1.1.2.1 Θέση και περιγραφή της ουροδόχου κύστης

Η ουροδόχος κύστη συνιστά ένα κοίλο όργανο με ισχυρό μυϊκό τοίχωμα και εντοπίζεται ακριβώς πίσω από τα ηβικά οστά, εντός της πυέλου. Αποτελεί υποδοχέα και αποθήκη των ούρων στα μεσοδιαστήματα των ουρήσεων, ενώ η μέγιστη χωρητικότητα στον ενήλικα άνθρωπο είναι 500 ml. Το σχήμα και οι διαστάσεις της μεταβάλλονται ανάλογα με τον βαθμό πλήρωσής της. Η άδεια κύστη στους ενήλικες βρίσκεται εξ ολοκλήρου μέσα στην πύελο και καθώς γεμίζει το άνω τοίχωμά της ανυψώνεται προς την περιοχή του υπογάστριου (Εικόνα 1.2). Στα μικρά παιδιά, η

άδεια κύστη προεξέχει πάνω από το άνω στόμιο της πυέλου, ενώ αργότερα, καθώς η πυελική κοιλότητα μεγαλώνει, η ουροδόχος κύστη βυθίζεται μέσα στην πύελο και παίρνει τη θέση της όπως στον ενήλικα [1, 2, 5].

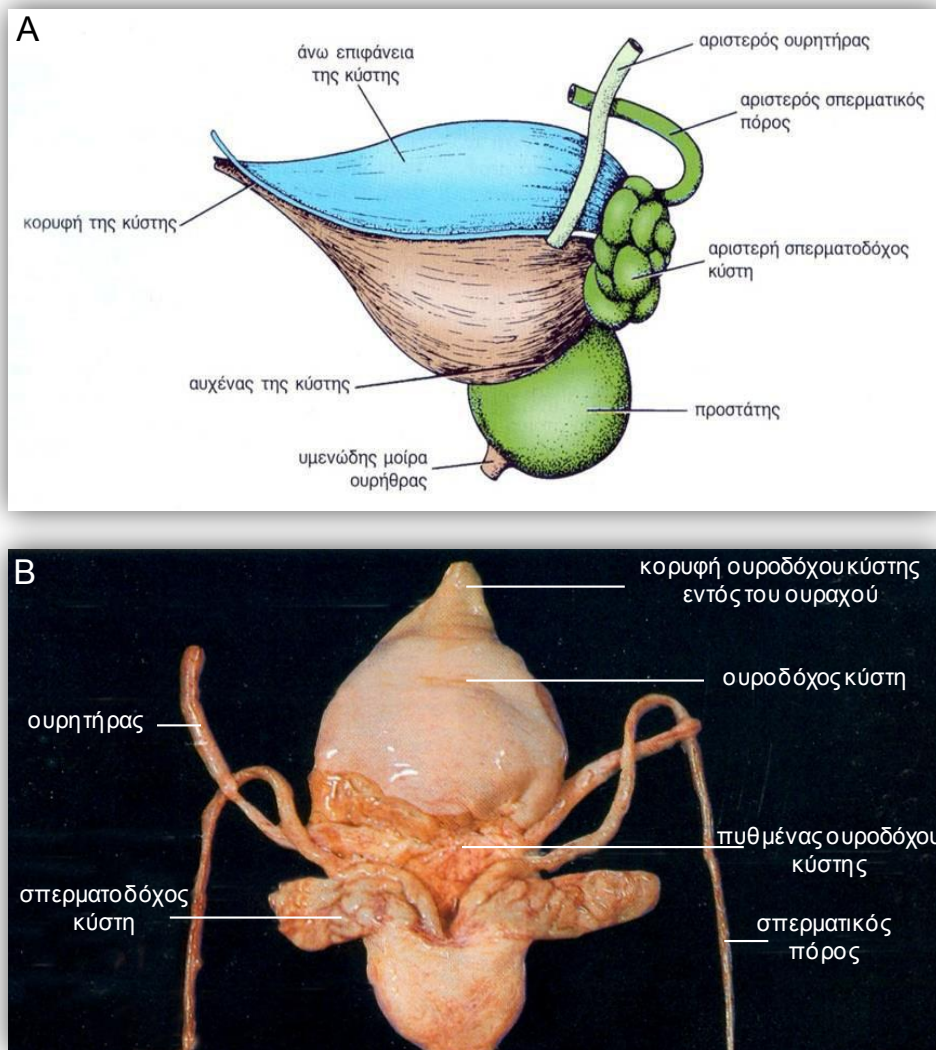


**Εικόνα 1.2** Α. Πλάγια άποψη της ουροδόχου κύστης, όπου καθώς οδηγείται σε πληρότητα με τα ούρα το άνω τοίχωμά της ανέρχεται. Β. Εσωτερικό της ουροδόχου κύστης στον άνδρα, όπως παρατηρείται από το πρόσθιο μέρος [5].

Η κενή ουροδόχος κύστη εμφανίζει σχήμα πυραμιδοειδές (**Εικόνα 1.3**), με διακριτώς αναγνωριζόμενες κορυφή, οπίσθια επιφάνεια (βάση), άνω επιφάνεια, δύο πλάγιες-κάτω επιφάνειες και αυχένα. Η κορυφή της εντοπίζεται πίσω από το άνω χείλος της ηβικής σύμφυσης (**Εικόνα 1.2**) και συνδέεται με τον ομφαλό μέσω του ενδιάμεσου ομφαλοκυστικού συνδέσμου (αποφραχθείς ουραχός), ενώ η βάση ή οπίσθια επιφάνεια της ουροδόχου κύστης εμφανίζει τριγωνικό σχήμα. Οι ουρητήρες εκβάλλουν στις άνω πλάγιες γωνίες, ενώ από την κάτω γωνία εκβάλλει η ουρήθρα. Οι δύο σπερματικοί πόροι εντοπίζονται κοντά ο ένας προς τον άλλον, στην οπίσθια επιφάνεια της ουροδόχου κύστης και ανάμεσα στις σπερματοδόχους κύστες (**Εικόνα 1.3**) [2, 4, 5]. Το ανώτερο τμήμα της οπίσθιας επιφάνειας της κύστης καλύπτεται από περιτόναιο, το οποίο σχηματίζει το πρόσθιο τμήμα του ευθυκυστικού κολπώματος, ενώ ανάμεσα στο κατώτερο τμήμα της οπίσθιας επιφάνειας και στο ορθό παρεμβάλλονται οι σπερματοδόχοι κύστες, οι σπερματικοί πόροι και η ευθυκυστική περιτονία. Η άνω επιφάνεια της ουροδόχου κύστης καλύπτεται πλήρως από περιτόναιο, ενώ κατά μήκος των πλαγίων χειλεών της επιφάνειας αυτής, το περιτόναιο ανακάμπτει προς τα πλάγια πυελικά τοιχώματα. Οι πλάγιες-κάτω επιφάνειες συνάπτουν σχέσεις πρόσθια με τα ηβικά οστά και το οπισθοηβικό στρώμα λίπους. Προς τα πίσω, οι πλάγιες-κάτω επιφάνειες έρχονται σε σχέση με τον έσω

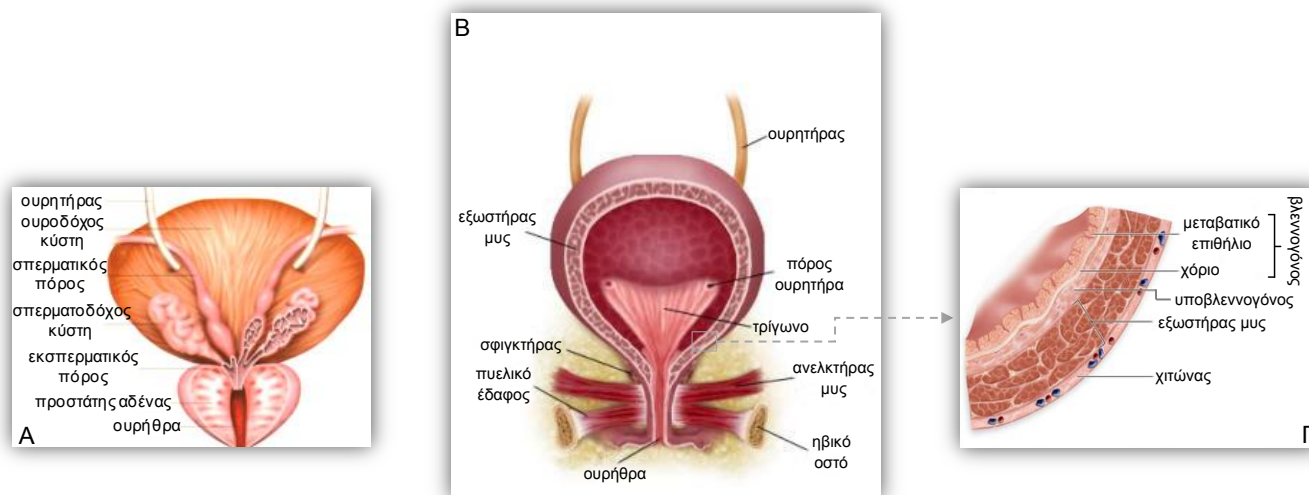


θυροειδή μυ προς τα άνω και με τον ανελκτήρα του πρωκτού μυ προς τα κάτω. Ο αυχένας της ουροδόχου κύστης βρίσκεται προς την κάτω πλευρά και ακουμπά στην άνω επιφάνεια του προστάτη. Στηρίζεται με τους ηβοπροστατικούς συνδέσμους στον άνδρα και με τους ηβοκυστικούς συνδέσμους στη γυναίκα, όπου οι σύνδεσμοι αυτοί αποτελούν παχύνσεις της πυελικής περιτονίας. Καθώς η ουροδόχος κύστη έρχεται σε πληρότητα, η άνω επιφάνειά της ανέρχεται και προβάλλει προς τα επάνω, μέσα στο κύτος της κοιλίας, ενώ η θέση της οπίσθιας επιφάνειας και του αυχένα παραμένει σχετικά αμετάβλητη [1, 2, 5].



**Εικόνα 1.3** Α. Πλάγια άποψη της ουροδόχου κύστης, του προστάτη και της αριστερής σπερματοδόχου κύστης. Β. Οπίσθια άποψη ανδρικής ουροδόχου κύστης (Α: [5], Β: Human Anatomy by Johannes W. Rohen and Chihiro Yokochi, 3rd Edition, 1993).

Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης συγκροτείται από έναν εξωτερικό λεπτό ορογόνο χιτώνα συνδετικού ιστού, έναν μυϊκό χιτώνα και στο εσωτερικό από τον βλεννογόνο που περιλαμβάνει μεταβατικό επιθήλιο (Εικόνα 1.4) [1, 2, 4-6].



**Εικόνα 1.4** Α. Οπίσθια άποψη της ουροδόχου κύστης εξωτερικά. Β. Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού του οργάνου, καθώς και μυών με τους οποίους έρχεται σε επαφή. Γ. Απεικόνιση της χαρακτηριστικής ιστολογικής δομής της ουροδόχου κύστης (Α: [6], Β: <http://mac-healthsciences.wikispaces.com>, Γ: <http://academic.kellogg.edu>).

Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες, οι οποίες διατάσσονται σε τρεις στιβάδες και συστήνουν τον εξωστήρα μυ της κύστης. Στον αυχένα της ουροδόχου κύστης οι κυκλοτερείς λείες μυϊκές ίνες παχύνονται και σχηματίζουν τον έσω σφιγκτήρα της ουρήθρας.

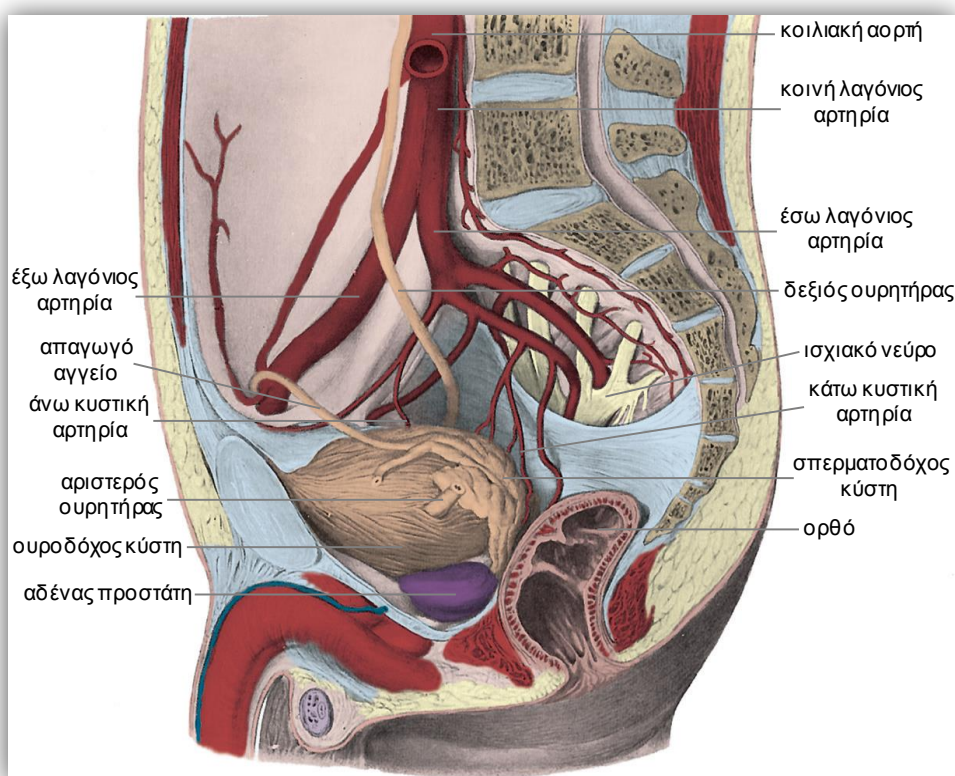
Ο βλεννογόνος του μεγαλύτερου τμήματος της άδειας ουροδόχου κύστης σχηματίζει πτυχές, οι οποίες εξαφανίζονται καθώς η κύστη πληραίνει. Η περιοχή του βλεννογόνου που καλύπτει την έσω επιφάνεια της βάσης της ουροδόχου κύστης αναφέρεται ως κυστικό τρίγωνο. Ο βλεννογόμος του κυστικού τριγώνου είναι πάντοτε λείος, ακόμη και όταν η κύστη είναι άδεια, διότι στην περιοχή αυτή προσφύεται στέρεα στον υποκείμενο μυϊκό χιτώνα. Οι άνω γωνίες του κυστικού τριγώνου αντιστοιχούν προς τα σημεία στα οποία εκβάλλουν οι ουρητήρες, ενώ η κάτω γωνία προς το έσω στόμιο (πόρο) της ουρήθρας. Οι ουρητήρες διαπερνούν το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης λοξά, παρεμποδίζοντας έτσι την παλινδρόμηση των ούρων προς τους νεφρούς καθώς γεμίζει η ουροδόχος κύστη. Το κυστικό τρίγωνο αφορίζεται προς τα άνω από το μυϊκό έπαρμα του βλεννογόνου που εκτείνεται από το

στόμιο του ενός ουρητήρα ως το στόμιο του άλλου, και είναι γνωστό ως ουρητικό όγκωμα. Ακριβώς πίσω από το στόμιο της ουρήθρας εντοπίζεται μία μικρή επιμήκης ακρολοφία, γνωστή και ως κιονίδα της κύστης, η οποία παράγεται από τον υποκείμενο μέσο λοβό του προστάτη [2, 4, 5].

### 1.1.2.2 Αγγείωση, λεμφική παροχέτευση και νεύρωση της ουροδόχου κύστης

Η άνω και κάτω κυστική αρτηρία συνιστούν τις αρτηρίες της ουροδόχου κύστης και αποτελούν κλάδους της έσω λαγόνιας αρτηρίας (**Εικόνα 1.5**). Οι φλέβες της κύστης εκβάλλουν στην έσω λαγόνια φλέβα και σχηματίζουν το κυστικό φλεβώδες πλέγμα, το οποίο προς την κάτω περιοχή επικοινωνεί με το φλεβώδες πλέγμα του προστάτη. Λεμφαγγεία από την ουροδόχο κύστη κατευθύνονται προς τα έσω και έξω λαγόνια λεμφογάγγλια, όπου και παροχετεύουν λέμφο [1, 5].

Οι συμπαθητικές μεταγαγγλιακές ίνες ξεκινούν από το πρώτο και δεύτερο οσφυϊκό γάγγλιο και καταλήγουν στην ουροδόχο κύστη μέσω των κάτω υπογάστριων πλεγμάτων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δρομολόγηση της νεύρωσης της κύστης. Οι παρασυμπαθητικές προγαγγλιακές ίνες εκκινούν ως πυελικά σπλαγχνικά νεύρα από το δεύτερο, τρίτο και τέταρτο ιερό νεύρο, διαπερνούν τα κάτω υπογάστρια πλέγματα και αφικνούνται στο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης, όπου δημιουργούν συνάψεις με μεταγαγγλιακούς νευρώνες. Οι περισσότερες κεντρομόλες αισθητικές ίνες που έχουν ως αφετηρία την ουροδόχο κύστη καταφθάνουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα διαμέσου των πυελικών σπλαγχνικών νεύρων, ενώ η μειοψηφία αυτών εισδύει στο πρώτο και δεύτερο οσφυϊκό νευροτόμιο του νωτιαίου μυελού, μέσω των υπογάστριων πλεγμάτων. Τα συμπαθητικά νεύρα αναστέλλουν τη σύσπαση του εξωστήρα μυ του κυστικού τοιχώματος και διεγείρουν τη σύγκλιση του έσω σφιγκτήρα της κύστης, ενώ, αντιθέτως, τα παρασυμπαθητικά νεύρα προκαλούν τη σύσπαση του εξωστήρα μυ και εμποδίζουν τη σύγκλιση του έσω σφιγκτήρα της κύστης [1, 3-5, 7].



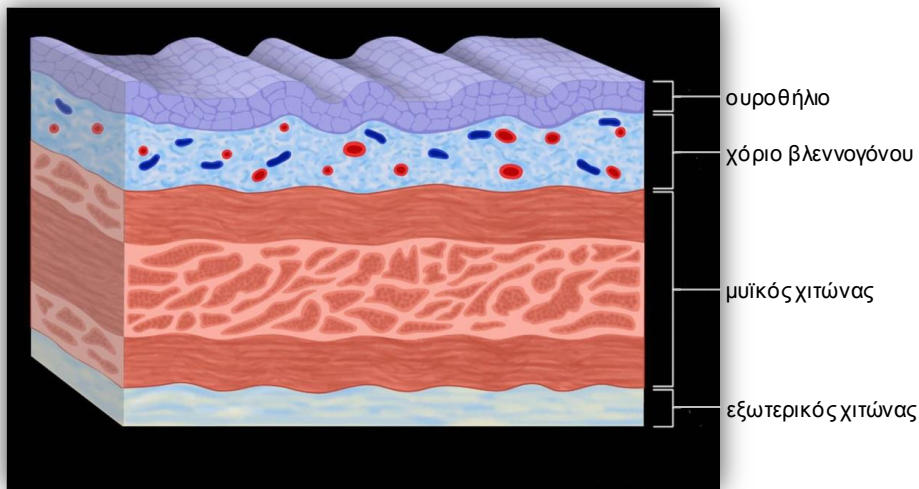
**Εικόνα 1.5** Παράπλευρες κυκλοφορίες της κοιλιακής αορτής . Διακρίνονται η έσω και η έξω λαγόνιος αρτηρία [1, 3].

### 1.1.2.3 Ιστολογική δομή της ουροδόχου κύστης

Η ουροδόχος κύστη εντοπίζεται, όπως και τα υπόλοιπα όργανα του ουροποιητικού συστήματος, στον εξωπεριτοναϊκό χώρο και περιβάλλεται από πυελικό λίπος. Το τοίχωμά της συγκροτείται από τέσσερις στιβάδες, οι οποίες από το εσωτερικό προς το εξωτερικό περιβάλλον κατανέμονται ως εξής: ουροθήλιο (*urothelium*), χόριο του βλεννογόνου (*lamina propria*), μυϊκός χιτώνας (*muscularis propria*) και εξωτερικός χιτώνας (*adventitia*) (**Εικόνα 1.6**) [1, 8-10].

Ο αυλός της ουροδόχου κύστης επενδύεται από ουροθήλιο, το οποίο αποτελείται από δύο έως επτά στρώματα επίπεδων επιθηλιακών κυττάρων. Ο αριθμός των στρωμάτων καθώς και το σχήμα των κυττάρων που απαρτίζουν το κάθε στρώμα βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με τον βαθμό πληρότητας της ουροδόχου κύστης. Μία διατεταμένη κύστη φέρει λιγότερες στιβάδες κυττάρων, περίπου δύο με τρεις, ενώ μία κύστη η οποία βρίσκεται σε συστολή (σε χαλαρή μορφή), οι στιβάδες φτάνουν τις πέντε με επτά. (**Εικόνα 1.7**). Εξαιτίας του ότι η μορφή των κυττάρων

μεταβάλλεται σε σχέση με την διάταση ή συστολή της ουροδόχου κύστης, το ουροθήλιο αναφέρεται και ως μεταβατικό επιθήλιο (*transitional epithelium*) [10, 11].

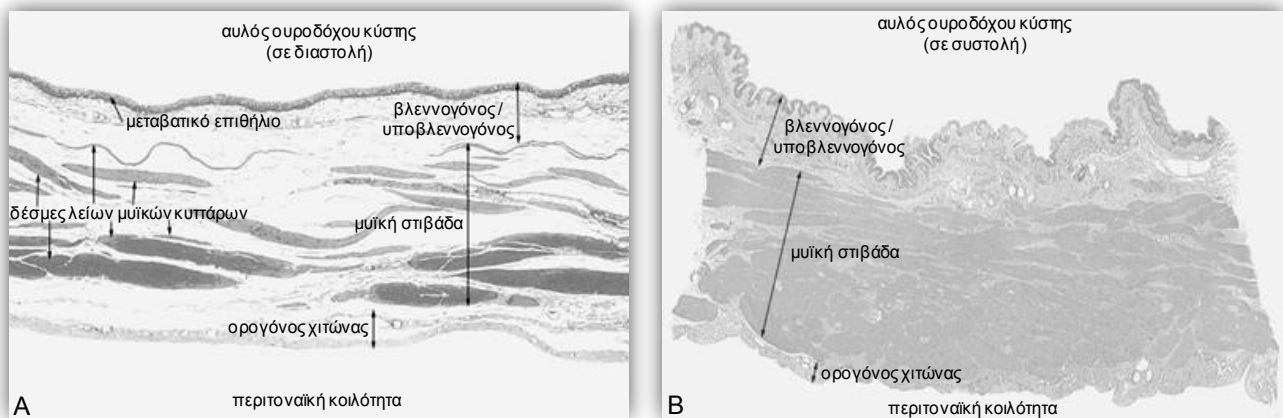


**Εικόνα 1.6** Ιστολογική δομή του φυσιολογικού κυτταρικού τοιχώματος της ουροδόχου κύστης [10].

Το ουροθήλιο απαρτίζεται σε τρεις κυτταρικοί τύποι σε διακριτά στρώματα και αποτελούν μία εξειδικευμένη επένδυση της ουροδόχου κύστης υπεύθυνη για την αποθήκευση των ούρων (βλέπε *Εικόνα 1.21*). Η ιεραρχική οργάνωση των κυττάρων αυτών έγκειται στον βαθμό διαφοροποίησής τους και στη δυναμική του πολλαπλασιασμού τους. Στο βασικό στρώμα (*basal layer*), τα κύτταρα είναι ελαφρώς διαφοροποιημένα, ενώ το μιτωτικό δυναμικό τους είναι αρκετά υψηλό. Έχουν σχήμα σχεδόν κυλινδρικό, ενώ όταν η κύστη διατείνεται το σχήμα τους μετατρέπεται σε πιο επιπεδωμένο (πλακώδες). Το μονό αυτό στρώμα κυττάρων έρχεται σε επαφή με την βασική μεμβράνη, μία λεπτή ζώνη εξωκυττάριας ουσίας που χρησιμεύει για αλληλεπιδράσεις των επιθηλιακών κυττάρων του στρώματος (*stroma*). Η βασική αλληλεπίδραση διευκολύνεται από τους υποδοχείς λαμινίνης (*laminin*), ιντεγκρίνης (*integrin*) και υαλουρονικού οξέος (*CD44*), που εκφράζονται από τα κύτταρα του βασικού στρώματος, τα οποία και προκαλούν τη δημιουργία ενός παρακείμενου πολυκυτταρικού στρώματος που συγκροτείται από ενδιάμεσα κύτταρα (*intermediate cells*). Η κινητική τους προσομοιάζει με αυτή των παροδικά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, καθώς ένα μεγάλο ποσοστό εξ αυτών εμφανίζει πολλαπλασιαστική ικανότητα, όμως για μερικούς μόνο κύκλους. Τα ενδιάμεσα κύτταρα ανιχνεύονται με ποικίλη έκφραση του CD44 υποδοχέα, χαμηλή έως καθόλου έκφραση της κερατίνης 5 και 17, και υψηλά επίπεδα της κυτοκερατίνης 18. Το σχήμα τους χαρακτηρίζεται

κυβοειδές προς χαμηλό κινοειδές με σαφή προσδιορισμένα όρια. Δίνουν γένεση σε μία επικείμενη μονή στιβάδα πλήρως διαφοροποιημένων επιφανειακών κυττάρων, τα οποία ονομάζονται κύτταρα ομπρέλας (*umbrella cells*). Τα κύτταρα αυτά έχουν μεγάλο μέγεθος και ελλειπτικό σχήμα, είναι αρκετά εύκαμπτα, ενώ περιέχουν ευμεγέθεις πυρήνες, ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και εναποθέσεις μικρών ποσοτήτων ουδέτερης βλέννης. Η ικανότητά τους για διαιρέσεις εμφανίζεται αρκετά περιορισμένη, ενώ σχηματίζουν ένα ελαστικό προστατευτικό φράγμα, το οποίο προφυλάσσει τους υποκείμενους ιστούς από τα συστατικά των ούρων, αλλά και εμποδίζει τις διαλυμένες ουσίες που βρίσκονται στα ούρα να εισέλθουν πίσω στο κυκλοφορικό σύστημα. Η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων του ουροθηλίου σε κύτταρα ομπρέλας χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών τύπου ουροπλακίνης (*uroplakin proteins*) και κερατίνης 20 [11-19].

Η δεύτερη στιβάδα του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης, η οποία εντοπίζεται ακριβώς κάτω από το ουροθήλιο (μεταβατικό επιθήλιο), χαρακτηρίζεται ως χόριο του βλεννογόνου ή βλεννογόνος χιτώνας. Περιλαμβάνει χαλαρό έως και πυκνό συνδετικό ιστό και είναι αγγειοβριθής [2, 8-11].



**Εικόνα 1.7** Κυτταροχημική παρατήρηση της δομής του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης όταν είναι σε διατεταμένη (διαστολή) (A) και σε χαλαρή (συστολή) (B) μορφή.

Εξωτερικά του βλεννογόνου συναντάται η τρίτη στιβάδα, η μυϊκή σπιβάδα, η οποία συνίσταται από δέσμες λείων μυϊκών κυττάρων. Λείες μυϊκές ίνες συνενώνονται και συγκροτούν ένα πολύπλοκο δίκτυο, τον εξωστήρα μυ. Οι εσωτερικές και εξωτερικές μυϊκές ίνες τείνουν στο να προσανατολίζονται με τρόπο επιμήκη, αν και διακριτά στρώματα αυτών δεν είναι συνήθως ευκρινή. Οι ίνες του

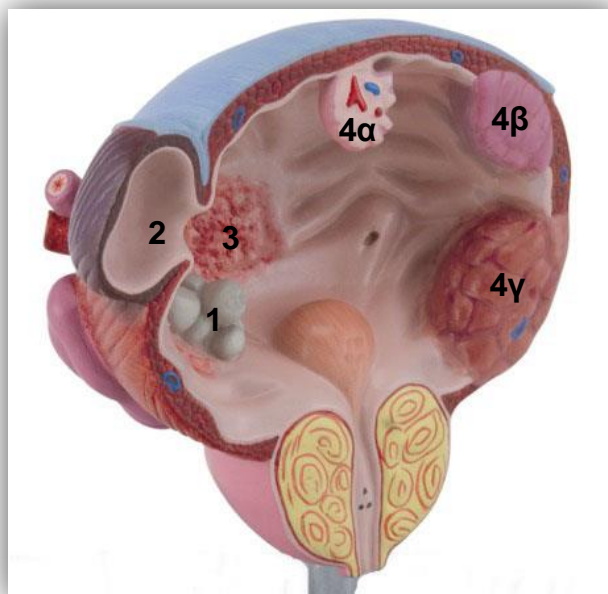
εξωστήρα μυ έρχονται σε επαφή με τον πρόσθιο κόλπο (στις γυναίκες) ή την κάψουλα του προστάτη (στους άνδρες) και με τους μύες του πυελικού εδάφους [5, 10, 11].

Η τέταρτη στιβάδα διαμορφώνει τον εξωτερικό χιτώνα και δομείται από συνδετικό ιστό. Ο ορογόνος χιτώνας, ο οποίος σχηματίζεται από το περιτόναιο, είναι παρόν μόνο πάνω από το θόλο της ουροδόχου κύστης [5, 10].

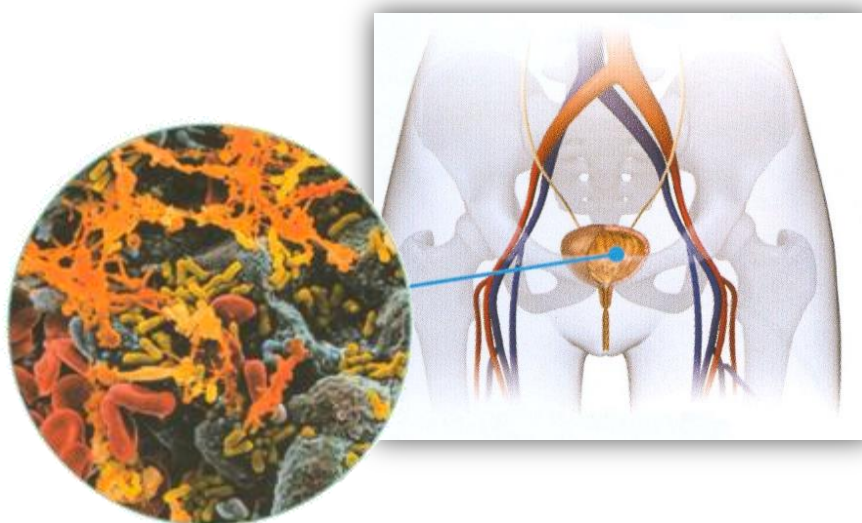
#### 1.1.2.4 Παθήσεις της ουροδόχου κύστης

Οι βασικότερες παθήσεις της ουροδόχου κύστης είναι οι εξής [1, 6, 10, 20]:

- Κακώσεις της ουροδόχου κύστης. Παρά το γεγονός ότι η κύστη είναι προφυλαγμένη από τα οστά της πυέλου, μπορεί να τραυματιστεί με διαττραίνον όργανο διαμέσου των κοιλιακών τοιχωμάτων, ή έπειτα από σύνθλιψη της με τα οστά της πυέλου.
- Συγγενείς (ανατομικές) ανωμαλίες της ουροδόχου κύστης. Οι πιο σοβαρές ανωμαλίες είναι η εκτροφή της κύστης, το εκκόλπωμα (*diverticulum*) (**Εικόνα 1.8**), οι ανωμαλίες ουραχού και η στένωση κυστικού αυχένα.
- Λοιμώξεις και φλεγμονές. Διάφοροι λοιμογόνιοι παράγοντες είναι πιθανό να εισέλθουν στο σώμα μέσω της ουρήθρας και να εξαπλωθούν στην κύστη. Η πιο συχνή ουρολοίμωξη είναι η φλεγμονή της ουροδόχου κύστης, γνωστή και ως κυστίτιδα, η οποία εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στον γυναικείο πληθυσμό (**Εικόνες 1.8 και 1.9**).
- Διαταραχές στην ούρηση. Τις κυριότερες αποτελούν η συχνουρία, η ακράτεια ούρων, η δυσουρία και η επίσχεση ούρων.
- Λιθίαση της ουροδόχου κύστης. Οι λίθοι μπορεί να είναι «ετερόχθονες», που κατέβηκαν δηλαδή από το νεφρό και δεν έγινε δυνατή η αποβολή τους, ή «αυτόχθονες», οι οποίοι δημιουργήθηκαν στην κύστη λόγω στάσης ούρων (**Εικόνα 1.8**).
- Καρκίνος της ουροδόχου κύστης (*βλέπε Κεφάλαιο 1.2*) (**Εικόνα 1.8**).



**Εικόνα 1.8** Απεικόνιση μερικών εκ των σημαντικότερων παθήσεων της ουροδόχου κύστης. 1: λιθίαση, 2: εκκόλπωμα, 3: κυστίτιδα, 4: διαφόρων σταδίων κακοήθειες [<http://www.indso.co.uk/anatomy/urinary.htm>].



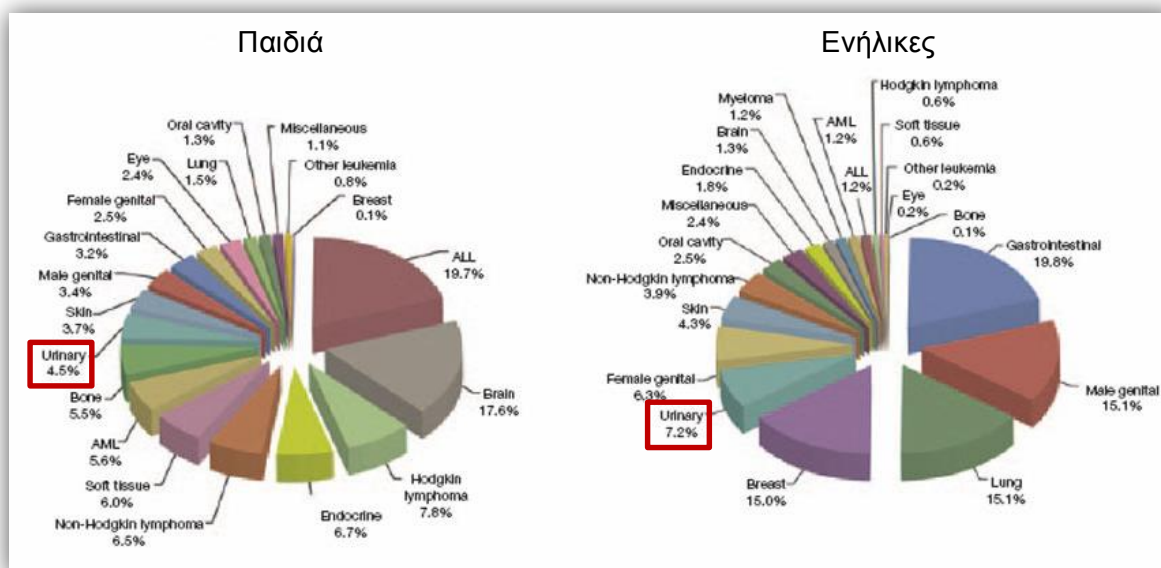
**Εικόνα 1.9** Μικροσκοπική απεικόνιση του κυστικού επιθηλίου έπειτα από εμφάνιση κυστίτιδας. Τα βακτήρια (κίτρινα ραβδία) αποικίζουν την έσω επιφάνεια του επιθηλίου (μπλε χρώμα) και προκαλούν φλεγμονή. Τα κύτταρα του επιθηλίου εκκρίνουν βλέννη (πορτοκαλί) και η προσβολή τους μπορεί να οδηγήσει στην εκροή αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια) που χρωματίζει τα ούρα (κόκκινα) [6].



## 1.2 Καρκίνος της ουροδόχου κύστης

### 1.2.1 Επιδημιολογία

Οι κακοήθειες του ουροποιητικού συστήματος καταλαμβάνουν το 7,2% του συνόλου των κακοηθειών στους ενήλικες και το 4,5% στα παιδιά (Εικόνα 1.10) [21, 22].



**Εικόνα 1.10** Συχνότητα διάγνωσης καρκίνου σε παιδιά (αριστερά) και ενήλικες (δεξιά) σύμφωνα με μελέτη που διεξήγαγε το 2012 ο οργανισμός Εποπτείας, Επιδημιολογίας και Τελικών Αποτελεσμάτων SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*). Κάθε διάγραμμα οργανώνεται δεξιόστροφα, από τον πιο συνήθη τύπο καρκίνου στον λιγότερο συχνό [21].

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί την πιο συχνή μορφή κακοήθειας του ουροποιητικού συστήματος, την δεύτερη σε συχνότητα κακοήθεια του ουρογεννητικού συστήματος (μετά τον καρκίνο του προστάτη), ενώ είναι ο πέμπτος πιο «δημοφιλής» και συνήθως διαγνωσμένος μη-δερματικός συμπαγής όγκος [1, 23, 24]. Αντιπροσωπεύει την τέταρτη πιο συχνή μορφή κακοήθειας στους άνδρες και την ένατη στις γυναίκες, ενώ ο λόγος που αφορά στη σχέση εμφάνισης του συγκεκριμένου καρκίνου μεταξύ ανδρών και γυναικών προσδιορίζεται περίπου στην πληθυσμιακή αναλογία 3:1 [25-27]. Εντούτοις, στο γυναικείο φύλο διαγιγνώσκεται σε πιο προχωρημένο στάδιο και έχει υψηλότερο βαθμό θνησιμότητας σε σχέση με το αντρικό, ενώ το ποσοστό επιβίωσης των γυναικών ασθενών σε χρονικό ορίζοντα

πέντε ετών είναι παρόμοιο με αυτό των αντρών (78%) σε χρονική όμως διάρκεια δέκα ετών [10]. Το 2012, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής εκτιμήθηκαν περί των 74.000 περιστατικών ανθρώπων που νοσούν και 15.000 θανάτων που οφείλονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης [28]. Το 80% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης απαντάται μεταξύ 50 και 80 ετών, ενώ η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου υπολογίζεται γύρω στα 68 έτη της ενήλικης ζωής ενός κατά τα άλλα υγιούς ανθρώπου [10, 20, 29, 30].

Ο επιπολασμός της νόσου είναι έξι φορές υψηλότερος στις αναπτυγμένες χώρες και, εφόσον χαρακτηρίζεται από συχνές υποτροπές, αντιπροσωπεύει μία από τις πλέον πολυδάπανες κακοήθειες στα συστήματα υγείας, εξαιτίας των απαιτήσεων για εντατική επίβλεψη με κυστεοσκόπια και κυτταρολογικές εξετάσεις, καθώς και με συχνές χειρουργικές αφαιρέσεις των υπό διερεύνηση όγκων [23, 31].

### 1.2.2 Παράγοντες κινδύνου

Πλειάδα παραγόντων έχει συσχετιστεί άμεσα ή έμμεσα, περισσότερο ή λιγότερο, με την εμφάνιση και εκδήλωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Οι βασικότεροι εξ αυτών παρατίθενται και αναλύονται ακολούθως (πέραν της ηλικίας και του φύλου που ήδη αναφέρθηκαν ότι συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου) [20, 32-34]:

- **Επαγγελματικός κίνδυνος.** Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης κατέχει την δεύτερη υψηλότερη θέση ανάμεσα σε όλους τους επαγγελματικούς καρκίνους. Θεωρείται ότι το 20% των περιπτώσεων της εν λόγω κακοήθειας προέρχεται από την έκθεση σε διάφορες χημικές ενώσεις που θεωρούνται καρκινογόνες, όπως είναι οι ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία χρωμάτων, χημικών ουσιών, υφασμάτων, πλαστικών, ελαστικών, μετάλλων, επεξεργασίας δερμάτων και ασφάλτου [32]. Οι περισσότερες από αυτές τις χημικές ουσίες που είναι κυρίως αρωματικές αμίνες (όπως η β-ναφθυλαμίνη και η βενζιδίνη) και ειδικότερα οι ορθο-υδροξυλιωμένες αρωματικές αμίνες εμφανίζουν ισχυρή καρκινογενετική δράση στο ανθρώπινο ουροθήλιο. Επιπροσθέτως, έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν παραπροϊόντα διαδικασιών καύσης, και ως εκ τούτου εμφανίζονται σε ποικίλες εργοστασιακές μονάδες, φαίνεται να

διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην εκδήλωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Τον Ιούνιο του έτους 2012, ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο (*IARC*) κατέταξε τα καυσαέρια που προέρχονται από μηχανές εσωτερικής καύσης ως έναν αυξημένο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της συγκεκριμένης κακοήθειας. Το χρονικό διάστημα που συνήθως μεσολαβεί από την έκθεση στους προ-αναφερόμενους επαγγελματικούς παράγοντες και στην κλινική εκδήλωση συμπτωμάτων κυμαίνεται μεταξύ τριάντα και πενήντα ετών [26].

- **Κάπνισμα.** Επιβλαβείς εκκρινόμενες χημικές ουσίες συσσωρεύονται στα ούρα και συνεπώς αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Τα κάπνισμα έχει αποδειχθεί πως αποτελεί την πλέον σημαντική περιβαλλοντική αιτία εκδήλωσης της νόσου, καθώς εκτιμάται ότι ευθύνεται για το ένα τρίτο περίπου όλων των περιπτώσεων του εν λόγω καρκίνου. Οι καπνιστές διατρέχουν τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο από τους μη-καπνιστές, ενώ οι πρώην καπνιστές δύο φορές περισσότερο. Υπάρχει, επίσης, πολύ στενή σχέση ανάμεσα στην ποσότητα και στην χρονική διάρκεια του καπνίσματος με την εμφάνιση της κακοήθειας. Η διακοπή του καπνίσματος ελαττώνει σημαντικά τον κίνδυνο έως και 40% μετά το πέρας τεσσάρων ετών, εξαίροντας έτσι τη σπουδαιότητα μίας σωστής καθοδήγησης και συμβουλευτικής από τους θεράποντες ιατρούς. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίον το κάπνισμα προξενεί καρκίνο στην ουροδόχο κύστη δεν είναι γνωστός, αλλά ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις αρωματικές αμίνες, που εκτός από τις ουσίες βιομηχανιών, εντοπίζονται και στον καπνό του τσιγάρου. Ένας πιθανός τρόπος με τον οποίον οι αμίνες προκαλούν καρκινογένεση είναι διαμέσου των DNA συμπλόκων που οδηγούν σε μεταλλαγές τύπου μετάπτωσης [32, 35]. Ένζυμα που μετέχουν στον σχηματισμό των συμπλόκων αυτών είναι το κυτόχρωμα p450 1A2 (*CYP1A2*), η N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (*NAT2*) και η γλουταθειόνη-S-τρανφεράση M1 (*GSTM1*) [20, 30, 32, 36-38]. Οι καπνιστές, των οποίων τα ένζυμα παρουσιάζουν ταχύ ρυθμό ακετυλίωσης, έχουν μικρότερες πιθανότητες να εκδηλώσουν την ασθένεια σε σύγκριση με αυτούς με αργό ρυθμό, και αυτό αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα μίας ασθένειας που προκαλείται από γενετική προδιάθεση (ικανότητα ακετυλίωσης) ενός περιβαλλοντικού ερεθίσματος.

- Φαρμακευτικές ουσίες. Η φαινακετίνη (*phenacetin*) είναι μία ουσία που εχρησιμοποιείτο ως αναλγητικό. Μελέτες όμως έδειξαν ότι η φαινακετίνη, ή προϊόντα που την περιέχουν, παρουσιάζουν παρενέργειες και εμπλέκονται στη δημιουργία ανάπτυξης ουροθηλιακού καρκινώματος. Η κυκλοφωσφαμίδη (*cyclophosphamide*) αν και αποτελεί συστατικό πολλών χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, δείχνει να αυξάνει έως και εννέα φορές τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ουροδόχου κύστης όταν λαμβάνεται σε υψηλές δόσεις [32, 39]. Οι περισσότεροι από αυτούς τους όγκους αφορούν στο μεταβατικό επιθήλιο, είναι υψηλής κακοήθειας και αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς [32, 40]. Η ακρολεΐνη, μεταβολικό προϊόν της κυκλοφωσφαμίδης, αποτελεί και αυτή καρκινογενή ένωση και ευθύνεται για τον σχηματισμό όγκων στην ουροδόχο κύστη [32, 41]. Η χλωρναφαζίνη (*chlornaphazine*), ένας αντι-νεοπλαστικός παράγοντας και παράγωγο της 2-ναφθυλαμίνης, συνιστά έναν αζωθυπερίτη που η εκτεταμένη χρήση του συμβάλλει στον σχηματισμό του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.
- Μικροβιακές λοιμώξεις. Ο συγκεκριμένος καρκίνος είναι ο πρώτος με τεκμηριωμένη λοιμώδη αιτιολογία. Το παράσιτο *Schistosoma haematobium*, το οποίο ενδημεί σε περιοχές της Αφρικής (κυρίως στην Αίγυπτο) και στην Μέση Ανατολή και προκαλεί την Σχιστοσωμίαση, συνδέεται με την κακοήθεια της ουροδόχου κύστης μέσω της πρόκλησης χρόνιας φλεγμονής και της παρεμβολής του στο μεταβολισμό μεταλλαξογόνων παραγόντων (όπως αυτών που συσχετίζονται με το κάπνισμα). Μόνο για το έτος 2002 ήταν η αιτία για 10.600 περιπτώσεις εκδήλωσης της εν λόγω κακοήθειας ανά τον κόσμο [42]. Οι περισσότεροι καρκίνοι που προκαλούνται από την Σχιστοσωμίαση προέρχονται από πλακώδη κύτταρα και εμφανίζονται στους νεότερους ηλικιακά ασθενείς [20, 26, 32, 43-45].
- Χρόνιος ερεθισμός της κύστης. Ο χρόνιος ερεθισμός της ουροδόχου κύστης από την τοποθέτηση ουροκαθετήρα δύναται να προκαλέσει χρόνια κυστίτιδα και συνεπώς φλεγμονή της κύστης, γεγονός το οποίο αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης πλακώδους καρκινώματος στο όργανο αυτό. Στην εξέλιξη αυτή εμπλέκονται νιτρικά οξέα και νιτρώδεις ενώσεις (*NNOs*), των οποίων τα επίπεδα είναι ιδιαίτερα αυξημένα στην χρόνια κυστίτιδα και τα οποία συνιστούν καρκινογόνες ουσίες καθώς έχουν τη δυνατότητα να αλκυλιώνουν

ισχυρά αλληλουχίες του DNA [32, 46, 47]. Ερεθισμός της κύστης μπορεί να επιτευχθεί και από την ύπαρξη σε αυτή πετρών (λιθίαση) δημιουργώντας ακολούθως έναν ακόμη κίνδυνο εμφάνισης πλακώδους καρκινώματος στην ουροδόχο κύστη [10, 26, 48, 49].

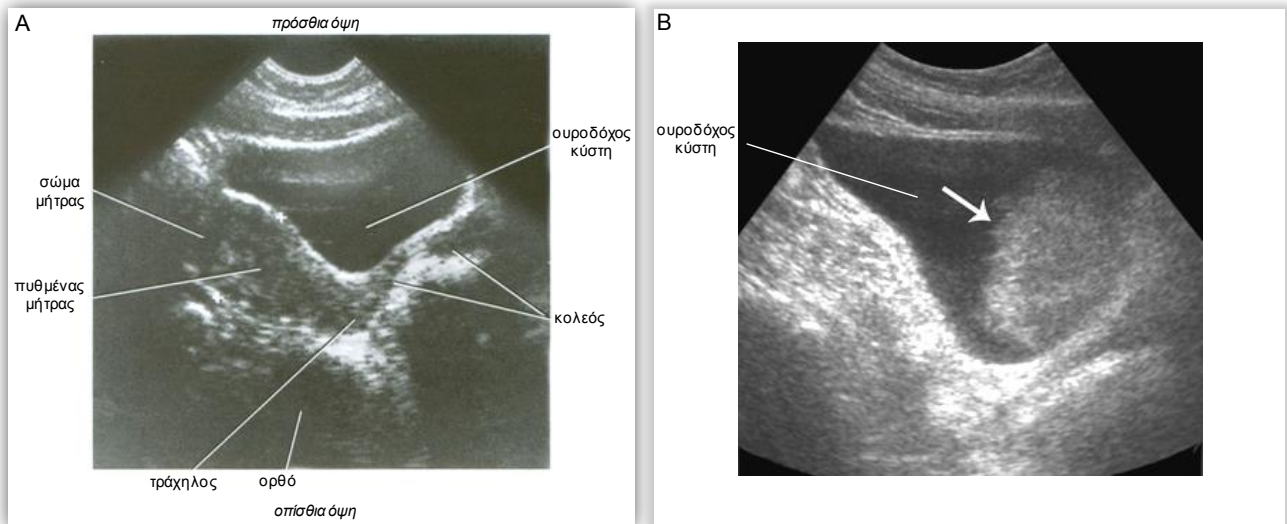
- Ακτινοθεραπείες. Έκθεση ανδρών και γυναικών σε ακτινοβολία στην περιοχή της πυέλου, για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη ή του τραχήλου της μήτρας, αντίστοιχα, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της κύστης [26, 32, 50-52].
- Διατροφή. Η συχνή κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων κόκκινου κρέατος, οινόπνεύματος, γλυκαντικών ουσιών και καφέ ενοχοποιείται για την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστης (χωρίς ακόμη απόδειξη σχέσης αιτίας – αιτιατού). Η ευρεία, όμως, κατανάλωση λαχανικών, φρούτων και τροφών που περιέχουν βιταμίνες Α και C, καθώς και η πόση μεγάλων ποσοτήτων νερού, ενδεχομένως να μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης της κακοήθειας [10, 20, 53]. Αντιθέτως, υψηλά επίπεδα αρσενικού στο νερό, τα οποία έχουν στο παρελθόν σημειωθεί σε περιοχές της Ταϊβάν, της Αργεντινής, της Χιλής και του Μπανγκλαντές, φαίνεται να συσχετίζονται με τον βαθμό εκδήλωσης της νόσου [20, 26, 54-57].

### 1.2.3 Κατηγοριοποίηση και σταδιοποίηση κακοήθων νεοπλασμάτων ουροδόχου κύστης

Οι νεοπλασίες της ουροδόχου κύστης μπορούν να προέλθουν από οποιοδήποτε στρώμα αυτής, με την πλειοψηφία (πάνω από 95%) να προκύπτει από το επιθήλιο. Το 90% των καρκίνων της ουροδόχου κύστης εντοπίζεται στο μεταβατικό επιθήλιο (*TCC: Transitional Cell Carcinoma, or Urothelial Carcinoma*) (**Εικόνα 1.11**), ενώ τα υπόλοιπα κακοήθη περιστατικά ανιχνεύονται ως καρκινώματα των πλακωδών (φολιδωτών) κυττάρων (*SCC: Squamous Cell Carcinoma*) σε ποσοστό 5%, καθώς και ως αδenoκαρκινώματα (*ADC: Adenocarcinoma*) σε ποσοστό μικρότερο του 2% [1, 20, 23, 25, 29, 58, 59].

Το καρκίνωμα από πλακώδη κύτταρα (*SCC*) σχετίζεται συνήθως με τον χρόνιο ερεθισμό της κύστης που μπορεί να προκληθεί από μακροχρόνια παρουσία μόνιμου καθετήρα ή λίθου στην κύστη, ενώ επίσης, έχει συνδεθεί και με την

εκδήλωση Σχιστοσωμίας. Σχεδόν όλα τα καρκινώματα από πλακώδη κύτταρα είναι διηθητικά. Τα αδενοκαρκινώματα (ADC) εμφανίζονται επί εδάφους φλεγμονών και παρουσίας αδενικών στοιχείων στην ουροδόχο κύστη. Αυτά που παρατηρούνται στον θόλο της κύστης οφείλονται σε εμβρυολογικά κατάλοιπα αδενικών κυττάρων που παραμένουν μετά την φυσιολογική εξαφάνιση του ουραχού -μία χορδή που συνδέει την κύστη με τον ομφαλό. Παρουσιάζονται συνήθως σε νεαρότερους ασθενείς, ενώ σχεδόν όλα τα αδενοκαρκινώματα είναι διηθητικά [1, 10, 20, 60].



**Εικόνα 1.11** Α. Υπερηχογράφημα (επιμήκης τομή) γυναικείας πυέλου. Β. Επιμήκης υπερηχοτομογραφία της ουροδόχου κύστης. Διαφαίνεται στο εσωτερικό της κύστης ευμέγεθες «υπο-ηχητικό» καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου (άσπρο βέλος) (Α: [5], Β:[10]).

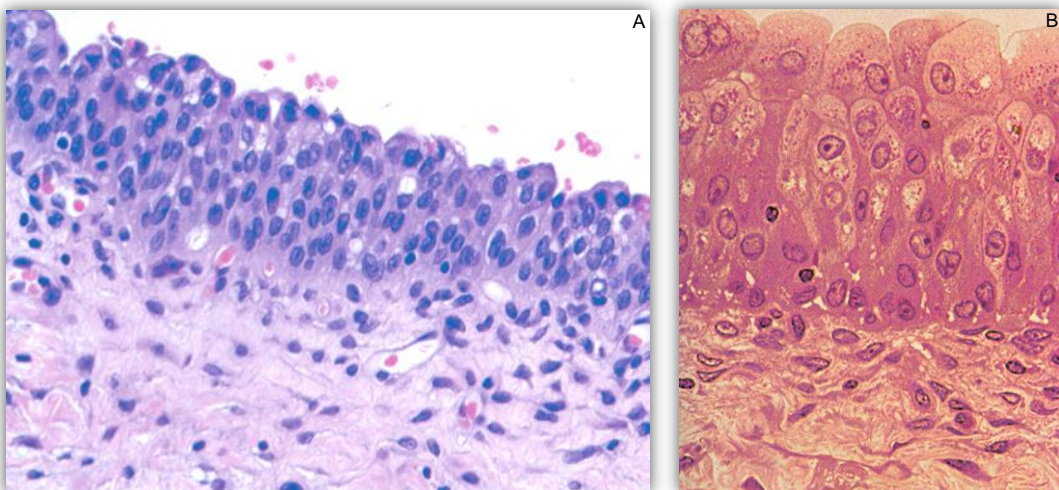
Το 80% των καρκίνων του μεταβατικού επιθηλίου (*TCC*) είναι διηθητικοί, αλλά όχι στην μυϊκή στιβάδα (*non-muscle invasive*). Υπάρχουν ποικίλα πρότυπα ανάπτυξης του καρκίνου του ουροθηλίου (μεταβατικού επιθηλίου) και συμπεριλαμβάνουν:

- Τα επί-τόπου επίπεδα καρκινώματα (*flat carcinoma in situ, Cis*). Χαρακτηρίζονται ως μη-θηλωματώδεις, επίπεδοι και υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκοι, όπου στο επιφανειακό επιθήλιο εντοπίζονται καρκινικά κύτταρα. Εκδηλώνεται ισχυρή πυρηνική ατυπία, απώλεια κυτταρικής πολικότητας και μη-συνεκτικές κυτταρικές δομές. Τα κύτταρα είναι μεγάλα, πλειομορφικά, με ανώμαλες μιτωτικές μορφές και με συμπαγή χρωματίνη, ενώ έχουν καταστραφεί τα κύτταρα ομπρέλας. Δεν είναι

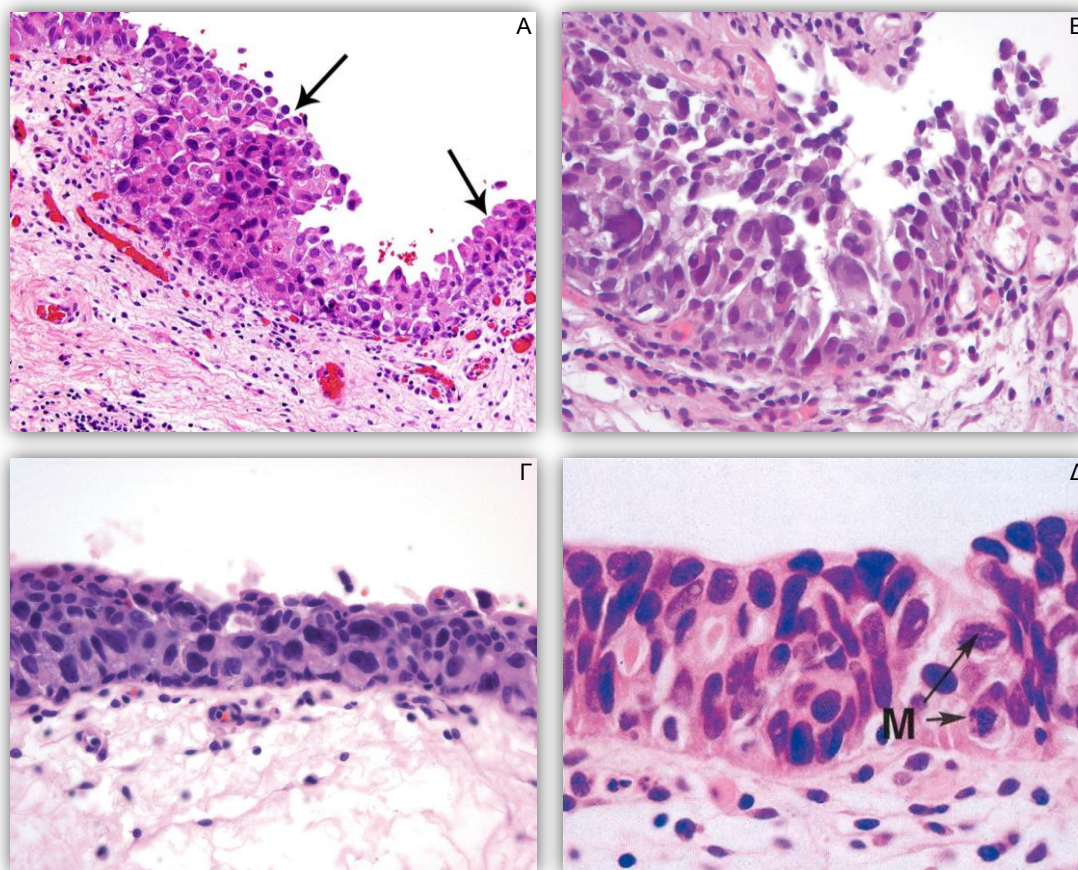
διηθητικοί, αλλά θεωρούνται πρόδρομοι της ανάπτυξης υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνου της κύστης (**Εικόνες 1.12, 1.13 και 1.21**) [1, 10, 11, 61].

- Την θηλωματώδη νεοπλασία του ουροθηλίου χαμηλού δυναμικού κακοήθειας (*Papillary Urothelial Neoplasia of Low-Malignant Potential, PUNLMP*). Συνιστά ένα χαμηλού βαθμού κακοήθειας νεόπλασμα, το οποίο δεν παρουσιάζει διηθητικό και μεταστατικό χαρακτήρα. Το ουροθήλιο εμφανίζεται πιο παχύ, αλλά τα κύτταρα και οι πυρήνες του διατηρούν την φυσιολογική μορφολογία τους (**Εικόνα 1.14**) [1, 10, 61].
- Τους θηλωματώδεις όγκους (*papillary tumors*), οι οποίοι μπορεί να είναι υψηλού ή χαμηλού βαθμού κακοήθειας (**Εικόνα 1.15**) [1, 61].
- Τους «άμισχους» καρκίνους (*sessile tumors*), οι οποίοι είθισται να διαρθρώνονται σε συμπαγείς όγκους [1, 61].

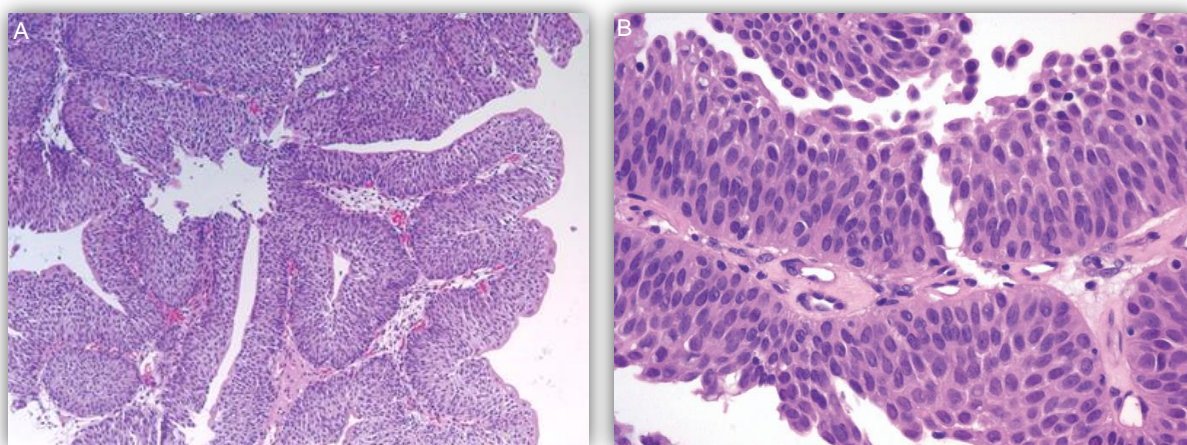
Οι καρκίνοι οι οποίοι δεν διηθούν την μυϊκή στιβάδα μπορούν να γίνουν πολύ μεγάλοι, εξαιτίας της έλλειψης εκείνων των μεταλλαγών που απαιτούνται για εκτεταμένη διήθηση. Ως εκ τούτου, οι διηθητικοί όγκοι εμφανίζονται αρκετά μικροί, υπό την προϋπόθεση ύπαρξης πρώιμων γονιδιακών αλλαγών εντός του κυττάρου, υιοθετώντας έτσι έναν ισχυρό επεκτατικό φαινότυπο [1, 26, 60].



**Εικόνα 1.12** Φυσιολογικό ουροθήλιο (μεταβατικό επιθήλιο) της ουροδόχου κύστης (A: [1], B: [8]).



**Εικόνα 1.13** Ουροθηλιακό καρκίνωμα *in situ* (Cis), έπειτα από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Επισημαίνεται η αντικατάσταση του φυσιολογικού ουροθηλίου από ακανόνιστα κύτταρα (μαύρα βέλη στο Α), με αξιοπρόσεκτη πυρηνική αναπλασία και απώλεια της κυτταρικής πολικότητας. Δεν εμφανίζεται διήθηση στην υποκείμενη στιβάδα του βλενογόνου. Ενδεικνύονται χαρακτηριστικά οι μιτώσεις (M) (Α: [10], Β και Γ: [1], Δ: [9]).



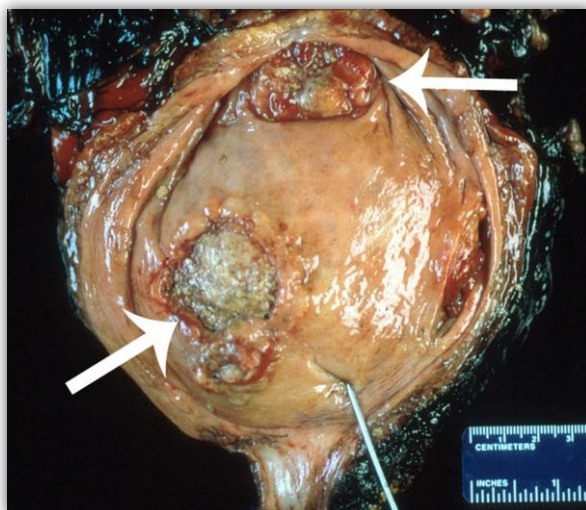


**Εικόνα 1.14** Θηλωματώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (*PUNLMP*), όπως αποτυπώνεται με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Το ουροθήλιο εμφανίζεται πιο παχύ, αλλά τα κύτταρα και οι πυρήνες διατηρούν φυσιολογική τη μορφολογία τους [1].



**Εικόνα 1.15** Θηλωματώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα στον αυλό της ουροδόχου κύστης. Φωτογραφία από κυστεοσκόπιο [9].

Το καρκίνωμα του ουροθηλίου τείνει να εμφανίζεται πολυκεντρικό, με ταυτόχρονους ή υστερόχρονους καρκίνους της ουροδόχου κύστης και του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος. (**Εικόνα 1.16**) [10].



**Εικόνα 1.16** Ουροδόχος κύστη με πολλαπλούς ταυτόχρονους όγκους (άσπρα βέλη) [10].

Εάν μία βιοψία κύστεως επιβεβαιώσει την παρουσία ουροθηλιακού καρκίνου, το επόμενο βήμα είναι ο καθορισμός του βαθμού επιθετικότητας ή κακοήθειας αυτού. Εκτιμάται, δηλαδή, το πόσο γρήγορα επεκτείνεται ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, με αργό (σε χρόνια) ή ταχύ (σε μήνες) ρυθμό. Πραγματοποιείται μελέτη των ληφθέντων ιστοτεμαχίων στο μικροσκόπιο και σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης. Όσο περισσότερο διαφέρει ένα καρκινικό κύτταρο από το φυσιολογικό, τόσο περισσότερο κακοήθης και επιθετικός είναι ο καρκίνος, και τόσο πιο γρήγορα μπορεί να εξαπλωθεί και να επιφέρει μεταστάσεις. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να διαφέρουν στο σχήμα, στο μέγεθος και στην εσωτερική μορφή (πυρήνα, πυρηνίσκο και κυτταρόπλασμα). Μερικά μπορεί να είναι επιθετικά, άλλα όμως όχι. Με παθολογο-ανατομική εξέταση καθορίζονται οι περιοχές που περιέχουν καρκινικά κύτταρα και ελέγχονται οι πιο επιθετικές μορφές καρκινικών κυττάρων, οι οποίες προσδιορίζουν και τον βαθμό κακοήθειας (*grade*).

Οι βαθμοί κακοήθειας, στηριζόμενοι στο μέγεθος της διαφοροποίησης, της επιθετικότητας και μεταστατικότητας των κυττάρων, κατηγοριοποιούνται ως εξής [1, 10, 20, 26, 29, 61, 62]:

- 
- ▶ Βαθμός κακοήθειας I (*Grade I*): Υψηλής διαφοροποίησης κύτταρα, ομοιάζουν με τα φυσιολογικά της ουροδόχου κύστης και δεν εμφανίζουν μεταστατικότητα.
  - ▶ Βαθμός κακοήθειας II (*Grade II*): Μέτριας διαφοροποίησης κύτταρα, που παρουσιάζουν ενδιάμεση επιθετικότητα και κακοήθεια.
  - ▶ Βαθμός κακοήθειας III (*Grade III*): Χαμηλής διαφοροποίησης κύτταρα, λίαν επιθετικά και διηθητικά.
  - ▶ Βαθμός κακοήθειας IV (*Grade IV*): Αδιαφοροποίητα κύτταρα, ιδιαίτερος επιθετικά και με συχνές μεταστάσεις. Έχουν αποβάλλει πλήρως τις ιδιότητες των φυσιολογικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης.
- 

Ο βαθμός κακοήθειας έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς σχετίζεται με την επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής αγωγής και την επιβίωση του ασθενή, αλλά και με τη συχνότητα εξέλιξης της νόσου σε διηθητικό καρκίνωμα. Σε όγκους χαμηλής κακοήθειας (*grade I*), η δεκαετής επιβίωση φθάνει μέχρι και 98%, σε αντίθεση με το 35% επιβίωσης που παρατηρείται σε όγκους υψηλής κακοήθειας (*grade III*).

Η σταδιοποίηση (*staging*) του όγκου είναι ιδιαίτερα σημαντική και καθοριστική για την περιγραφή της έκτασης της κακοήθειας και συνιστά έναν ισχυρό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο. Η ταξινόμηση αυτή στηρίζεται στο σύστημα της Αμερικανικής Κοινής Επιτροπής για τον Καρκίνο (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*) σε συνεργασία με την Ένωση για τον Έλεγχο του Καρκίνου Διεθνώς (*Union for International Cancer Control, UICC*), όπως δημοσιοποιήθηκε το έτος 2009. Αποτελεί μία προσπάθεια προσδιορισμού και κατηγοριοποίησης των όγκων (*tumors*), των λεμφαδένων (*nodes*) και των μεταστάσεων (*metastases*). Ως εκ τούτου, το εν λόγω σύστημα είναι ευρέως γνωστό και ως TNM σύστημα και συνοψίζεται στον κάτωθι πίνακα (**Πίνακας 1.1**) (**Εικόνα 1.17**) [1, 10, 20, 26, 29, 61-63].

**Πίνακας 1.1** Σταδιοποίηση του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστης μέσω του συστήματος TNM [1, 64].

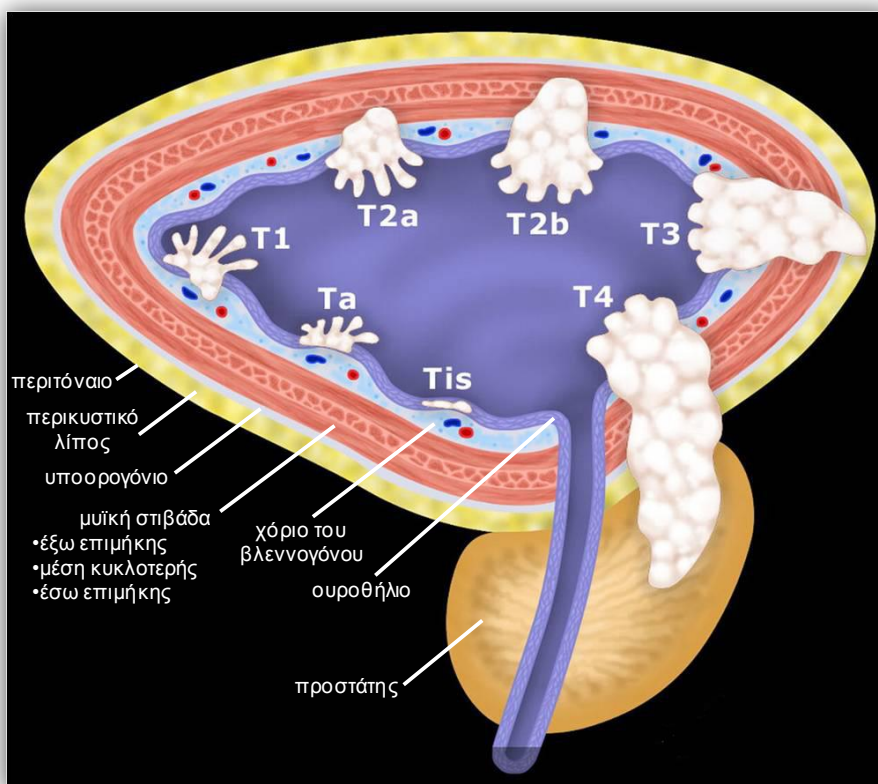
Πρωτογενής όγκος ( <i>Primary Tumor, T</i> )	
<b>TX</b>	Πρωτογενής όγκος που δεν μπορεί να εκτιμηθεί
<b>T0</b>	Καμία ένδειξη πρωτογενούς όγκου
<b>Ta</b>	Μη-διηθητικό θηλωματώδες καρκίνωμα
<b>Tis</b>	Καρκίνωμα <i>in situ</i> : «επίπεδος όγκος»
<b>T1</b>	Διήθηση του υπο-επιθηλιακού συνδετικού ιστού
<b>T2</b>	Μυϊκή διήθηση του όγκου
<b>T2a</b>	Διήθηση επιφανειακού μυϊκού στρώματος (έσω μισό μυϊκού ιστού)
<b>T2b</b>	Διήθηση εν τω βάθει μυϊκού στρώματος (έξω μισό μυϊκού ιστού)
<b>T3</b>	Διήθηση περικυστικών ιστών (πέραν του μυϊκού ιστού)
<b>T3a</b>	Μικροσκοπική διήθηση
<b>T3b</b>	Μακροσκοπική διήθηση (εξωκυστική μάζα)
<b>T4</b>	Επέκταση του όγκου σε ένα από τα ακόλουθα: προστάτης, μήτρα, κόλπος, πυελικό τοίχωμα, κοιλιακό τοίχωμα
<b>T4a</b>	Επέκταση του όγκου σε προστάτη, μήτρα, κόλπο
<b>T4b</b>	Επέκταση του όγκου σε πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα

### Επιχώριοι λεμφαδένες (*Regional Lymph Nodes, N*)

<b>NX</b>	Επιχώριοι λεμφαδένες που δεν μπορούν να εκτιμηθούν
<b>N0</b>	Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
<b>N1</b>	Μετάσταση σε έναν μόνο πυελικό λεμφαδένα (υπογάστριο, θυροειδή, έξω λαγόνιο ή προϊερό)
<b>N2</b>	Μετάσταση σε πολλαπλούς πυελικούς λεμφαδένες (υπογάστριους, θυροειδείς, έξω λαγόνιους ή προϊερούς)
<b>N3</b>	Μετάσταση σε έναν ή περισσότερους κοινούς λαγόνιους λεμφαδένες

### Μακρινές μεταστάσεις (*Distant Metastasis, M*)

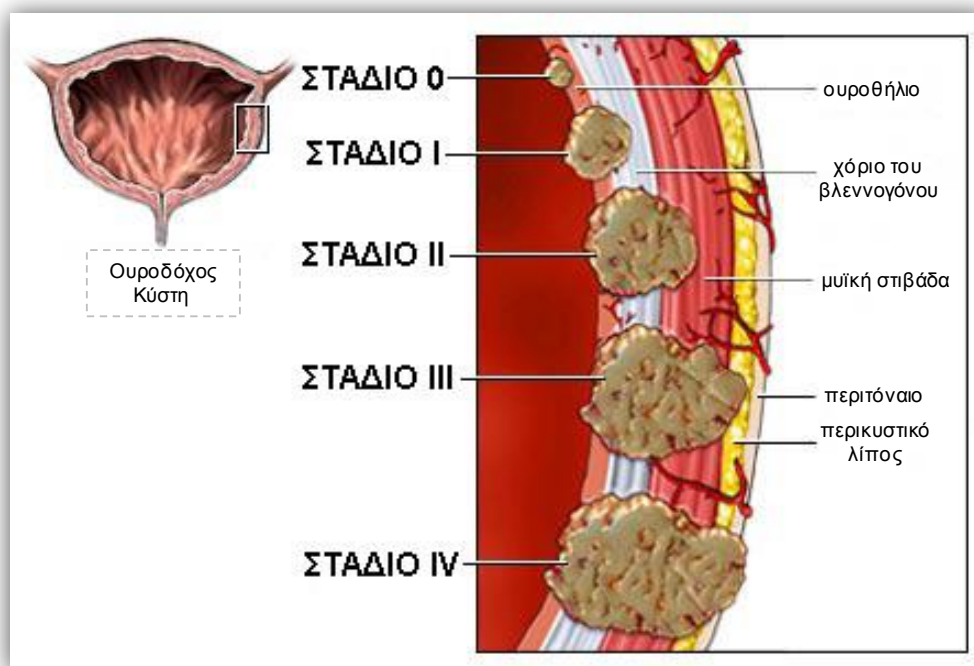
<b>M0</b>	Απουσία μακρινής μετάστασης
<b>M1</b>	Παρουσία μακρινής μετάστασης



**Εικόνα 1.17** Εικονογράφημα που αποτυπώνει τα στάδια του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το σύστημα TNM [10].

Το πλέον αποδεκτό σύστημα ταξινόμησης των διαφορετικών τύπων καρκίνου της ουροδόχου κύστης αναγνωρίζει πέντε διακριτά στάδια κακοήθειας, βασιζόμενα στους βαθμούς επιθετικότητας και κυτταρικής διαφοροποίησης του εκάστοτε όγκου, ως ακολούθως (**Εικόνα 1.18**) [1, 10, 20, 61, 63]:

- ❖ Στάδιο 0: Μη διηθητικός όγκος, ο οποίος περιορίζεται στην επιθηλιακή επίστρωση της ουροδόχου κύστης. Διακρίνεται στα στάδια:
  - 0a (Περιλαμβάνει τα στάδια T<sub>a</sub>, N0 και M0): Ονομάζεται επίσης και θήλωμα ή θηλώδες καρκίνωμα και αναπτύσσεται στο εσωτερικό του αυλού της κύστης.
  - 0is (Περιλαμβάνει τα στάδια T<sub>is</sub>, N0, M0): Συγκροτεί έναν επίπεδο όγκο, γνωστό και ως καρκίνωμα *in situ*.
- ❖ Στάδιο I: (Περιλαμβάνει τα στάδια T1, N0 και M0). Επέκταση του όγκου σε όλη την επιφάνεια της επιθηλιακής επίστρωσης (μεταβατικό επιθήλιο) και της υπο-βλεννογόνιας στιβάδας, χωρίς όμως να επηρεάζεται η μυϊκή στιβάδα.
- ❖ Στάδιο II: (Περιλαμβάνει τα στάδια T2, N0 και M0). Διήθηση του όγκου στην μυϊκή στιβάδα.
- ❖ Στάδιο III: (Περιλαμβάνει τα στάδια T3a, T3b, T4a, N0 και M0). Επέκταση του όγκου πέραν της μυϊκής στιβάδας και διήθηση του παρακείμενου λιπώδη ιστού (T3), ή οργάνων και ιστών (προστάτη, μήτρα και κόλπο) που περιβάλλουν την ουροδόχο κύστη (T4a).
- ❖ Στάδιο IV: Επέκταση του καρκίνου από την ουροδόχο κύστη στο τοίχωμα της κοιλιάς ή της πύελου (στάδια T4b, N0 και M0). Ο όγκος δύναται να διηθήσει τους παρακείμενους λεμφαδένες (στάδια T0-4, N1-3 και M0) ή και άλλες απομακρυσμένες θέσεις και όργανα (μεταστατική μορφή). Οι μεταστατικές μορφές μπορούν να επηρεάσουν τόσο γειτονικά όσο και περιφερικά όργανα (στάδια T0-4, N0-3 και M1).

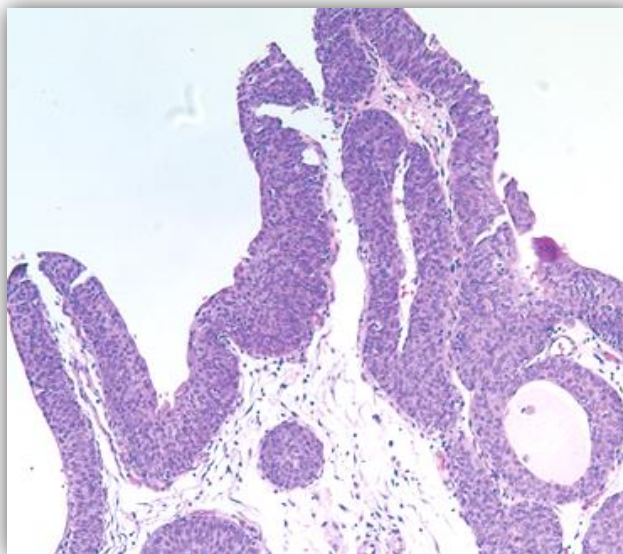


**Εικόνα 1.18** Τα στάδια του καρκίνου της ουροδόχου κύστης σε σχηματική απεικόνιση [<http://ebladdercancer.com/bladder-cancer-staging>].

### 1.2.3.1 Προ-καρκινικές αλλοιώσεις του ουροθηλίου

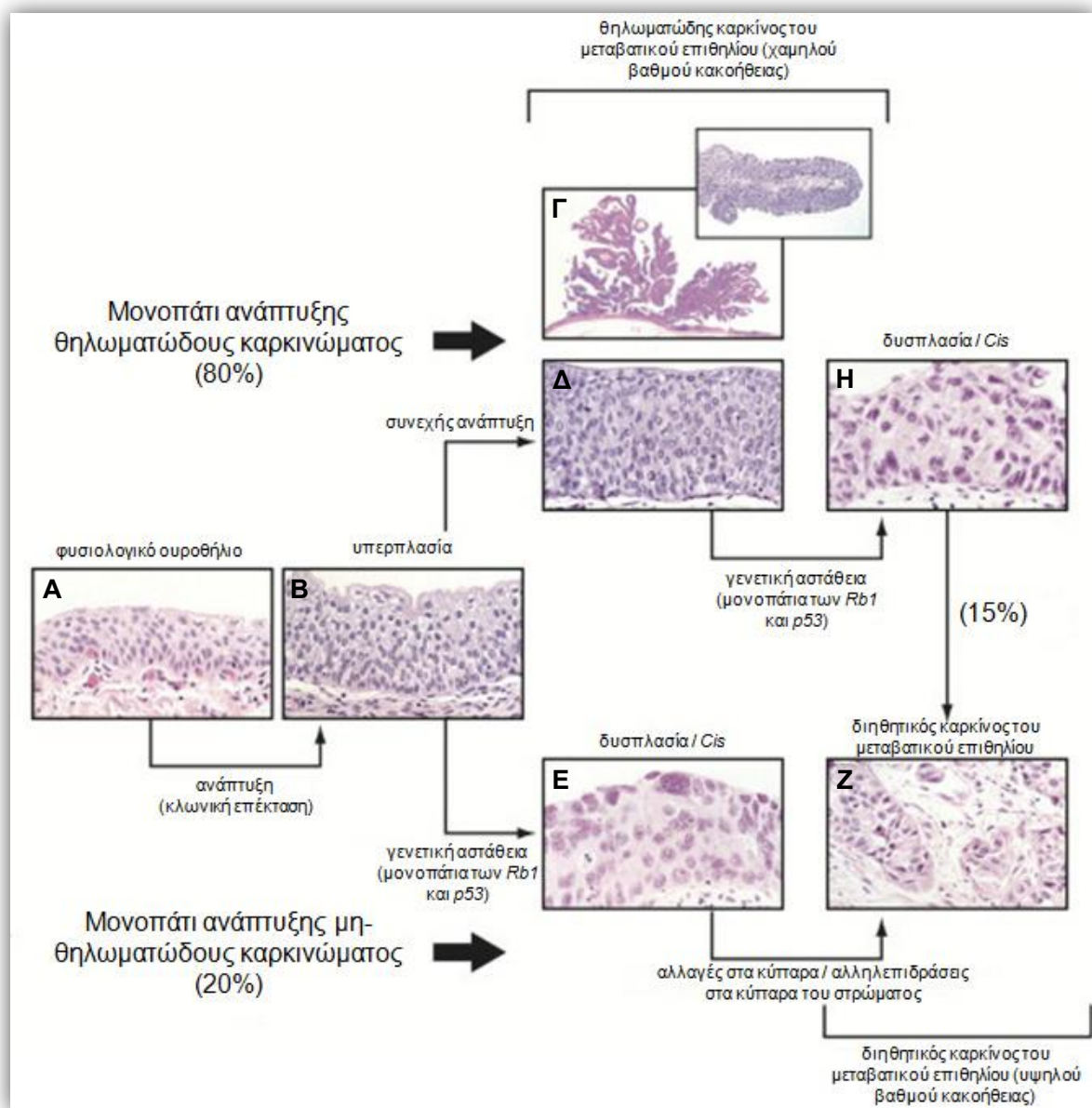
Οι προ-καρκινικές αλλοιώσεις συνιστούν μία διαδοχική σειρά κυτταρικών αλλαγών από την υπερπλασία στην ατυπία, έπειτα στη δυσπλασία και τελικά στον καρκίνο. Η ιστολογική αυτή απο-διαφοροποίηση προσεγγίζεται με την ανάλυση των κυτταρικών, χρωμοσωμικών και γονιδιακών αλλοιώσεων. Η υπερπλασία (*hyperplasia*) χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτα πυκνότερη στιβάδα βλεννογόνου με ή χωρίς ατυπία, συνήθως συνορεύει με χαμηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα και συσχετίζεται συχνά με ελλείψεις στο χρωμόσωμα 9 (**Εικόνα 1.19**). Η ενεργοποιημένη ατυπία (*atypia*) εμπεριέχει πυρηνικές διαφοροποιήσεις που συνδέονται με φλεγμονή ή αναγέννηση και διακρίνεται για τα μεγάλα κύτταρα με εξέχοντες πυρηνίσκους. Προκαλεί φλεγμονή κυρίως στο χόριο του βλεννογόνου και σχετίζεται με προηγούμενες μηχανικές επεμβάσεις στο ουροποιητικό σύστημα, με λιθίαση, μόλυνση ή ενδοκυστικές θεραπείες [1, 65-67]. Η ουροθηλιακή δυσπλασία παρουσιάζει παθολογικές κυτταρολογικές αλλαγές, οι οποίες είναι προ-νεοπλαστικές, αλλά δεν αρκούν για να ταυτοποιηθούν ως καρκίνωμα *Cis*. Χαρακτηρίζεται από συνεκτικά κύτταρα με πολλούς πυρήνες, ευδιάκριτους πυρηνίσκους και ανώμαλες

μιτωτικές διαιρέσεις. Εμφανίζονται τα κύτταρα τύπου «ομπρέλας» και συχνά οδηγεί στον τύπο καρκίνου *Cis*.



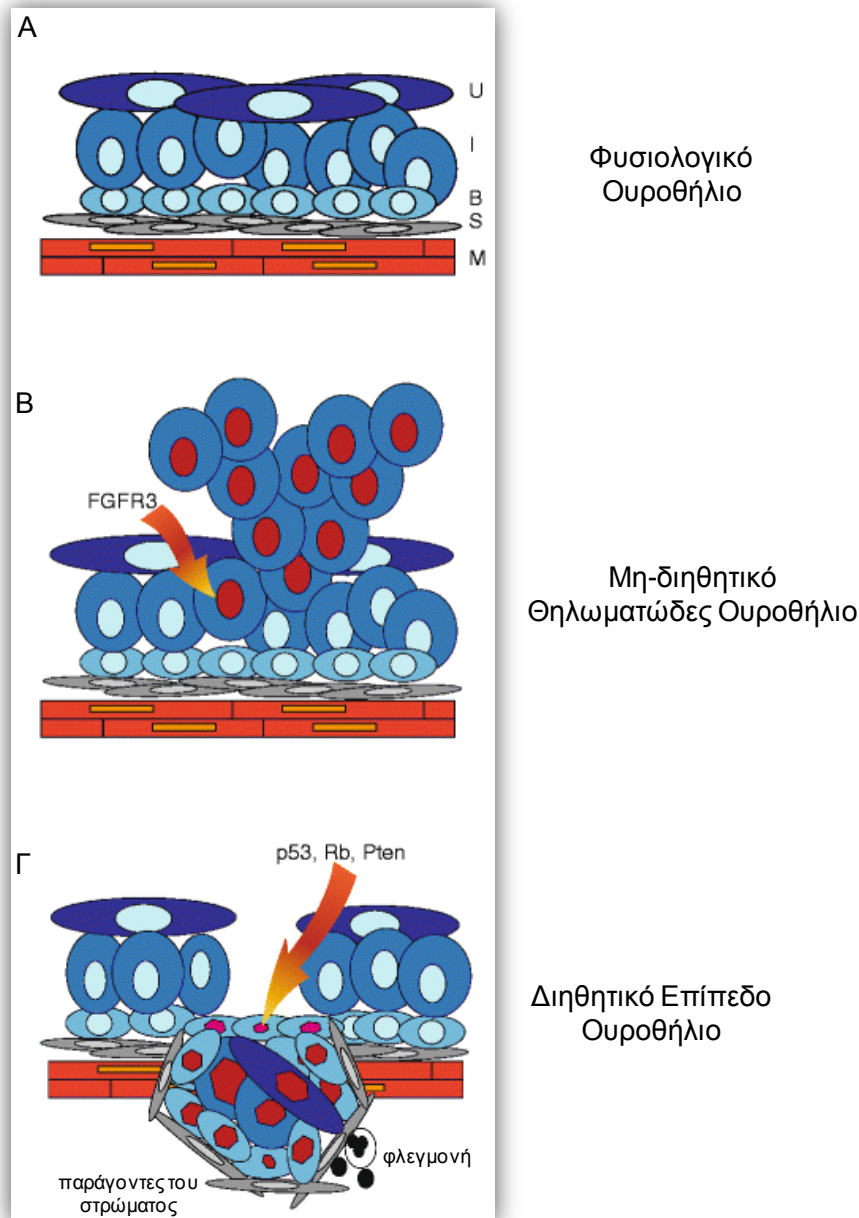
**Εικόνα 1.19** Θηλωματώδης ουροθηλιακή υπερπλασία, όπως προκύπτει έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη [1].

Ο καρκίνος του ουροθηλίου προκύπτει μέσω δύο επικαλυπτόμενων μονοπατιών του θηλωματώδους (*papillary*) σε ποσοστό 80% και του μη-θηλωματώδους (*non-papillary*) σε ποσοστό 20% (**Εικόνα 1.20**) [1, 11, 23, 26, 58, 68-71]. Η ανάπτυξη ενός προ-νεοπλαστικού κλώνου (υπερπλαστικό επιθήλιο), ο οποίος εμφανίζει ελάχιστες φαινοτυπικές αποκλίσεις από το φυσιολογικό ουροθήλιο, είναι η απαρχή της καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη. Η συνεχής ανάπτυξη τέτοιων όγκων, με την εμφάνιση γενετικών ή επιγενετικών αλλαγών (για παράδειγμα του γονιδίου *FGFR3* ή του ογκογονιδίου *Ras*), οδηγεί στη δημιουργία χαμηλού βαθμού κακοήθειας επιφανειακών θηλωματικών όγκων. Οι όγκοι αυτοί συνήθως υποτροπιάζουν και μόνο ένα μικρό ποσοστό εξ αυτών εξελίσσεται σε υψηλότερου βαθμού κακοήθειας διηθητικό καρκίνωμα. Καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων της βασικής μεμβράνης μέσω τροποποιήσεων γονιδίων, όπως του μεταγραφικού παράγοντα *p53*, του ρετινοβλαστώματος (*retinoblastoma*, *Rb*) και της φωσφατάσης *PTEN*, οδηγεί σε *in situ* καρκίνωμα (*Cis*) και τελικά στη δημιουργία υψηλού βαθμού κακοήθειας, μη-θηλωματικών, διεισδυτικών ουροθηλιακών όγκων. Υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνωμα δύναται να προκληθεί και έπειτα από φλεγμονή, ή άλλους παράγοντες, που αφορούν στα κύτταρα του στρώματος (**Εικόνες 1.21 και 1.22**) [1, 11, 23, 26, 58, 67-71].

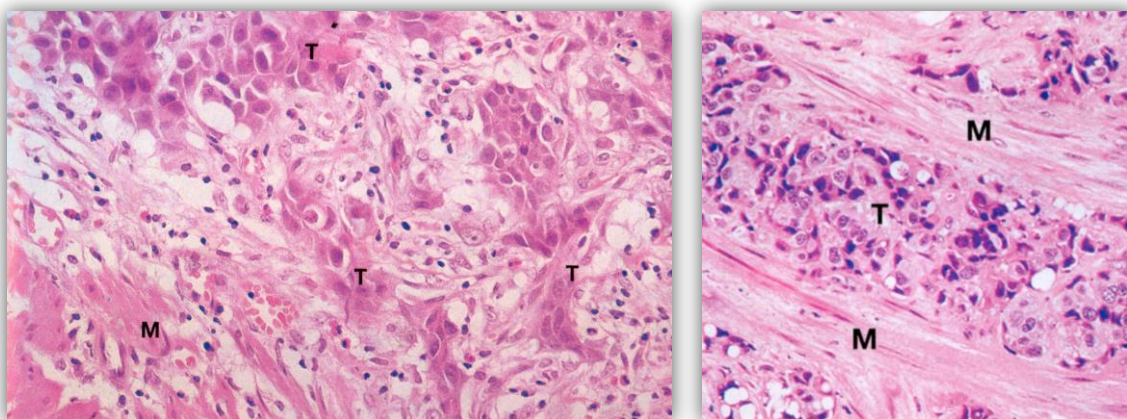


Εικόνα 1.20 Διπλό σύστημα καρκινογένεσης ανθρώπινου ουροθηλίου [58].





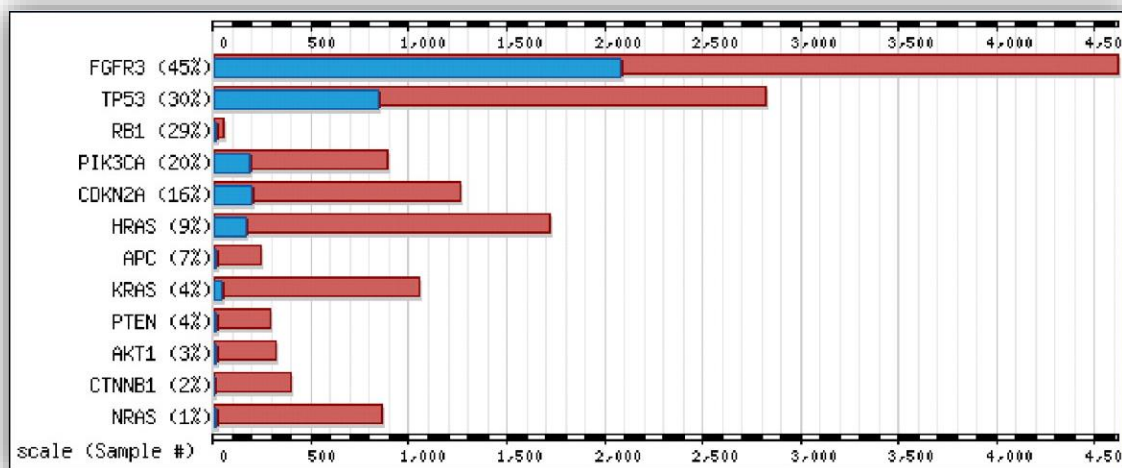
**Εικόνα 1.21** Ανάπτυξη του χαμηλού βαθμού κακοήθειας θηλώματος, σε αντίθεση με του υψηλού βαθμού κακοήθειας διηθητικού ουροθηλιακού καρκινώματος. **A.** Το φυσιολογικό ουροθήλιο, με τα είδη των κυττάρων που περιέχονται σε αυτό. **B.** Γενετικές ή/και επιγενετικές αλλαγές στα ενδιάμεσα κύτταρα οδηγούν στην υπερπλασία και τελικά στη δημιουργία του χαμηλού βαθμού κακοήθειας θηλωματώδους καρκινώματος. **Γ.** Καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων του βασικού στρώματος σε *Cis*, και αργότερα σε υψηλού βαθμού κακοήθειας, διηθητικό καρκίνο του ουροθηλίου. Η μετατροπή αυτή μπορεί επίσης να συμβεί με φλεγμονή ή άλλους παράγοντες του στρώματος (U: *umbrella cells*, κύτταρα ομπρέλας, I: *intermediate cells*, ενδιάμεσα κύτταρα, B: *basal cells*, κύτταρα του βασικού στρώματος, S: *stroma*, στρώμα, M: *muscle*, μυϊκή στιβάδα) [11].



**Εικόνα 1.22** Διηθητικό καρκίνωμα του μεταβατικού επιθηλίου. Διακρίνονται τα κύτταρα του ουροθηλιακού όγκου (T, *tumor*), τα οποία έχουν επεκταθεί και διεισδύσει στις λείες μυϊκές ίνες (M, *smooth muscle bundles*) (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης) [9].

#### 1.2.4 Μοριακή και κυτταρική γενετική του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Η ανάγκη να προβλεφθούν ποιοι μη-διηθητικοί όγκοι θα επανεμφανιστούν και θα εξελιχθούν, καθώς και ποια από τα διεισδυτικά καρκινώματα θα προκαλέσουν μετάσταση, οδήγησαν σε μία συνεχή προσπάθεια να κατανοηθεί σε βάθος και σε πολλαπλά επίπεδα η καρκινογένεση και η μετάσταση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, προσπάθεια η οποία ευνοήθηκε από την ανάπτυξη νέων μοριακών και κυτταρογενετικών τεχνικών και μεθόδων. Οι μοριακές και γενετικές τροποποιήσεις του καρκίνου του μεταβατικού επιθηλίου στην ουροδόχο κύστη μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες, ως αποτέλεσμα διαφορετικών γεγονότων: α) χρωμοσωμικές μετατροπές, αντιπροσωπεύοντας την απαρχή της καρκινογένεσης, β) πολλαπλασιασμό του όγκου, εξαιτίας της απώλειας ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και γ) μετάσταση, όπου ο όγκος (τμήμα του) αποχωρίζεται από τον αρχικό με τη συμμετοχή περιβαλλοντικών γεγονότων που ευνοούν την αποκόλληση και περαιτέρω ανάπτυξη αυτού, όπως η απώλεια κυτταρικής προσκόλλησης και η ανάπτυξη αγγειογένεσης, αντίστοιχα. Πιστεύεται, ότι η συσσώρευση αρκετών διαδοχικών τέτοιων αλλαγών, παρά ένα μεμονωμένο μοριακό γεγονός, καθορίζουν το φαινότυπο του καρκινώματος και ως εκ τούτου την έκβαση της υγείας των ασθενών (**Εικόνα 1.23**) [68].

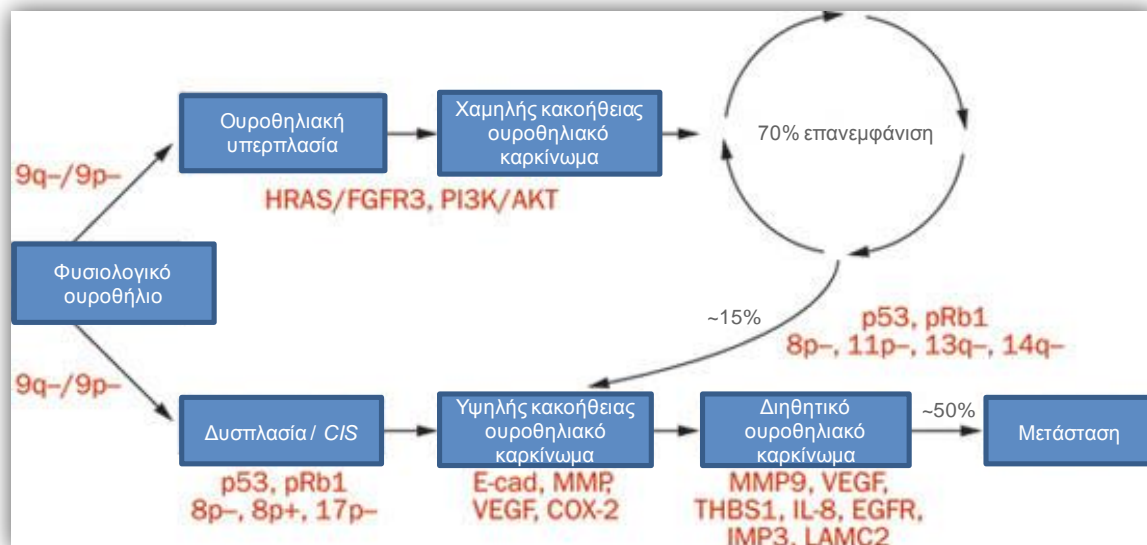


**Εικόνα 1.23** Προφίλ μεταλλαγών στον καρκίνο του μεταβατικού επιθηλίου. Παρουσιάζονται τα δώδεκα πιο σημαντικά γονίδια που βρέθηκαν να φέρουν μεταλλαγές σε δείγματα ασθενών. Οι κόκκινες ράβδοι αντιπροσωπεύουν τον συνολικό αριθμό δειγμάτων για κάθε γονίδιο, ενώ οι μπλε ράβδοι αποτυπώνουν το ποσοστό δειγμάτων επί του εκάστοτε συνόλου που είναι θετικά για τη μεταλλαγή στο συγκεκριμένο γονίδιο. Τα ποσοστά στις παρενθέσεις αποκαλύπτουν τη συχνότητα των μεταλλαγών [72].

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης συνιστά ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη διερεύνηση μοριακών αλλαγών, σε επίπεδο DNA και γονιδίων, εξαιτίας των διαφορετικών υποτύπων που περιέχει, καθώς και των διαφορετικών προσεγγίσεων και μονοπατιών στον τρόπο που θα εξελιχθούν. Οι τροποποιήσεις αυτές ποικίλλουν, από πλοειδία χρωμοσωμάτων και μετατόπιση μη-ομόλογων χρωμοσωμάτων, μέχρι αναστροφή τμημάτων που συνήθως οδηγούν στη δημιουργία ανώμαλων ή χμαιρικών γονιδίων, τα οποία μέσω των τελικών προϊόντων τους θεωρούνται υπεύθυνα για την απουσία ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα την νεοπλασματική εκτροπή. Χρωμοσωμικές ελλείψεις, ή ακόμα και απώλειες ολόκληρων χρωμοσωμάτων, οδηγούν στην έλλειψη ετεροζυγωτίας με αδρανοποίηση ογκο-κατασταλτικών (*tumor suppressor*) γονιδίων, επιτρέποντας ως εκ τούτου στο υπολειπόμενο αλληλόμορφο να εκφράζει τη νεοπλασματική του ιδιότητα. Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης καταδεικνύουν πως οι κυριότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες αφορούν στα χρωμοσώματα 3, 7, 8, 9, 11, 13 και 17, ενώ ενδείξεις υπάρχουν για την εμπλοκή και άλλων χρωμοσωμάτων [1, 34, 68, 70, 71].

Αλλαγές στο χρωμόσωμα 9 συνιστούν γενετικές ανωμαλίες που εντοπίζονται και στα δύο μονοπάτια εξέλιξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (**Εικόνα 1.24**).

Είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία τέτοιου περιβάλλοντος γενετικής αστάθειας, ικανού να ευνοεί τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών [23, 26, 34, 69-71, 73]. Συνιστούν τις πιο συχνές μεταλλάξεις στον καρκίνο του μεταβατικού επιθηλίου, εντοπίζονται σε περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων, ανεξαρτήτως σταδίου και βαθμού κακοήθειας του όγκου, ενώ η πλειοψηφία αυτών συναντάται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9p). Οι περισσότεροι καρκίνοι τύπου Ta και T1 παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες σε άλλα χρωμοσώματα εκτός του 9, και έτσι συμπεραίνεται πως η απενεργοποίηση των γονιδίων που χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 9 αντιπροσωπεύει πρώιμο γεγονός της ανάπτυξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Οι πιο διηθητικοί όγκοι εμφανίζουν αλλαγές σε διαφορετικά χρωμοσώματα και κυρίως στα χρωμοσώματα 3, 8 και 17. Συγκεκριμένα, ελλείψεις στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (3p) και 8 (8p) έχουν ανιχνευθεί σε υψηλού βαθμού κακοήθειας, διηθητικού στη μυϊκή στιβάδα, καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ενώ δεν έχουν εντοπιστεί σε επιφανειακούς όγκους (μη-διηθητικούς όγκους του μεταβατικού επιθηλίου και διηθητικούς εκτός της μυϊκής στιβάδας) [68, 74-79].



**Εικόνα 1.24** Αποτύπωση των δύο αποκλινόντων μοριακών μονοπατιών της ογκογένεσης σε μη-διηθητικούς στη μυϊκή στιβάδα και διηθητικούς σε αυτήν καρκίνους της ουροδόχου κύστης. Απεικονίζονται οι γενετικές αλλαγές στα στάδια κλειδιά για την εξέλιξη της νεοπλασίας. Οι βασικές τροποποιήσεις που αφορούν στα χαμηλής κακοήθειας, μη-διηθητικά, ουροθηλιακά καρκινώματα περιλαμβάνουν μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα γονίδια *FGFR3*, *H-Ras* και *mTOR*. Σε αντιπαράθεση, αλλαγές που κατευθύνουν τη μετεξέλιξη σε υψηλού βαθμού κακοήθειας μη-διηθητικά και διηθητικά στην μυϊκή στιβάδα

ουροθηλιακά καρκινώματα συγκαταλέγουν ογκο-κατασταλτικά γονίδια, όπως αυτά της *p53* και του *Rb1*, καθώς και περαιτέρω μικρο-περιβαλλοντικές αλλαγές. *Cis*: carcinoma *in situ* (επί-τόπου καρκίνωμα). HRAS: v-Ha-Ras, Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (ομόλογο ιϊκό ογκογονίδιο σαρκώματος αρουραίου Harvey). FGFR3: fibroblast growth factor receptor 3 (υποδοχέας ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3). PI3K: phosphoinositide-3-kinase (κινάση φωσφοϊνοσιτίδης 3). AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene (ιϊκό ογκογονίδιο θυμώματος μύος). p53: tumor protein p53 (ογκοπρωτεΐνη p53). pRb1: retinoblastoma-like protein 1 (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος 1). E-cad: E-cadherin (E-καδερίνη). MMP: matrix metalloproteinase (μεταλλοπρωτεϊνάση θεμέλιας ουσίας). VEGF: vascular endothelial growth factor (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας). COX-2: cyclooxygenase 2 (κυκλοοξυγενάση 2). THBS1: thrombospondin 1 (θρομβοσπονδίνη 1). IL-8: interleukin 8 (ιντερλευκίνη 8); EGFR: epidermal growth factor receptor (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα). LAMC2: laminin subunit gamma-2 (γάμμα-2 υπομονάδα λαμινίνης) [71].

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στη δράση συγκεκριμένων ογκογονιδίων, όπως του κυτταρικού *H-Ras*, του κυτταρικού *Myc* (*c-Myc*), του *MDM2* και του κυτταρικού *erbB2* (*c-erbB2*), τα οποία αποτελούν σημαντικούς καθοριστές της εξέλιξης του συνόλου των ανθρώπινων κακοηθειών. Τα ογκογονίδια συνιστούν φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια, τα οποία συμβάλλουν στον κακοήθη φαινότυπο ενός όγκου, μέσω της υπερ-έκφρασης του φυσιολογικού γονιδιακού προϊόντος ή μέσω της έκφρασης πρωτεϊνών με τροποποιημένες λειτουργίες. Η υπερ-έκφραση μπορεί να επιτευχθεί με γονιδιακή επέκταση (*gene amplification*) ή χρωμοσωμική μετατόπιση (*chromosomal translocation*) του γονιδίου σε περιοχή που βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή [68, 73].

Τα γονίδια *Ras* συγκροτούν μία οικογένεια ογκογονιδίων η οποία αρχικά ταυτοποιήθηκε στην T24 καρκινική σειρά της ουροδόχου κύστης [1, 80]. Η πιο συχνή θέση της ενεργοποίησης του *H-Ras* αφορά σε μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, 59 και 61, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενζυμική ενεργότητα. Μεταλλάξεις του *H-Ras* εντοπίζονται στο περίπου 40% των ουροθηλιακών καρκινωμάτων, με τις μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό εξ αυτών [18, 32, 72, 81].

Η οικογένεια των γονιδίων *Myc* αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κωδικοποιεί πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν θέσεις πρόσδεσης στο DNA. Το κυτταρικό ογκογονίδιο *Myc* (*c-Myc*) υπερ-εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης, και μάλιστα φαίνεται πως συσχετίζεται με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας του εν λόγω καρκίνου [68, 82-84].

Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-erbB2*, γνωστό και ως *HER2*, κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με δράση κινάσης τυροσίνης και με ικανότητα να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει την έκφραση του *c-erbB2* με στάδια υψηλής κακοήθειας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, με αυξημένη εξέλιξη του όγκου, με υψηλά ποσοστά μετάστασης και γενικά με μειωμένη επιβίωση και κακή πρόγνωση της πορείας του ασθενούς. Υπάρχουν όμως και έρευνες που δεν συσχετίζουν σε τέτοιο υψηλό βαθμό την εξέλιξη της νόσου με το συγκεκριμένο γονίδιο και έτσι η ένδειξη αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [32, 68, 85-88].

Μεγάλο ποσοστό ανθρώπινων κακοηθειών οφείλεται στην απενεργοποίηση ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Μερικά από τα πλέον σημαντικά ογκο-κατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι τα *Rb*, *p53*, *PTEN* και *p21*.

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη 110 kDa, η οποία υπόκειται σε μηχανισμούς φωσφορυλίωσης (pRb) και αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Έχει δειχθεί πως όγκοι οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *Rb* δεν έχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης, γεγονός που συνδυάζεται με ανεπαρκή πρόγνωση, συνεχή αύξηση του όγκου και επιθετική κλινική συμπεριφορά, τα οποία στο σύνολό τους βασίζονται στην αυξημένη δράση του *E2F1* γονιδίου και ομοειδούς μεταγραφικού παράγοντα [1, 23, 34, 68, 89, 90].

Αλλαγές στο γονίδιο *p53* συνδέονται, κατά περίπτωση, με τον βαθμό και τα στάδια κακοήθειας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, καθώς και με την έκβαση της πορείας του ασθενούς. Το γονίδιο εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (17p) και η αντίστοιχη πρωτεΐνη του ελέγχει την έκφραση ποικίλων γονιδίων που εμπλέκονται και ρυθμίζουν την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA, αλλά και τον κυτταρικό μεταβολισμό. Η υπερ-έκφραση της πυρηνικής πρωτεΐνης *p53* και οι μεταλλάξεις του αντίστοιχου γονιδίου

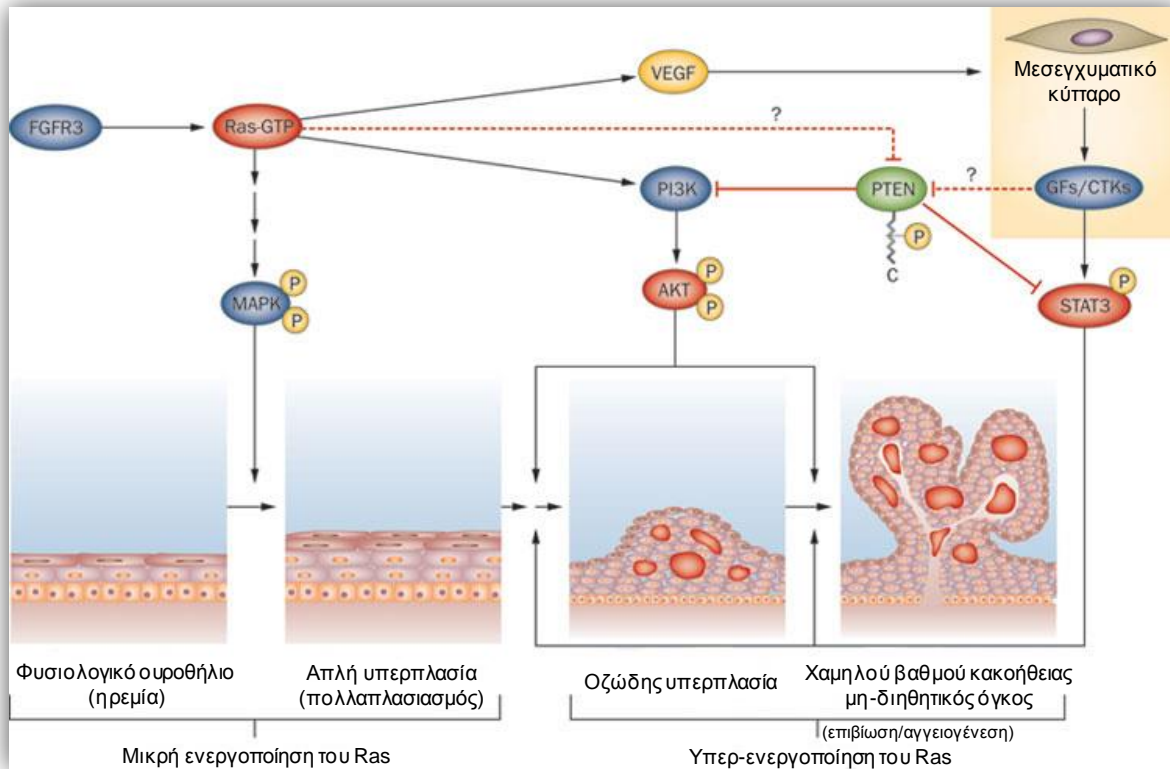
της εμφανίζονται στο περίπου 80% των υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνων, καθώς και στα *Cis* καρκινώματα [1, 23, 34, 62, 68, 72, 89-93].

Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PTEN* αποκαλύπτονται στους προχωρημένους καρκίνους του ουροθηλίου, όπως και στα *Cis* καρκινώματα. Συμπερασματικά, αλλαγές στα μονοπάτια του ρετινοβλαστώματος (*Rb*), της *p53* και του *PTEN* συνιστούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα των διεισδυτικών καρκίνων, ενώ συνδυασμένες μεταλλαγές αυτών οδηγούν σε ιδιαίτερα κακή πρόγνωση για την ασθένεια [1, 23, 72, 89, 94-96]. Αντιθέτως, στους χαμηλής κακοήθειας και μη-διηθητικούς στην μυϊκή στιβάδα καρκίνους εμπλέκονται γονίδια όπως το *FGFR3* (Εικόνες 1.24 και 1.25).

Ο υποδοχέας ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (*FGFR3*) αποτελεί μία κινάση τυροσίνης, η οποία προκαλεί ισχυρή ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης και είναι μεταλλαγμένη στο 75% των μη-διηθητικών, χαμηλού βαθμού κακοήθειας καρκινωμάτων. Η υπερ-έκφραση του mRNA του αντίστοιχου γονιδίου είναι οκτώ φορές πιο υψηλή στους όγκους αυτούς σε σχέση με το φυσιολογικό ουροθήλιο, ενώ στους διεισδυτικούς όγκους η υπερ-έκφρασή της φθάνει τις τέσσερις φορές. Εξαιτίας της διαφορικής αυτής έκφρασης στα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, το γονίδιο *FGFR3* θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ισχυρό θεραπευτικό στόχο για τον εν λόγω καρκίνο. Οι μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR3* και *H-Ras* σχετίζονται με σοβαρή απορρύθμιση λειτουργίας των ομοειδών πρωτεϊνών, αλλά και κατωροϊκών τελεστών τους, καθώς μετέχουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι *Ras/MEK/ERK* (Εικόνες 1.24 και 1.25). Μεταλλαγές στον *FGFR3* προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα και συνεπώς συστατική (*constitutive*) σηματοδότηση του MAPK (ERK) μονοπατιού. Ταυτόχρονες μεταλλαγές συμβαίνουν επίσης και στα γονίδια *FGFR3* και *p53*, για αδιευκρίνιστο μέχρι στιγμής λόγο, αφού δεν φαίνεται να συμμετέχουν σε κάποιο κοινό μονοπάτι μετάδοσης πληροφορίας και σήματος [1, 11, 23, 34, 72, 90].

Σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο *PI3K*, εντοπίζονται στο περίπου 10% των καρκίνων χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ενώ το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι απαραίτητο για την επαγωγή του σηματοδοτικού καταρράκτη PTEN/Akt. Έχει αναφερθεί ότι ο *FGFR3* και η *PI3K* παρουσιάζουν συνεργιστική ογκογόνο δράση, καθώς ένα σύνολο μη-διηθητικών όγκων φέρουν μεταλλαγές και στα δύο γονίδια και ο εν λόγω γονότυπος συνδέεται με πρώιμη εξέλιξη του καρκίνου. Έλλειψη στο

γονίδιο *TSC1* αποκαλύπτεται στο περίπου 10% των κακοηθειών της ουροδόχου κύστης. Το γονιδιακό προϊόν αυτού φωσφορυλιώνει άμεσα την Akt κινάση σερίνης/θρεονίνης, ενώ ρυθμίζει έμμεσα το mTOR και το συγγενές μονοπάτι PTEN/Akt/mTOR [1, 34, 71, 97].



**Εικόνα 1.25** Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Ras/MAPK, JAK/STAT και PI3K/Akt/mTOR σηματοδοτικών μονοπατιών που συσχετίζονται με την πρόωμη ογκογένεση σε μη-διηθητικά θηλωματώδη ουροθηλιακά νεοπλάσματα. Η ενεργοποίηση του Ras προωθεί την επιβίωση και την αγγειογένεση μέσω αυξορρύθμισης των μονοπατιών PI3K/Akt και JAK/STAT. Απενεργοποίηση του PTEN οδηγεί, επίσης, σε ενεργοποίηση των μονοπατιών της Akt και του JAK/STAT σηματοδοτικού καταρράκτη. Εναλλακτικά, μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR3* δύνανται να προκαλέσουν ενεργοποίηση του Ras και συνεπώς την κατωροϊκή μεταγωγή σήματος. Ras-GTP: constitutively active Ras-GTPase [συνεχώς (συστατικώς) ενεργή Ras-GTPάση]. MAPK: mitogen-activated protein kinase (ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση). PTEN: phosphatase and tensin homolog (φωσφατάση φέρουσα περιοχές ομολογίας με τενσίνη). GF: growth factor (αυξητικός παράγοντας). CTK: cytokine [κυτ(τα)ροκίνη]. STAT3: signal transducer and activator of transcription 3 (σηματοδοτικός μεταγωγέας και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3) [71].

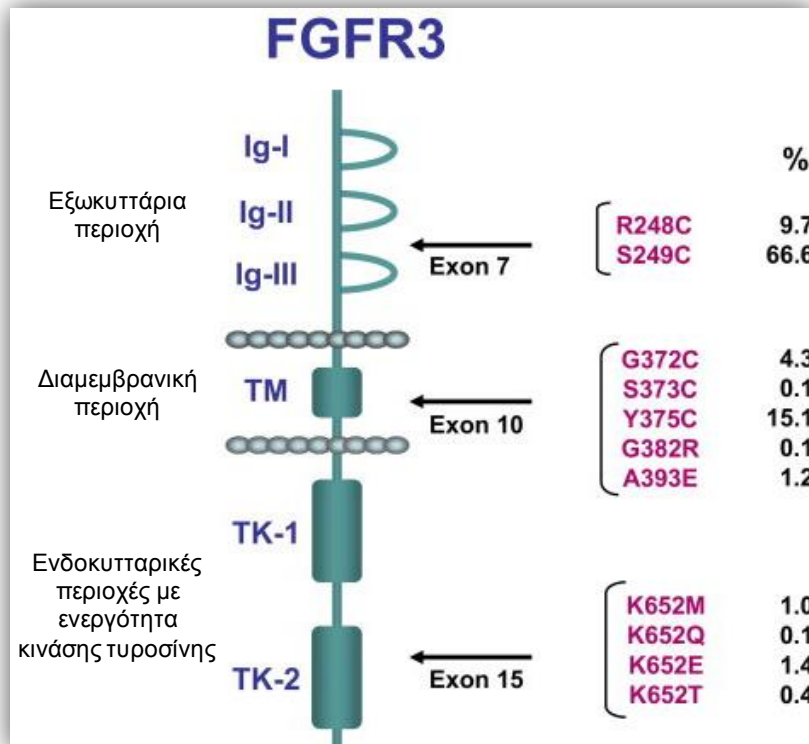


Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η διήθηση (μετακίνηση, διείσδυση και μετάσταση) του όγκου δεν εξαρτάται μόνο από ενδογενείς γενετικούς παράγοντες των καρκινικών κυττάρων, αλλά και από το τοπικό μικρο-περιβάλλον μέσα στο οποίο τα κύτταρα του όγκου αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με την γειτνιάζουσα περιοχή. Διαφαίνεται, ως εκ τούτου, πως οι μειωμένες κυτταρικές διασυνδέσεις, η έντονη καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας, η αυξημένη αγγειογένεση, καθώς και η έντονη σύνθεση προσταγλανδινών αποτελούν πρώιμα χαρακτηριστικά του μονοπατιού που μετέχει στην εγκαθίδρυση και εξέλιξη του διηθητικού ουροθηλιακού καρκινώματος [34]. Στην κυτταρική προσκόλληση καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η E-καδερίνη, της οποίας η απώλεια, ή μειωμένη λειτουργία, συνεπάγεται ελαττωματικές κυτταρικές διασυνδέσεις και άρα θετική δράση στην προώθηση της διεισδυτικότητας του όγκου. Αντίθετη δράση φαίνεται να έχει η N-καδερίνη, της οποίας η έκφραση ενισχύει το διηθητικό δυναμικό [34, 98-100]. Όσον αφορά στην ανακατασκευή της θεμέλιας ουσίας, πρωταγωνιστική θέση κατέχουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, με κυρίαρχα τα MMP2 και MMP9 μέλη της οικογένειας, τα οποία συνιστούν πρωτεολυτικά ένζυμα που δύνανται να αποικοδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τις βασικές μεμβράνες, δικαιολογώντας ως εκ τούτου την παρατηρούμενη σε διεισδυτικούς όγκους ισχυρή επαγωγή τους [34, 101-103]. Η αγγειογένεση, μία επιπλέον θεμελιώδης διαδικασία που δραστηριοποιείται εσωτερικά και περιφερειακά των όγκων, επάγεται εξαιτίας της αυξημένης έκφρασης αγγειογενετικών επαγωγέων (VEGF, FGF και PDGF), αλλά και της ελαττωμένης απόδοσης αγγειογενετικών αναστολέων (THBS1) [34, 104, 105]. Οι προσταγλανδίνες παράγονται από αραχιδονικά οξέα και ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση, το ανοσοποιητικό σύστημα και την απόπτωση. Ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεσή τους, όπως η κυκλοοξυγενάση (COX-2), υπερ-εκφράζονται συχνά στα καρκινώματα του ουροθηλίου και κυρίως στους υψηλού βαθμού κακοήθειας διηθητικούς όγκους [34, 106].

### 1.3 Μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

#### 1.3.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι υποδοχέα ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 3 (FGFR3)

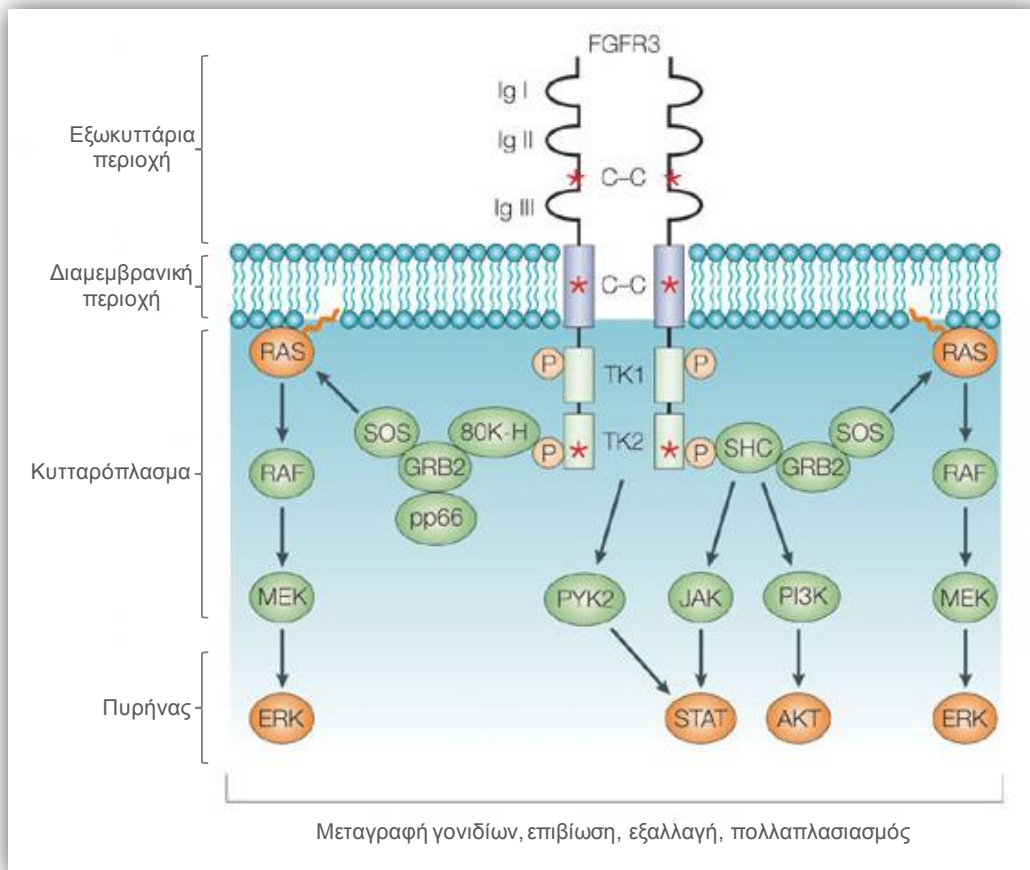
Η πρωτεϊνική οικογένεια FGFR απαρτίζεται από τέσσερα ενεργά μέλη που συγκροτούν υποδοχείς υψηλής συγγένειας με την κυτταρική επιφάνεια (FGFR1-4), οι οποίοι παρέμειναν ιδιαίτερα συντηρημένοι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, ενώ η παρουσία και δράση τους είναι καθοριστική στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό και στην αγγειογένεση. Οι υποδοχείς αυτοί συνιστούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και εμφανίζουν παρόμοια δομή, η οποία χαρακτηρίζεται από ένα εξωκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει ένα αμινοτελικό υδρόφοβο πεπτίδιο σηματοδότησης ακολουθούμενο από τρεις περιοχές ομόλογες με ανοσοσφαιρίνη (Ig), μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυτταρική περιοχή με ενεργότητα (ρυθμιζόμενη) κινάσης τυροσίνης (Εικόνα 1.26).



**Εικόνα 1.26** Σχηματική απεικόνιση της δομής του FGFR3 υποδοχέα με τις τρεις διακριτές δομικές του περιοχές. Με κόκκινα γράμματα σημειώνονται οι

ταυτοποιημένες μεταλλαγές, ενώ δεξιά αναγράφονται σε ποσοστά οι σχετικές συχνότητες των μεταλλαγών σε ανθρώπινες ασθένειες και κακοήθειες [107].

Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες (*FGFs*), οι οποίοι αποτελούν τους προσδέτες των αντίστοιχων υποδοχέων (*FGFRs*), συνδέονται στο εξωκυττάριο τμήμα II και III που παρουσιάζει ομολογία με ανοσοσφαιρίνη, με αποτέλεσμα την έναρξη της κυτταρικής σηματοδότησης [72, 107-110]. Ειδικότερα, ο εκάστοτε FGF προσδένεται στον μονομερή ομοειδή του υποδοχέα, προκαλώντας το διμερισμό αυτού και την επακόλουθη διασταυρούμενη φωσφορυλίωση (*cross-phosphorylation*) των καταλοίπων τυροσίνης από τις περιοχές με ενεργότητα κινάσης (**Εικόνα 1.27**).



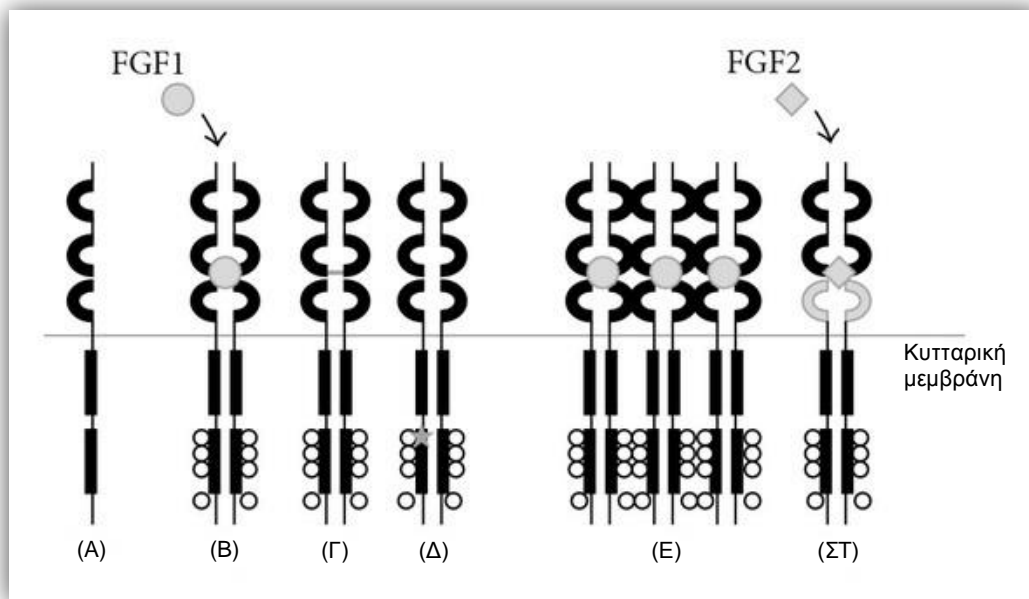
**Εικόνα 1.27** Σηματοδοτικά μονοπάτια που πιθανώς περιλαμβάνονται στην καρκινογένεση του ουροθηλίου εξαιτίας της ενεργοποίησης του FGFR3 υποδοχέα. Οι κόκκινοι αστερίσκοι υποδηλώνουν μεταλλαγές που οδηγούν σε δημιουργία νέας κυστεΐνης (C-C) και φωσφορυλίωση στην περιοχή κινάσης τυροσίνης (P), ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέτη [34].

Αυτό τροφοδοτεί έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες δεξαμενισμού-προσάραξης (*docking proteins*) και ενεργοποιεί περαιτέρω μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, όπως το Ras/Raf/MAPK, καθώς και αυτό των PI3K/Akt. Επίσης, ο ενεργοποιημένος FGFR3, άμεσα ή έμμεσα, μέσω των JAK κινασών (κινάσες της οικογένειας *Janus*), προάγει το μονοπάτι των STAT μεταγραφικών παραγόντων και ειδικότερα του STAT3, ο οποίος έχει ισχυρά ενοχοποιηθεί για την πρόκληση κυτταρικής απο-διαφοροποίησης (μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα) και διατήρησης του μιτωτικού και μεταναστευτικού δυναμικού σε επίπεδο παρόμοιο με αυτό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Τέλος, ο FGFR3 αλληλεπιδρά άμεσα με την κινάση τυροσίνης PYK2, οδηγώντας και πάλι στην ενεργοποίηση του STAT μονοπατιού. Οι πορείες αυτές ρυθμίζουν πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση (**Εικόνα 1.27**) [34, 71, 110-112].

Μελέτες έχουν ταυτοποιήσει έντεκα διαφορετικές μεταλλαγές στον FGFR3 (**Εικόνα 1.26**). Οι περισσότερες από αυτές που χαρακτηρίζουν τα ανθρώπινα ουροθηλιακά καρκινώματα αφορούν παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αμινοξικές υποκαταστάσεις στην εξωκυττάρια, διαμεμβρανική και ενδοκυτταρική περιοχή. Παρουσιάζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% σε καλοήθεις και σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους, ενώ μη-λειτουργικός FGFR3, εξαιτίας διαφόρων γενετικών επιβαρύνσεων, εμφανίζεται και σε διεισδυτικούς όγκους. Βασικές αιτίες παθολογικής ενεργοποίησης του FGFR3 αποτελούν κρίσιμες μεταλλαγές στα τρία διακριτά του τμήματα. Η πιο συχνή μεταλλαγή περιλαμβάνει τη μεταστροφή ενός μη-κυστεϊνικού καταλοίπου σε κυστεΐνη στην εξωκυττάρια «φουρκέτα»-θηλειά, η οποία πιθανότατα δημιουργεί μία *de novo* διαμοριακή δισουλφιδική διασταυρωτή σύνδεση, που έχει ως άμεσο αποτέλεσμα το διμερισμό και την αυτο-φωσφορυλίωση της περιοχής με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, χωρίς όμως να έχει προηγηθεί σύζευξη του υποδοχέα με κάποιον ομοειδή προσδέτη (**Εικόνες 1.27 και 1.28**). Επιπλέον, ισχυρή υπερ-έκφραση του υποδοχέα μπορεί να προξενήσει παθολογική ενεργοποίηση της σηματοδότησης. Οι λόγοι που μπορεί να συμβαίνει αυτό στον καρκίνο του μεταβατικού επιθηλίου δεν είναι απολύτως ξεκάθαροι, αλλά τελευταίες μελέτες δείχνουν να εμπλέκονται δύο micro-RNAs (miR99A/100), τα οποία μειορρυθμίζονται (*downregulated*) κυρίως στα χαμηλού βαθμού κακοήθειας και σταδίου ουροθηλιακά καρκινώματα. Τέλος, εναλλακτικό μάτισμα (*alternative*

*splicing*) του γονιδίου *FGFR3* δύναται να δημιουργήσει ισομορφές οι οποίες έχουν πιο διευρυμένη εξειδίκευση στους αντίστοιχους προσδέτες (**Εικόνα 1.28**) [34, 107, 110, 112-122].

Σε αντίθεση με τον *FGFR3*, οι υποδοχείς *FGFR1* και *FGFR2* αποδεικνύεται να έχουν προστατευτικό ή ογκο-κατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί κάποιος ρόλος για τον *FGFR4* [110, 123, 124]. Τέλος, ένας πέμπτος υποδοχέας έχει περιγραφηθεί (*FGFR5*), ο οποίος είναι ομόλογος με τους υπόλοιπους τέσσερις στην εξωκυττάρια περιοχή, ενώ το τμήμα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης έχει αντικατασταθεί από μία αλληλουχία πλούσια σε ιστιδίνη. Ως εκ τούτου, αναγνωρίζεται ως ένας υποδοχέας «εκτροπής» (*decoy receptor*), ο οποίος μπορεί να παρεμποδίζει τη σηματοδότηση μέσω της πρόσδεσης σε αυτόν και επακόλουθης απομάκρυνσης από τους φυσιολογικούς και προβλεπόμενους υποδοχείς στόχους των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων (*FGFs*) [110, 125, 126].



**Εικόνα 1.28** Μηχανισμοί φυσιολογικής (A, B) και παθολογικής (Γ, Δ) ενεργοποίησης του υποδοχέα *FGFR3*. (A) Μονομερής ανενεργός υποδοχέας. (B) Διμερισμός και ενεργοποίηση εξαρτώμενη από τον προσδέτη. (Γ) Διμερισμός και ενεργοποίηση ανεξάρτητη από τον προσδέτη, η οποία επάγεται από μεταλλάξεις στην εξωκυττάρια περιοχή. (Δ) Ενεργοποίηση ανεξάρτητη από τον προσδέτη, εξαιτίας μεταλλαγών στο τμήμα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. (E) Αυξορρύθμιση της σηματοδότησης εξαιτίας της υπερ-έκφρασης του υποδοχέα. (ΣΤ) Εναλλακτικό μάτισμα με επακόλουθη τη δημιουργία ισομορφών με ευρύτερη εξειδίκευση στον προσδέτη [110].

### 1.3.2 Μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/Akt

Σε απόκριση υψηλών συγκεντρώσεων θρεπτικών συστατικών, όπως ινσουλίνης και γλυκόζης, αυξητικών παραγόντων, κυτ(τα)ροκινών και περιβαλλοντικού στρες, μπορεί να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι των κινασών PI3K/Akt, κυρίως με στόχο τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κινητικότητας, της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης [127-129]. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι η δράση των PI3K/Akt καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το παρακείμενο μικρο-περιβάλλον και μεσολαβείται, εν μέρει τουλάχιστον, από διάφορες ισομορφές τόσο της PI3K (p85α, p110α και p110β) όσο και της Akt (Akt1, Akt2 και Akt3), υπό την επίδραση του εκάστοτε ερεθίσματος [128, 130, 131]. Οι ισομορφές της Akt κωδικοποιούνται από γονίδια τοποθετημένα σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ενώ φαίνεται να μοιράζονται περίπου 80% ομοιότητα στις αμινοξικές αλληλουχίες τους και να σχηματίζουν παρόμοια δομή πρωτεΐνης που περιλαμβάνει μία αμινοτελική περιοχή με ομολογία πλεξτρίνης (PH), μία καταλυτική και μία καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή [128, 132]. Το μονοπάτι PI3K/Akt ενεργοποιείται κατωροϊκά (*downstream*) του υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) μέσω σύνδεσης της SH2 περιοχής της ρυθμιστικής υπομονάδας (p85) της PI3K με τις φωσφοτυροσίνες των διαμεσολαβητών και υποστρωμάτων των υποδοχέων IRS1/2. Αυτό οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K (p110), η οποία, εν συνεχεία, μετατρέπει την PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) στην PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) στην πλασματική μεμβράνη. Η Akt προσδέεται στην PIP3 μέσω της PH περιοχής της και έτσι διευκολύνεται η ενεργοποίησή της από ανωροϊκές (*upstream*) κινάσες. Εν αρχή, η PDK1 επάγει κατά περίπου 10% τη δράση της Akt, αφού μπορεί και την φωσφορυλιώνει στη θέση θρεονίνη 308 (*Thr<sup>308</sup>*) της καταλυτικής περιοχής. Επακόλουθα, το σύμπλοκο mTORC2 (PDK2), η DNA-PK και η ATM κινάσες επάγουν την πλήρη δραστηριότητα της Akt, φωσφορυλιώνοντάς την στη θέση σερίνη 473 (*Ser<sup>473</sup>*) της ρυθμιστικής περιοχής [127, 128].

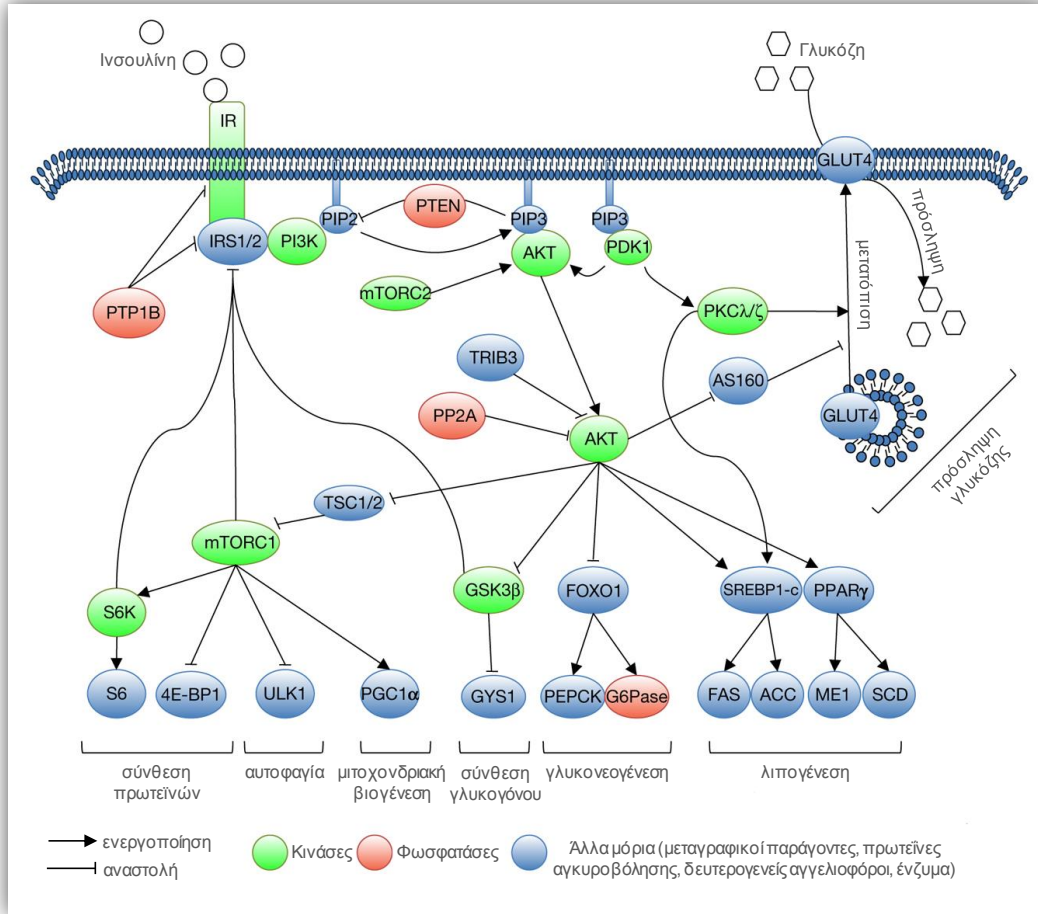
Η ενεργοποίηση της Akt προκαλεί την αποδέσμευσή της από την πλασματική μεμβράνη και την επακόλουθη μετατόπισή της στα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα. Εκεί, η Akt φωσφορυλιώνει τα ποικίλα υποστρώματά της που εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του

κυττάρου, όπως την GSK-3 $\beta$  κινάση, τον μεταγραφικό παράγοντα FoxO1 και την πρωτεΐνη AS160 (TBC1D4), τα οποία ρυθμίζουν τη σύνθεση του γλυκογόνου, τη γλυκονογένεση και την πρόσληψη της γλυκόζης, αντίστοιχα. Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες όταν φωσφορυλιώνονται, εξέρχονται από τον πυρήνα και έτσι παρεμποδίζεται η σηματοδότηση για κυτταρική απόπτωση (για παράδειγμα, αναστέλλεται η δράση του FasL), με αποτέλεσμα να προάγεται η επιβίωση των κυττάρων [127-129]. Αντι-αποπτωτικά υποστρώματα της Akt συνιστούν και οι πρωτεΐνες Bad και MDM2, καθώς η φωσφορυλίωση της Akt οδηγεί στην απενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού μορίου Bad και την ενεργοποίηση του MDM2 [127, 133].

Η Akt ενεργοποιεί, επίσης, το σύμπλοκο mTORC1, μέσω της λειτουργικής αδρανοποίησης των TSC1/2 πρωτεϊνών. Το ενεργοποιημένο αυτό σύμπλοκο ενισχύει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, καταστέλλει την αυτοφαγία και επάγει τη σύνθεση των πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας την PGC1 $\alpha$ , την ULK1 και τους S6K και 4E-BP1 πρωτεϊνοσυνθετικούς καθοριστές, αντίστοιχα (**Εικόνα 1.29**).

Η PDK1 ενεργοποιεί εκτός από την Akt και ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης PKC $\lambda/\zeta$ , οι οποίες απαιτούνται για την GLUT4-εξαρτώμενη ρύθμιση της πρόσληψης γλυκόζης. Επιπλέον, οι Akt και PKC $\lambda/\zeta$  κινάσες φαίνεται να ελέγχουν την εκ νέου (*de novo*) λιπογένεση, μέσω της ρύθμισης λιπογόνων γονιδίων, όπως των SREBF1 και PPAR $\gamma$ .

Το μονοπάτι Ινσουλίνη/PI3K/Akt ρυθμίζεται αρνητικά σε πολλαπλά επίπεδα. Φωσφατάσες, όπως η PTPN1, η PTEN και η PP2A, αποφωσφορυλιώνουν και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλουν τη δράση του υποδοχέα της ινσουλίνης (*IR*) και τα υποστρώματα αυτού (*IRS1/2*), την PIP3 και την Akt καταωροϊκή κινάση, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ανάδρομη αρνητική ρύθμιση εμπλέκεται στο ως άνω μονοπάτι, καταλήγοντας στη μειορρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, καθώς η GSK-3 $\beta$ , το σύμπλοκο mTORC1 και η κινάση S6 (*S6K*) δύνανται να φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (*IRS*) σε διακριτά κατάλοιπα σερίνης τα οποία οδηγούν στην ουμπικουϊτινίωση (*ubiquitination*) και ακόλουθη πρωτεολυτική υδρόλυση αυτών (*IRS1/2*) (**Εικόνα 1.29**) [128, 134, 135].



**Εικόνα 1.29** Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt έπειτα από διέγερση με ινσουλίνη, καθώς και τα υποστρώματα αυτού που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των κυττάρων [128].

### 1.3.3 Κυτταρική σηματοδότηση μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK

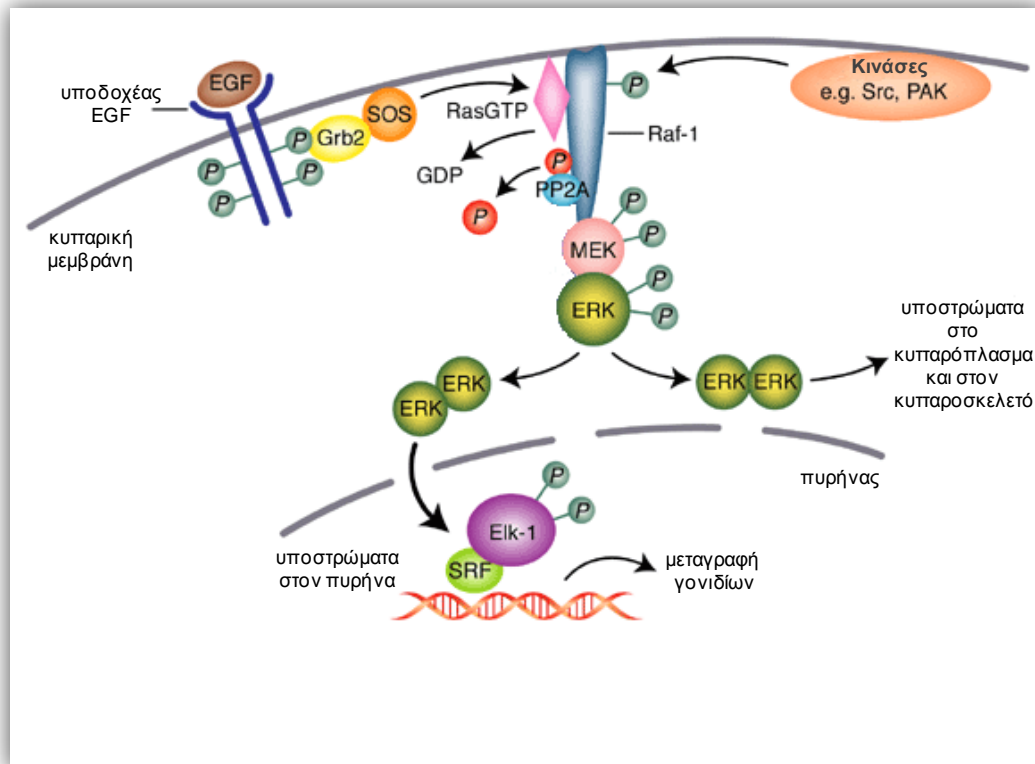
Οι ενεργοποιημένες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες MAPK συνιστούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες μετασχηματίζουν εξωτερικά ερεθίσματα σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών αποκρίσεων. Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ποικίλα MAPK μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν συγχρόνως την γονιδιακή έκφραση, τη μίτωση, τον μεταβολισμό, την κινητικότητα, την επιβίωση, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Στα θηλαστικά, δεκατέσσερις MAPKs έχουν χαρακτηριστεί και ταξινομηθεί σε επτά ομάδες. Οι τέσσερις μεγάλες ομάδες των συμβατικών MAPKs περιλαμβάνουν τις οικογένειες ERK1/2, p38 MAPK (p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), JNK1/2/3 και ERK5. Κάθε τέτοια ομάδα συντίθεται από μία σειρά τριών εξελικτικά συντηρημένων, με διαδοχική δράση, κινασών: μία MAPK, μία κινάση της MAPK (MAPKK) και μία



κινάση της MAPKK (*MAPKKK*). Το μονοπάτι των MAPK κινασών ERK1/2 ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο επιδερμικός (*EGF*), ο παραγόμενος από αιμοπετάλια (*PDGF*), ο νευρικός (*NGF*) και ο ινοβλαστικός (*FGF*) αυξητικός παράγοντας. Ενεργοποιείται, επίσης, από κυτ(ταρ)οκίνες, από πληθώρα υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (*RTKs*), καθώς και σε απόκριση στην ινσουλίνη, στο οσμωτικό στρες και στην αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων. Στα θηλαστικά, το σύστημα των ERK1/2 κινασών περιλαμβάνει τις MAPKKKs A-Raf, B-Raf και Raf-1 (c-Raf), τις MAPKKs MEK1 και MEK2, και τις MAPKs ERK1 και ERK2 [136-144].

Η αρχή της σηματοδότησης εντοπίζεται στη δέσμευση του προσδέτη στον αντίστοιχο ομοειδή υποδοχέα και στον επακόλουθο διμερισμό αυτού, που θα οδηγήσει στην αυτο-φωσφορυλίωσή του σε κατάλοιπα τυροσίνης στην ενδοκυτταρική περιοχή. Η πρόσδεση της Grb2 πρωτεΐνης-«προσαρμοστή-γέφυρα» (*adaptor-bridge*) στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα προκαλεί τη μετακίνηση στο σύμπλεγμα του υποδοχέα της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Sos, καθώς και την επακόλουθη ενεργοποίησή της. Στην ενεργή αυτή μορφή, συνδέεται διαδοχικά ο ενδιάμεσος πρωτεϊνικός σηματοδότης Ras επάγοντας την ανταλλαγή του GDP με GTP. Η πρωτεΐνη Ras δρα ως ένας μοριακός διακόπτης της μεταγωγής του βιολογικού σήματος και εναλλάσσεται μεταξύ δύο βασικών μορφών· της ανενεργούς μορφής, κατά την οποία η Ras βρίσκεται συνδεδεμένη με GDP και της ενεργούς αντίστοιχης όταν εντοπίζεται προσδεδεμένη με GTP. Έναν από τους βασικότερους στόχους της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης Ras (Ras-GTP) συνιστά η κυτταροπλασματική κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf-1, το πρώτο μέλος της οικογένειας που μεταφέρει το βιολογικό σήμα από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση της Raf-1 αποτελεί μία διαδικασία που περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση των θέσεων που προκαλούν αναστολή, από τη φωσφατάση PP2A, καθώς και την ταυτόχρονη φωσφορυλίωση των θέσεων που προκαλούν ενεργοποίηση, από τις κινάσες PAK και Src. Η ενεργοποιημένη κινάση Raf-1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τα μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας των MAPKK/MEK κινασών, με χαρακτηριστικότερους αντιπροσώπους τις πρωτεΐνες MEK1 και MEK2, οι οποίες διαδοχικά φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAPK/ERK(1/2) κινάσες. Οι ενεργοποιημένες ERK κινάσες έχουν πολλά υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα, όπως για παράδειγμα τις κινάσες τύπου DAPK και την πρωτεΐνη TSC2, ενώ άλλα υποστρώματα έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τις

κυτταρικές μεμβράνες (CD120a, καλνεξίνη) και τον κυτταροσκελετό (παξιλλίνη, νευροϊνίδια). Ένας υπο-πληθυσμός των ενεργοποιημένων ERK1/2 κινασών μετακινείται στον κυτταρικό πυρήνα, όπου φαίνεται να ρυθμίζει τη δραστηριότητα διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, δια μέσου εκλεκτικής φωσφορυλίωσης, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον Elk (*p-Ser<sup>383</sup>*) (Εικόνα 1.30). Επιπρόσθετα υποστρώματα αυτών αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT3, c-Fos και c-Myc, καθώς και άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Ets [136, 145-147].



**Εικόνα 1.30** Η οργάνωση και λειτουργία του Ras/Raf/MEK/ERK μονοπατιού ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, σχηματικά [146].

### 1.3.4 Σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK

Μία από τις βασικότερες λειτουργίες όλων των κυττάρων είναι η διατήρηση της ενεργειακής ισορροπίας στην παραγωγή και κατανάλωση του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης AMPK αποτελεί έναν υψηλά συντηρημένο «αισθητήρα» (*sensor*) των ενδοκυτταρικών επιπέδων των νουκλεοτιδίων αδενοσίνης και δύναται να ενεργοποιηθεί ακόμα και σε μικρή μείωση σχηματισμού του ATP, γεγονός το οποίο θα οδηγήσει σε σχετική αύξηση των AMP ή ADP ενδοκυτταρικών επιπέδων. Η AMPK κινάση παρεμποδίζει τα αναβολικά

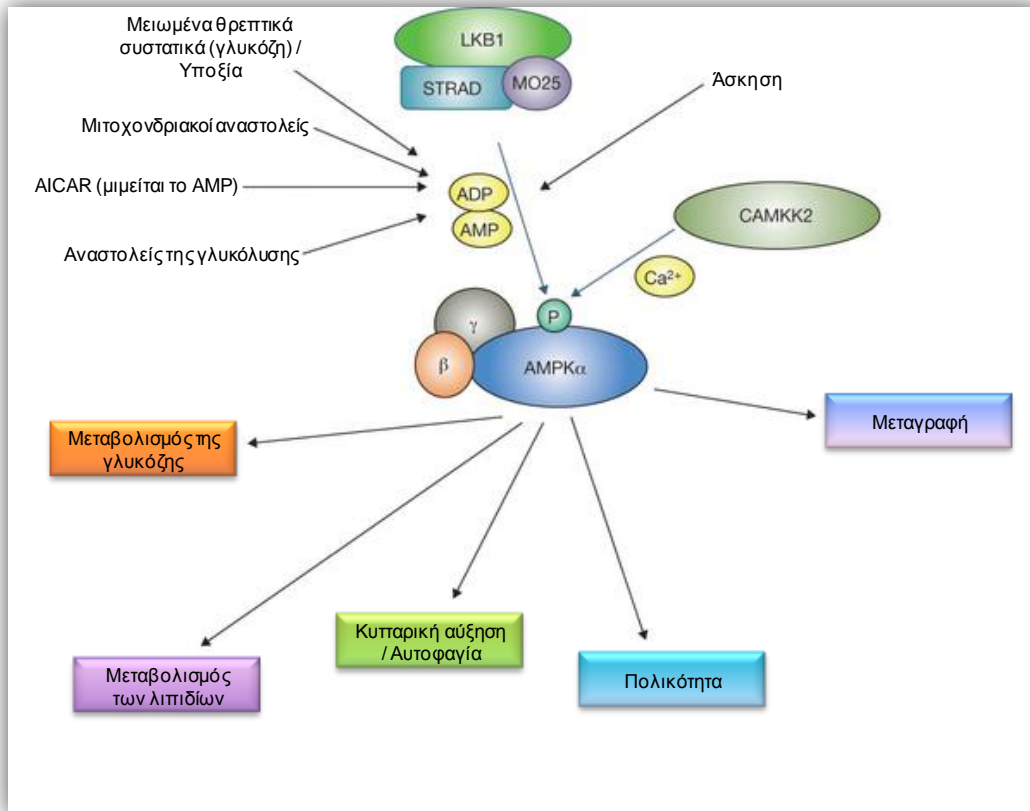
μονοπάτια, ενώ προωθεί και επάγει τα μεταβολικά μονοπάτια με στόχο να παραχθούν περισσότερα μόρια ATP. Επιτρέπει, έτσι, αλλαγές και ομοιοστατικές προσαρμογές στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση και στον κυτταρικό μεταβολισμό κάτω από συνθήκες χαμηλής ενέργειας και ενεργειακού στρες [128, 148-151].

Στα περισσότερα είδη, η AMPK συναντάται ως ετεροτριμερές σύμπλοκο, αποτελούμενο από μία καταλυτική  $\alpha$  και δύο ρυθμιστικές  $\beta$  και  $\gamma$  υπομονάδες. Σε συνθήκες ισχρών ενδοκυτταρικών ATP επιπέδων, τα μόρια AMP ή ADP προσδένονται απευθείας στην  $\gamma$  ρυθμιστική υπομονάδα της AMPK, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες προάγουν τη φωσφορυλίωση της AMPK, καθώς και την προστασία της από ενδεχόμενη αποφωσφορυλίωση, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η παραμονή της στην ενεργή μορφή. Η συγγένεια πρόσδεσης των AMP και ADP στην AMPK είναι 10 φορές πιο ισχυρή σε σχέση με αυτή του ATP, και αυτό γιατί το ATP στα κύτταρα των θηλαστικών βρίσκεται σε ποσοστό 95% συνδεδεμένο με μαγνήσιο (MgATP). Το γεγονός αυτό αντισταθμίζει την υψηλότερη φυσιολογική συγκέντρωση του MgATP. Επίσης, δεδομένου ότι στα κύτταρα των θηλαστικών η συγκέντρωση του ADP είναι 10-100 φορές υψηλότερη από αυτή του ελεύθερου AMP, το ADP φαίνεται να αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ενεργοποίησης της AMPK υπό «μετρίως» ενεργειακά στρεσογόνες συνθήκες. Σε συνθήκες όμως ισχυρού ενεργειακού στρες, τα επίπεδα των μορίων AMP αυξάνονται σημαντικά και η επιπρόσθετη αλλοστερική ενεργοποίηση διαμέσου του AMP δρα ως μηχανισμός διασφάλισης, έτσι ώστε να διαβεβαιώνεται πως όλα τα υποστρώματα της AMPK θα είναι φωσφορυλιωμένα. Πολλά είδη κυτταρικού στρες δύνανται να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση της AMPK, όπως χαμηλά επίπεδα θρεπτικών στοιχείων (για παράδειγμα, γλυκόζη) και οξυγόνου (υποξία), παρατεταμένη άσκηση, καθώς και ποικίλοι φαρμακολογικοί παράγοντες, όπως η μετορμίνη, ο AICAR και η πεμετρεξίδη (**Εικόνα 1.31**). Πάντως, από τις περισσότερες συνθήκες η ενεργοποίηση της AMPK ρυθμίζεται κυρίως από την αναλογία ATP:ADP, μέσω δομικών αλλαγών που συμβαίνουν στη θέση φωσφορυλίωσης του αμινοξικού καταλοίπου θρεονίνη 172 ( $Thr^{172}$ ) [128, 148-156].

Στην κρίσιμη αυτή θέση ( $Thr^{172}$ ), εντός της θηλειάς ενεργοποίησης (*activation loop*), η φωσφορυλίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα από την κινάση σερίνης/θρεονίνης LKB1, ως απόκριση στα αυξημένα επίπεδα AMP ή ADP. Προς μεγάλο ενδιαφέρον, το *LKB1* αποτελεί ογκο-κατασταλτικό γονίδιο, το οποίο

ανιχνεύεται μεταλλαγμένο σε διακριτά είδη καρκίνου (για παράδειγμα, καρκίνου του πνεύμονα και του τραχήλου της μήτρας), προτείνοντας έτσι τον πιθανό ρόλο της AMPK στην καταστολή των όγκων. Επιπρόσθετα, η AMPK δύναται να ενεργοποιηθεί και έμμεσα, μέσω των αλλαγών στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ). Η κινάση CaMKK2 (CaMKKβ) ενεργοποιείται παρουσία υψηλών επιπέδων ιόντων ασβεστίου και διαδοχικά ενεργοποιεί την AMPK μέσω της φωσφορυλίωσής της στη θέση Thr<sup>172</sup>. Παρ' ότι όμως το μονοπάτι αυτό παρέχει έναν ανεξάρτητο από τα νουκλεοτίδια αδενοσίνης μηχανισμό ενεργοποίησης της AMPK, η κάτω από ποικίλες συνθήκες αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο συνάδει με μειωμένα επίπεδα MgATP, υποδηλώνοντας έτσι την παράλληλη και αυστηρά συντονισμένη ρύθμιση της ενεργότητας της AMPK κινάσης [148, 152-154, 157-167].

Τα υποστρώματα της ενεργοποιημένης AMPK είναι ποικίλα και αφορούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου, μέσω της φωσφορυλίωσης της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης p53, καθώς και στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και αυτοφαγίας, μέσω της καταστολής του συμπλόκου mTORC1, εξαιτίας της φωσφορυλίωσης της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης TSC2 στη θέση σερίνη 1387 (*Ser*<sup>1387</sup>) ή της καταστολής της πρωτεΐνης Raptor που ανήκει στο mTORC1 σύμπλεγμα. Η ενεργοποίηση της AMPK ρυθμίζει τον κυτταρικό ενεργειακό μεταβολισμό μέσω της εμπλοκής της στην αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης, επάγοντας τη φωσφορυλίωση και επακόλουθη απομάκρυνση του TBC1D1 ρυθμιστικού μορίου από τα κυτταροπλασματικά κυστίδια της GLUT4 (SLC2A4) πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η μετατόπιση του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη και ως εκ τούτου να εισέρχονται περισσότερα μόρια γλυκόζης ενδοκυτταρικά. Επιπλέον, διαμέσου άμεσης φωσφορυλίωσης διαφόρων λιπασών, η AMPK ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων. Εμπλέκεται, ακόμα, μέσω φωσφορυλίωσης αντίστοιχων υποστρωμάτων στη ρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας, μετανάστευσης, κυτταροσκελετικής δυναμικής, βιογένεσης μιτοχονδρίων, καθώς και στη διαδικασία μεταγραφής γονιδίων που ελέγχουν τη γλυκονεογένεση, μέσω φωσφορυλίωσης αντίστοιχων μεταγραφικών καθοριστών. Συγκεκριμένα, η ενεργή AMPK καταστέλλει την παραγωγή γλυκόζης, σε μία προσπάθεια να διατηρήσει την ομοιόσταση αυτής εντός του κυττάρου [148, 152, 153, 168-172].



Εικόνα 1.31 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της AMPK, σχηματικά [148].

### 1.3.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 σε θεμελιώδη ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης

Το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο *p53*, το οποίο έχει ανακαλυφθεί εδώ και περίπου 35 χρόνια, κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του καρκίνου. Η αντίστοιχη ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη συμμετέχει καθοριστικά στην απάντηση σε ποικίλους στρεσογόνους παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η καταστροφή του DNA, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η υποξία και η ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Η ενεργοποίηση της *p53* δύναται να επάγει πληθώρα αποκρίσεων, οι οποίες συμβάλλουν στην καταστολή του όγκου, είτε αποτρέποντας ή επιδιορθώνοντας γονιδιωματικές βλάβες, είτε εξαλείφοντας, μέσω απόπτωσης, πιθανά ογκογόνα κύτταρα από τον αναπτυσσόμενο πληθυσμό [173-179].

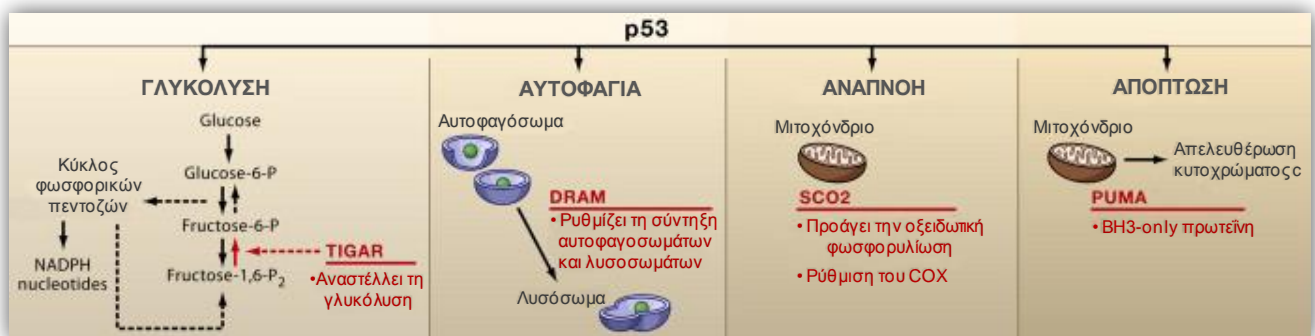
Την «καρδιά» του μονοπατιού της *p53*, αποτελεί το παλίνδρομο και αυτο-ρυθμιζόμενο σύμπλοκο *p53-MDM2*, όπου αυξημένα επίπεδα *p53* οδηγούν στην πρόσδεση αυτής στον υποκινητή του *MDM2*, με αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση έκφρασης του εν λόγω γονιδίου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη *MDM2*

αλληλεπιδρά φυσικά με την p53 και την καταστέλλει μέσω ουμπικουϊτινίωσης και επακόλουθης αποικοδόμησής της στο πρωτεάσωμα (*proteasome*). Όταν όμως οι στρεσογόνοι παράγοντες βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, η πρόσδεση της MDM2 με την p53 αναιρείται εξαιτίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιδίων πρωτεϊνών και έτσι επιτρέπεται στην p53 να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και να ενεργοποιήσει τα γονίδια στόχους της, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες και ανάγκες του κυττάρου. Κάτω από ήπιες συνθήκες στρες, τα χαμηλά επίπεδα της p53 είναι ικανά να επάγουν την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου (όπως το *p21<sup>Cip1/Waf1</sup>*, του οποίου η πρωτεΐνη προσδένεται και αναστέλλει τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK, οι οποίες ελέγχουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου), στην επιδιόρθωση του DNA (*p53R2*) και στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (*σεστρίνες* και *GPX1*), επιτρέποντας έτσι την κυτταρική επιβίωση. Έπειτα από εκτεταμένο στρες ή ανεπανόρθωτη βλάβη του DNA, τα αυξημένα επίπεδα της p53 οδηγούν στην επαγωγή προ-οξειδωτικών γονιδίων (*PIG3* και *οξειδάση της προλίνης*) και στην καταστολή της μεταγραφής κάποιων αντι-οξειδωτικών γονιδίων (*PGM* και *NQO1*), με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή επιπέδων ROS (*reactive oxygen species*) ενδοκυτταρικά, και συνεπώς τον κυτταρικό θάνατο ή την κυτταρική γήρανση. Αδυναμία επαγωγής των παραπάνω αποκρίσεων μέσω της ενεργοποίησης της p53 οδηγεί στην ογκογένεση. Η p53 εμπλέκεται στην απόπτωση και μέσω επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων *Fas*, *Bax* και *PUMA* οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* (*cytochrome c*) από τα μιτοχόνδρια και τελικά στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [174, 176, 177, 180-183].

Η p53 σχετίζεται άμεσα και ισχυρά με το μεταβολισμό του κυττάρου, καθώς ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιεί γονίδια που δραστηριοποιούνται σε κρίσιμες μεταβολικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης και η μιτοχονδριακή αναπνοή μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθώς και σε διαδικασίες που συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με το μεταβολισμό, όπως είναι η αυτοφαγία (**Εικόνα 1.32**). Στο πρώτο μεταβολικό μονοπάτι εμπλέκεται το γονίδιο *TIGAR*, το οποίο ενεργοποιείται από την p53, ενώ το προϊόν αυτού μπορεί να παρεμποδίζει τη γλυκόλυση, προωθώντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάβαση στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών για την παραγωγή NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*). Συμμετέχει επίσης, το γονίδιο που κωδικοποιεί το PGM γλυκολυτικό ένζυμο, το οποίο μειορρυθμίζεται από την p53, ενώ το προϊόν αυτού

συνιστά έναν καθοριστικό ρυθμιστή που ενισχύει τη γλυκόλυση και ελαττώνει τα επίπεδα ROS. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των γλυκολυτικών μεταφορέων GLUT1, GLUT3 και GLUT4, φαίνεται να ελαττώνονται σημαντικά έπειτα από ρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων τους από την ενεργή p53. Παρατηρείται, λοιπόν, σαφής παρεμπόδιση της πρόσληψης γλυκόζης έπειτα από τη δράση της φυσικού τύπου (*wild-type*) p53. Η μεταλλαγμένη (*mutant*) μορφή της p53, όμως, έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιεί το γονίδιο *HK2*, το προϊόν του οποίου αποτελεί βασικό ένζυμο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, μετατρέποντας τη γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μετέχει και το γονίδιο *SCO2*, το οποίο ενεργοποιούμενο από την p53 ενισχύει την κατανάλωση οξυγόνου για παραγωγή ενέργειας και την μιτοχονδριακή αναπνοή, ρυθμίζοντας τη συγκρότηση της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (*COX*). Επιπλέον, η θετική ρύθμιση του γονιδίου *GLS2* από την p53 ενισχύει τη λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος. Επιπρόσθετα, η p53 στοχεύει το γονίδιο *DRAM*, το προϊόν του οποίου συμμετέχει καταλυτικά στην αυτοφαγία διαμεσολαβώντας στη σύντηξη του λυσοσώματος με το αυτοφαγόσωμα [183-197].

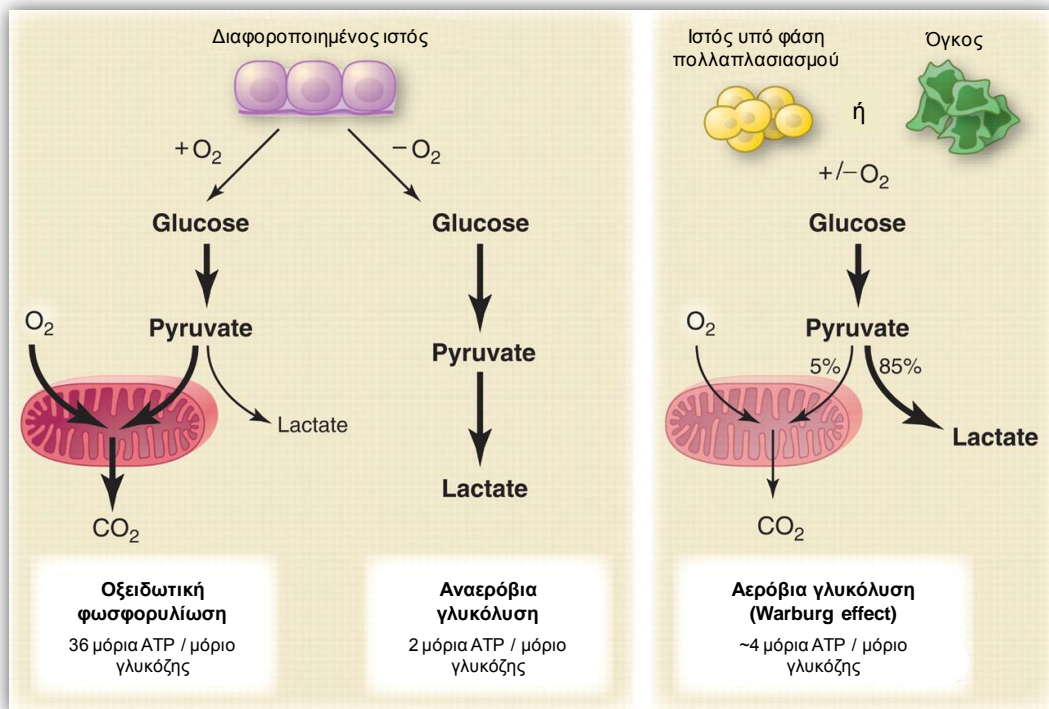
Τέλος, ενώ ο πιο γνωστός τρόπος δράσης της p53 είναι μέσω της λειτουργίας της ως μεταγραφικός παράγοντας, σχετικά πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως η p53 μετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης και μέσω αλληλεπίδρασής της με επιλεγμένες προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας Bcl-2, προκαλώντας μεγάλη διαπερατότητα στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συνεπώς απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* [181, 198, 199].



**Εικόνα 32.** Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της p53 και μερικά από τα κρίσιμα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του κυττάρου [187].

### 1.3.6 Φαινόμενο Warburg – Μεταβολισμός καρκίνου

Οι μεταβολικές αλλαγές, γνωστές και ως φαινόμενο Warburg (*Warburg effect*, *Otto Warburg, Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1931*), στην πραγματικότητα αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των καρκίνων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά κύτταρα είναι εξαρτώμενα για την παραγωγή ενέργειας από τη γλυκόλυση. Η αλλαγή αυτή και η ενίσχυση της διαδικασίας της γλυκόλυσης χρήζεται απαραίτητη για την εξέλιξη της κακοήθειας και παρατηρείται ακόμα και σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, γεγονός που οδήγησε και στον χαρακτηρισμό αυτής ως αερόβια γλυκόλυση. Η ύπαρξή της είναι απαραίτητη για την αύξηση και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να προκαλεί όμως αναγκαστικά την εκ νέου ανάπτυξη όγκου. Αν και τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα διατηρούν την ικανότητά τους να παράγουν ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων, η παρεμπόδιση του γλυκολυτικού μονοπατιού αποβαίνει συχνά ιδιαίτερα επιβλαβής για την καρκινική κυτταρική ανάπτυξη (**Εικόνα 1.33**) [174, 183, 200-209].



**Εικόνα 1.33** Σχηματική αναπαράσταση των βασικών διαφορών μεταξύ της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της αναερόβιας γλυκόλυσης και της αερόβιας γλυκόλυσης (*Warburg effect*) [209].

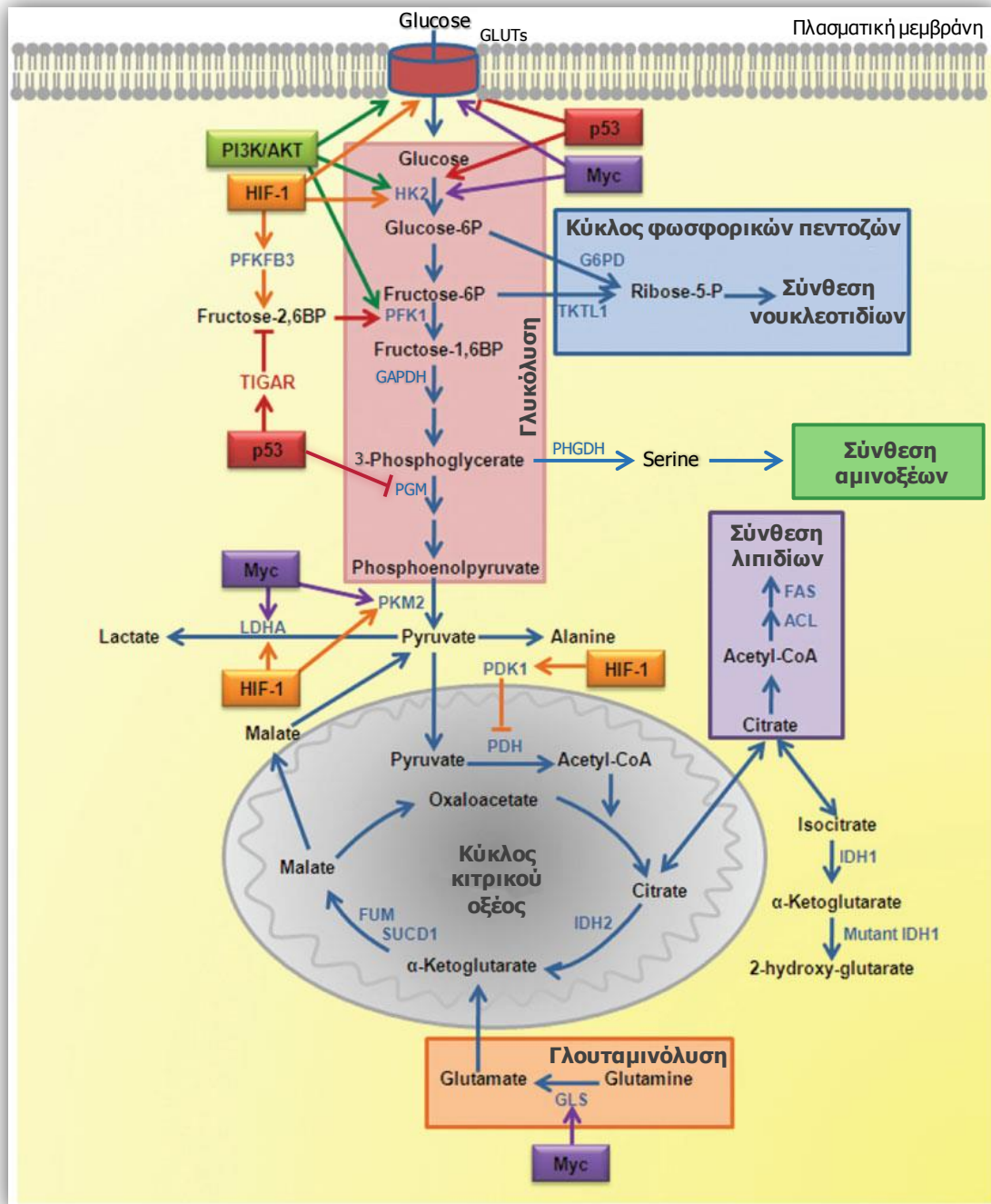


Η διαδικασία της γλυκόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο μορίων ATP για κάθε μόριο γλυκόζης, εξαιτίας του ότι το πυροσταφυλικό οξύ (*pyruvate*) που παράγεται στο τελευταίο στάδιο μεταβολίζεται σε λακτικό οξύ (*lactate*). Σε αντίθεση, όταν το πυροσταφυλικό μετατραπεί σε ακέτυλο-συνένζυμο Α (*Acetyl-CoA*) μέσα στο μιτοχόνδριο, τότε εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και συνεπώς μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης απελευθερώνονται 36 μόρια ATP (**Εικόνα 1.33**).

Δημιουργείται λοιπόν εύλογα η απορία γιατί τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση έντονου πολλαπλασιασμού, συνεπώς και τα καρκινικά κύτταρα, προτιμούν την αερόβια γλυκόλυση ως τον κύριο τρόπο παραγωγής ενέργειας. Οι πρώτες εκτιμήσεις θεωρούσαν ότι η μεταστροφή στη γλυκόλυση συνέβαινε εξαιτίας μιτοχονδριακής ανεπάρκειας των εν λόγω κυττάρων, εικασία η οποία όμως δεν υποστηρίχθηκε περαιτέρω, καθώς πολλές μελέτες αποδείκνυαν τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων σε κύτταρα τα οποία μετέβαιναν στο μονοπάτι της γλυκόζης ως βασικό τρόπο παραγωγής μορίων ATP. Μία κυρίαρχη αιτία λοιπόν της μεταστροφής αυτής αποτελεί το γεγονός ότι η διαδικασία της γλυκόλυσης είναι μεν λιγότερο αποδοτική αλλά πολύ πιο γρήγορη. Επίσης, γίνεται προσπάθεια από τα κύτταρα για ελάττωση του βαθμού εξάρτησής τους από τη μιτοχονδριακή λειτουργία, και ως εκ τούτου για απόκτηση δυνατότητας διαφυγής του εξαρτώμενου από το μιτοχόνδριο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, τύπου απόπτωσης, ο οποίος ενδεχομένως συνοδεύεται από την παραγωγή και απελευθέρωση στο κυτταροπλασματικό περιβάλλον τοξικών βιομορίων, όπως για παράδειγμα ελεύθερων ριζών οξυγόνου (*ROS*), αλλά και κυτοχρώματος *c*. Επιπρόσθετα, σημαντική λειτουργία της γλυκόλυσης είναι και η σύνθεση βιολογικών μακρομορίων, καθώς μέσω των ενδιάμεσων προϊόντων που παράγονται από τη διαδικασία αυτή τροφοδοτούνται επικουρικά (πλευρικά) μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία οδηγούν στη βιοσύνθεση σημαντικών μικρομορίων για το διπλασιασμό των κυττάρων, όπως νουκλεοτίδια, αμινοξέα και λιπίδια (**Εικόνα 1.34**) [174, 206, 207, 209-211].

Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη γλυκολυτική διαδικασία ως ένα μέσο προσαρμογής τους στις ενεργειακές απαιτήσεις του μικρο-περιβάλλοντος των υποξικών συνθηκών και της μειωμένης παροχέτευσης τροφικών συστατικών, με μόριο-κλειδί τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, ο οποίος εμπλέκεται στην ενίσχυση της γλυκόλυσης σε βάρος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενέργειας. Τέλος, μεταλλαγές ή ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA

(*mtDNA*), καθώς και μεταλλαγές στο πυρηνικό DNA (*nDNA*) δύνανται να οδηγήσουν σε μιτοχondριακή δυσλειτουργία και προώθηση του γλυκολυτικού φαινοτύπου, ενώ το ίδιο το μονοπάτι ενισχύεται από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων, όπως τα *Ras*, *Src*, *PI3K/Akt*, *c-Myc* και *Bcr-Abl*, και την απενεργοποίηση επιλεγμένων ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, όπως το *p53* [174, 204, 207, 209-217].



**Εικόνα 1.34** Το μονοπάτι της γλυκόλυσης, τα βασικότερα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτό, καθώς και οι (πλευρικές) αλληλεπιδράσεις με άλλα μονοπάτια του μεταβολισμού του κυττάρου. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα ένζυμα που λαμβάνουν χώρα στις αντίστοιχες διεργασίες (τροποποιημένο από [210]).

Σύμφωνα με τις παραπάνω θεωρίες, υποθέσεις και αποδείξεις, γίνεται αντιληπτό ότι ενδεχόμενη παρεμπόδιση της γλυκολυτικής διαδικασίας θα επηρέαζε άμεσα το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στο ως άνω μονοπάτι αποτελούν πιθανούς και πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους. Μεταξύ των γλυκολυτικών ενζύμων των οποίων η καταστολή θα σηματοδοτούσε την παρεμπόδιση της γλυκόλυσης συγκαταλέγονται η εξωκινάση II (*HK2*), η οποία μετατρέπει τη γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη κατά το πρώτο στάδιο, η φωσφο-φρουκτοκινάση (*PFK*), η *GAPDH* και η λακτική αφυδρογονάση (*LDH*) [211, 212, 218].

### 1.3.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Ο προγραμματισμένος, ή ρυθμιζόμενος, κυτταρικός θάνατος (*programmed cell death, PCD*) συνιστά θεμελιώδη κυτταρική απόκριση, η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της ανάπτυξης και διατήρησης της ομοιόστασης, μέσω αποβολής ανεπιθύμητων ή κατεστραμμένων κυττάρων. Η πρώτη εκτενής μελέτη της ύπαρξης και μορφολογίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε υγιείς ιστούς διεξήχθη 40 χρόνια πριν από τον Kerr και τους συνεργάτες του, οι οποίοι επινόησαν και τον όρο απόπτωση. Τις τελευταίες, όμως, δεκαετίες, νέες μέθοδοι και εντατικές έρευνες σε πληθώρα κυτταρικών σειρών, καρκινικών ή μη, οι οποίες φέρουν ελλιπή ή ελαττωματικά στοιχεία του αποπτωτικού μηχανισμού, αποκάλυψαν ποικίλα και συνεχώς αυξανόμενα σε αριθμό κυτταρικά μονοπάτια θανάτου, ανεξάρτητα από την απόπτωση, με διακριτά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η αυτοφαγία και η προγραμματισμένη νέκρωση (νεκρόπτωση) [219-223].

#### 1.3.7.1 Απόπτωση

Είναι πλέον ευρέως παραδεκτό, ότι η απόπτωση (*apoptosis*), σε αντίθεση με τη νέκρωση (*necrosis*), συνιστά μία γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία (απαιτεί κατανάλωση ATP), που συμμετέχει καταλυτικά στην ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία ενός μεγάλου αριθμού ιστών. Αποτελεί μία εξελικτικά συντηρημένη κυτταρική λειτουργία που συναντάται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς,

από τον Νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* έως τον άνθρωπο. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος διακρίνεται από χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα που περιλαμβάνουν τη συρρίκνωση του κυττάρου, το θρυμματισμό (κατακερματισμό) του πυρηνικού DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών (*DNA laddering*), τη συμπύκνωση της χρωματίνης του κυτταρικού πυρήνα, τη δημιουργία οπών (πόρων-διαύλων) μεγάλης διαμέτρου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, την εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (*blebbing*) στην κυτταρική μεμβράνη και τον σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων (φαγοσωμάτων), τα οποία περιέχουν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υπολείμματα. Τα νεκρά κύτταρα απομακρύνονται ταχέως από γειτονικά μακροφάγα, προστατεύοντας ως εκ τούτου τους παρακείμενους ιστούς από πιθανές φλεγμονές και άλλες καταστροφικές αλλοιώσεις. Ανεπαρκής ή δυσλειτουργική απόπτωση οδηγεί στην εκδήλωση ασθενειών, όπως καρκίνο και αυτοανοσία, ενώ επιταχυνόμενος κυτταρικός θάνατος εκδηλώνεται σε εκφυλιστικές ασθένειες, περιπτώσεις ανοσο-ανεπάρκειας και υπογονιμότητας [147, 219, 224, 225].

Η απόπτωση διεξάγεται κυρίως με τη διαμεσολάβηση των Κασπασών, οι οποίες συνιστούν μία εξελικτικά συντηρημένη πρωτεϊνική οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεασών, που διακρίνονται από την παρουσία κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο και από την υψηλή συγγένεια σύνδεσης με κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στα υποστρώματα στόχους. Οι Κασπάσες ανιχνεύονται με τη μορφή πρόδρομων ανενεργών προ-ενζύμων (ζυμογόνων), όπου η μετατροπή τους σε καταλυτικά ενεργές Κασπάσες, δια μέσου εκλεκτικής πρωτεόλυσης, συνιστά ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα έναρξης της απόπτωσης [147, 224, 225].

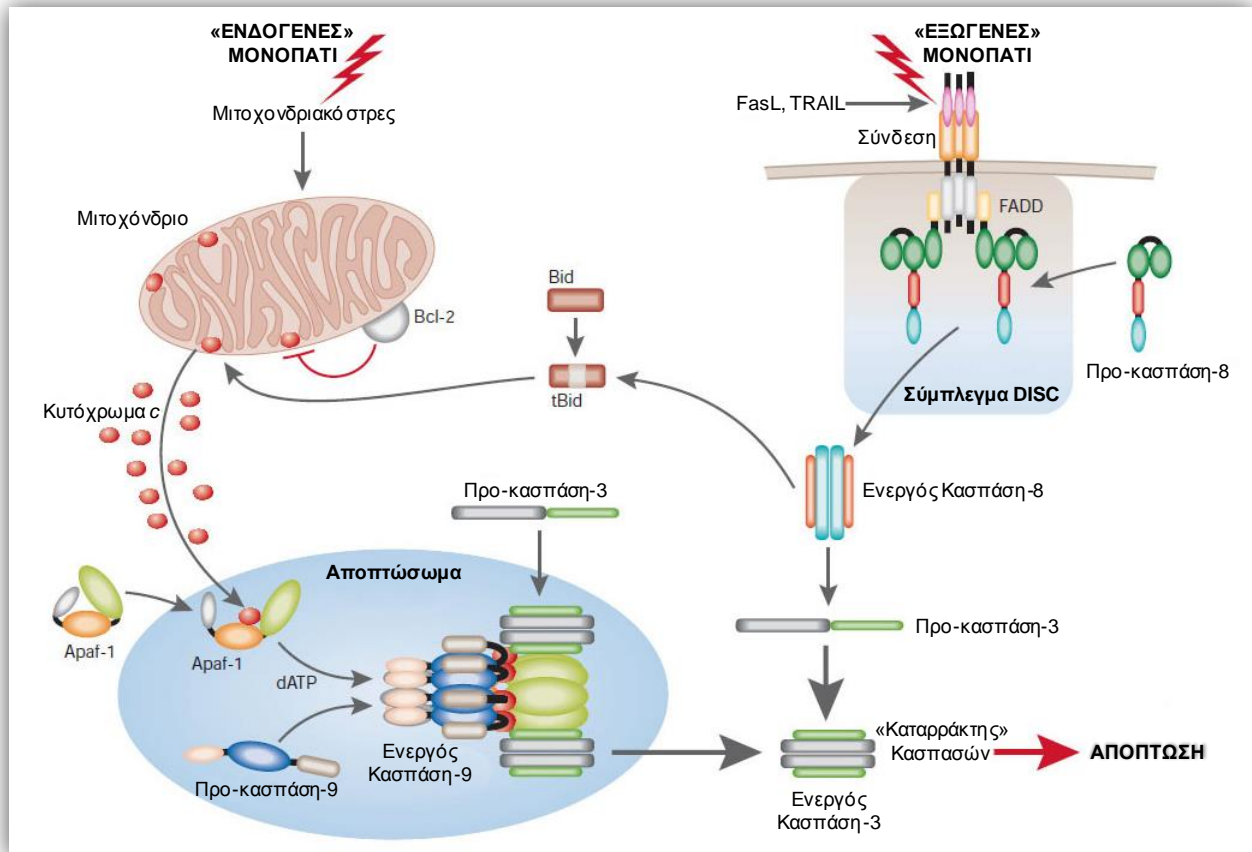
Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν δύο βασικά μονοπάτια της απόπτωσης: το «εξωγενές» ή υποδοχο-μεσολαβούμενο μονοπάτι και το «ενδογενές» ή μιτοχονδριο-εξαρτώμενο μονοπάτι, με την πιθανότητα όμως επικάλυψης των δύο αυτών μονοπατιών [219, 220, 224, 226-228].

Ο όρος «εξωγενές» μονοπάτι (*extrinsic pathway*) χρησιμοποιήθηκε για να χαρακτηρίσει τον αποπτωτικό θάνατο ο οποίος επάγεται από εξωκυττάρια σήματα στρες, τα οποία αναγνωρίζονται και μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου από ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου (*death receptors*). Η αρχή της «εξωγενούς» απόπτωσης σηματοδοτείται με τη σύνδεση εξωκυττάρων προσδετών θανάτου (*death ligands*), όπως οι FasL (CD95L), TNF $\alpha$  και TRAIL στους αντίστοιχους ομοειδείς υποδοχείς τους Fas (CD95), TNFR1 και TRAILR1-2 (γνωστά

και ως DR4 και DR5, αντίστοιχα). Η εκλεκτική αυτή σύνδεση οδηγεί στον τριμερισμό του εκάστοτε υποδοχέα και στην επακόλουθη ενεργοποίησή του, καθώς στο κυτταροπλασματικό του τμήμα αποκαλύπτεται μία περιοχή που ονομάζεται «επικράτεια θανάτου» (*death domain*), με την οποία αλληλεπιδρά η ενδιάμεση πρωτεΐνη-«προσαρμοστής-γέφυρα» FADD (για τον Fas και TRAILR1-2) ή TRADD (για τον TNFR1). Ακολουθεί η σύνδεση της πρόδρομης μορφής της εναρκτήριας Κασπάσης-8 (Προ-κασπάση-8 ή Προ-κασπάση-10) στο σύμπλεγμα του υποδοχέα (το οποίο στην περίπτωση των Fas και TRAILR1-2 είναι γνωστό και ως DISC) και η επακόλουθη πρόκληση της αυτο-πρωτεόλυσής της σε ενεργό Κασπάση-8 (ή ενεργό Κασπάση-10). Εν συνεχεία, η ενεργή Κασπάση απελευθερώνεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, όπου αναγνωρίζει και πρωτεολύει εκλεκτικά τα υποστρώματα στόχους της, όπως την Προ-κασπάση-3. Η ενεργός Κασπάση-3 [Κασπάση τελεστής, *effector caspase*] οδηγεί στην πρωτεόλυση και διαδοχική ενεργοποίηση των Προ-κασπασών 6 και 7, καθώς και στον σύγχρονο δομικό ακρωτηριασμό, μέσω στοχευμένης πρωτεόλυσης, και στην τελική λειτουργική απενεργοποίηση των πρωτεϊνών στόχων του ρεπερτορίου των Κασπασών (*caspase repertoire*) PARP, Lamin A/C, ICAD και πηκτωλυματίνη [147, 219, 220, 224, 225]. Εναλλακτικά, η ενεργός Κασπάση-8 πρωτεολύει την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bid, η οποία αποτελεί μία BH3-only πρωτεΐνη και ανήκει στην Bcl-2 υπερ-οικογένεια των θηλαστικών. Μέσω της πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης Bid δημιουργείται το ενεργό καρβοξυτελικό θραύσμα tBid (*truncated Bid*), το οποίο μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο, όπου τροποποιεί τη λειτουργία και κατανομή της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, καθιστώντας διαπερατή την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και επιτρέποντας την διαδοχική απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτταρόπλασμα και την επακόλουθη δρομολόγηση γεγονότων, όπως τη μετατροπή της Προ-κασπάσης-9 σε Κασπάση-9, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στον «ενδογενή» μηχανισμό. Με τον τρόπο αυτό γίνεται έκδηλη η αλληλεπίδραση των δύο μονοπατιών της απόπτωσης, «εξωγενούς» και «ενδογενούς», με τελικό σκοπό τον γονιδιακά ελεγχόμενο κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 1.35**) [147, 219, 220, 224, 225, 228-235].

Ο θάνατος των κυττάρων δια μέσου της απόπτωσης προκαλείται από μία πληθώρα ενδοκυτταρικών στρεσογόνων συνθηκών, όπως η καταστροφή του DNA, το οξειδωτικό στρες, οι μεγάλες ποσότητες ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) στο κυτοσόλιο και

η συσσώρευση ανορθόδοξα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Αν και οι σηματοδοτικοί «καταρράκτες» (*signaling cascades*) που ενεργοποιούν το «ενδογενές» μονοπάτι (*intrinsic pathway*) της απόπτωσης χαρακτηρίζονται από ετερογένεια όσον αφορά στη διαφορικότητα του αρχικού ερεθίσματος, όλοι συνδέονται με μηχανισμούς που έχουν ως επίκεντρο το μιτοχόνδριο.



**Εικόνα 1.35** Σχηματική απεικόνιση του «ενδογενούς» και «εξωγενούς» μονοπατιού της απόπτωσης που οδηγούν στην ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών [225].

Οι σηματοδοτήσεις μέσω προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων συγκλίνουν στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία καθίσταται διαπερατή όταν τα πρώτα (προ-αποπτωτικά) κυριαρχούν στα δεύτερα (αντι-αποπτωτικά) ρυθμιστικά στοιχεία, μέσω του ακόλουθου μηχανισμού. Οι προ-αποπτωτικοί BH3-only παράγοντες προσδέονται και ανταγωνίζονται τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> και Mcl-1), τα οποία δραστηριοποιούνται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η δράση των αντι-αποπτωτικών αυτών

πρωτεϊνών έγκειται στην προστασία του μιτοχονδρίου από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 υπερ-οικογένειας Bax και Bak, οι οποίες δημιουργούν ολιγομερείς διαύλους, με αποτέλεσμα την καταστροφή του μιτοχονδρίου και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτοσόλιο. Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα *c* συνδέεται ισχυρά με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1, προκαλώντας τον «ολιγομερισμό» και τη διαδοχική ενεργοποίησή της. Η σύνδεση αυτή (παρουσία ATP ως συμπαράγοντα) οδηγεί σε αλλαγές στη χωροταξική διαμόρφωση της πρωτεΐνης Araf-1, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη θέσεων σύνδεσης για την Προ-κασπάση-9. Το τριμερές αυτό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα (κυτόχρωμα *c*/Araf-1/Προ-κασπάση-9) συγκροτεί το αποπτώσωμα (*apoptosome*), το οποίο δύναται να επάγει εκλεκτικά την πρωτεολυτική ενεργότητα της Προ-κασπάσης-9. Η επακόλουθη αυτο-πρωτεόλυσή της οδηγεί στη δημιουργία της ενεργού Κασπάσης-9, η οποία διαδοχικά αναγνωρίζει και πρωτεολύει την Προ-κασπάση-3 σε ενεργό Κασπάση-3, με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση και αδρανοποίηση ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων στόχων, όπως αυτών που αναφέρονται και στον «εξωγενή» μηχανισμό (**Εικόνα 1.35**) [147, 219, 220, 224, 225, 236-241].

Το «ενδογενές» μονοπάτι της απόπτωσης, πέρα από τον Κασπασο-εξαρτώμενο χαρακτήρα του, δύναται να λειτουργήσει και ανεξάρτητα από τις Κασπάσες, με τα μιτοχόνδρια όμως να κατέχουν και στην περίπτωση αυτή κεντρικό ρόλο. Η διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων από μηχανισμούς που εμπλέκουν ή όχι την Bcl-2 υπερ-οικογένεια οδηγεί στην απελευθέρωση και άλλων πρωτεϊνικών μορίων πέραν του κυτοχρώματος *c*, όπως του AIF (πρωτεΐνη που φυσιολογικά εντοπίζεται στον μεσο-μεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων) και της ενδονουκλεάσης G (*EndoG*), τα οποία μεταναστεύουν στον πυρήνα και διαμεσολαβούν στον μεγάλης κλίμακας θρυμματισμό του πυρηνικού DNA και στη συμπύκνωση της χρωματίνης, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στον θάνατο [220, 242-246]. Βέβαια, πρόσφατες μελέτες στον *Caenorhabditis elegans* και σε κύτταρα θηλαστικών ισχυρίζονται ότι ο AIF μετέχει σε μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση τα οποία εμπλέκουν τόσο τις πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας Bcl-2 όσο και τις ενεργοποιημένες Κασπάσες. Συγκεκριμένα, πειράματα που διεξήχθησαν σε ανθρώπινα κύτταρα θηλαστικών (*Hela*) αποκάλυψαν την αδυναμία της απελευθέρωσης του AIF από το μιτοχόνδριο απουσία δράσης ενεργοποιημένων Κασπασών. Τα αποτελέσματα, όμως, αυτά έρχονται σε αντίθεση με μελέτες άλλων

ερευνητικών ομάδων σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, και ως εκ τούτου το συμπέρασμα που δύναται να εξαχθεί είναι πως η δράση του AIF εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο, το πρότυπο βιολογικό σύστημα που αναλύεται, καθώς και από την πλατφόρμα των πρωτοκόλλων και της περαιτέρω επεξεργασίας αυτών [242, 243, 247-252].

### 1.3.7.2 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία (*autophagy*) αποτελεί έναν διακριτό τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και κατηγοριοποιείται σε τρεις ξεχωριστές μορφές: α) τη μικρο-αυτοφαγία (*microautophagy*), η οποία αναφέρεται στην άμεση εγκόλπωση των κυτοσολικών στοιχείων μέσω των λυσοσωμικών μεμβρανών, β) τη δια μέσου μοριακών συνοδών προκαλούμενη αυτοφαγία (*chaperone-mediated autophagy*), σύμφωνα με την οποία αποικοδομούνται μόνο πρωτεΐνες και συγκεκριμένα όσες αναγνωρίζονται από ειδικές μοριακές συνοδούς (*chaperones*), οι οποίες τις οδηγούν στα λυσοσώματα και γ) τη μακρο-αυτοφαγία (*macroautophagy*), η οποία αποτελεί τον πιο συχνό τύπο αυτοφαγίας και αφορά στο μηχανισμό αποικοδόμησης πρωτεϊνών και οργανιδίων μέσω ειδικών «οργανιδιακών» σχηματισμών, των «αυτοφαγοσωμάτων» (*autophagosomes*). Είθισται, η αναφορά σε αυτοφαγία να απεικονίζει τη μακρο-αυτοφαγία, γι' αυτό και οι μηχανισμοί που αναπτύσσονται ως ακολούθως αφορούν στον συγκεκριμένο τύπο αυτοφαγίας [219, 226, 253-257].

Η αυτοφαγία (μακρο-αυτοφαγία) συνιστά μία εξελικτικά συντηρημένη ενδοκυτταρική καταβολική διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, από τους ζυμομύκητες μέχρι τα θηλαστικά. Σε αντίθεση με τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, στην αυτοφαγία δεν επάγεται η ενεργοποίηση των Κασπασών, ούτε παρατηρείται θρυμματισμός γονιδιωματικού DNA, αλλά ανιχνεύεται αποικοδόμηση του συμπλέγματος Golgi, των πολυ-ριβοσωμάτων και του ενδοπλασματικού δικτύου, πολύ πριν την καταστροφή του πυρήνα [258]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αυτοφαγία λειτουργεί σε χαμηλά επίπεδα και διαμεσολαβεί στην αποικοδόμηση κυτταροπλασματικών στοιχείων, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και κατεστραμμένων οργανιδίων (ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα και μιτοχόνδρια), δημιουργώντας διπλά-μεμβρανώδη εσώκλειστα κυστίδια, τα «αυτοφαγοσώματα». Ο κεντρικός μοριακός μηχανισμός που εμπλέκεται στη δόμηση



και συγκρότηση του αυτοφαγосώματος στηρίζεται σε μία μεγάλη και ετερογενή ομάδα γονιδίων, ευρέως γνωστά ως *Atg* (*autophagy-related genes*). Ο κυρίαρχος ρυθμιστής της αυτοφαγίας είναι το μονοπάτι του mTOR, το οποίο δρα κατωρροϊκά της ενεργοποίησης της Akt κινάσης. Υψηλά επίπεδα διατροφικών συστατικών και διέγερση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων οδηγούν στην ενεργοποίηση του mTOR, το οποίο διαδοχικά παρεμποδίζει την αυτοφαγία. Συνεπώς, υπό τη δράση στρεσογόνων ερεθισμάτων το mTOR απενεργοποιείται και, ως εκ τούτου, άρεται η καταστολή του Atg1/ULK συμπλόκου, το οποίο εμφανίζεται απόλυτα καθοριστικό για την έναρξη της αυτοφαγίας. Ακολουθεί ενεργοποίηση ενός άλλου συμπλόκου, εμπριέχον τον Beclin-1 αυτοφαγικό καθοριστή, το οποίο είναι απαραίτητο για την πυρήνωση του φαγοφόρου (*phagophore*). Υπό την επίδραση των Atg πρωτεϊνών, το φαγοφόρο επιμηκύνεται, ωριμάζει και τελικά σχηματίζει το αυτοφαγόσωμα. Στη συνέχεια, τα αυτοφαγосώματα συντήκονται με λυσοσώματα σχηματίζοντας τα «αυτοφαγολυσοσώματα», και με τη δράση των λυσοσωμικών ενζύμων διασπών οτιδήποτε βρίσκεται στο εσωτερικό τους (**Εικόνα 1.36**) [219, 221, 258-261].

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης στο εσωτερικό του κυττάρου, απομακρύνοντας οργανίδια που έχουν υποστεί βλάβη ή είναι δυσλειτουργικά, καθώς και ανορθόδοξα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ενδεχομένως είναι επιζήμιες για το κύτταρο. Σε συνθήκες ανεπάρκειας ή στέρησης τροφικών συστατικών και άλλων στρεσογόνων καταστάσεων (όπως για παράδειγμα, σε συνθήκες υποξίας), η αυτοφαγία επάγει την κυτταρική επιβίωση διασπώντας και ανακυκλώνοντας μη χρήσιμα ενδοκυτταρικά συστατικά, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο ενέργεια και προμηθεύοντας το κύτταρο με βασικούς δομικούς λίθους (*building blocks*) για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Για να εξασφαλιστεί η ταυτοποίηση και επιλεκτική αποικοδόμηση των καταδικασμένων και όχι των ακέραιων πρωτεϊνών και οργανιδίων, τα προς επεξεργασία συστατικά επισημαίνονται και τροποποιούνται καταλλήλως με μόρια ουμπικουΐτινης (*ubiquitin*), έτσι ώστε να αναγνωρίζονται από τους αυτοφαγικούς υποδοχείς, οι οποίοι μεταφέρουν το εν λόγω «φορτίο» στην αυτοφαγосωμική μηχανή. Η ικανότητα αυτή της αυτοφαγίας να εγκλωβίζει, διασπά, εξαλείφει και ανακυκλώνει ενδοκυτταρικά συστατικά επιδρά ισχυρά στο μεταβολισμό του κυττάρου, επαναπροσδιορίζει το πρωτέωμα (το σύνολο των πρωτεϊνών), ρυθμίζει τη διακίνηση συστατικών,

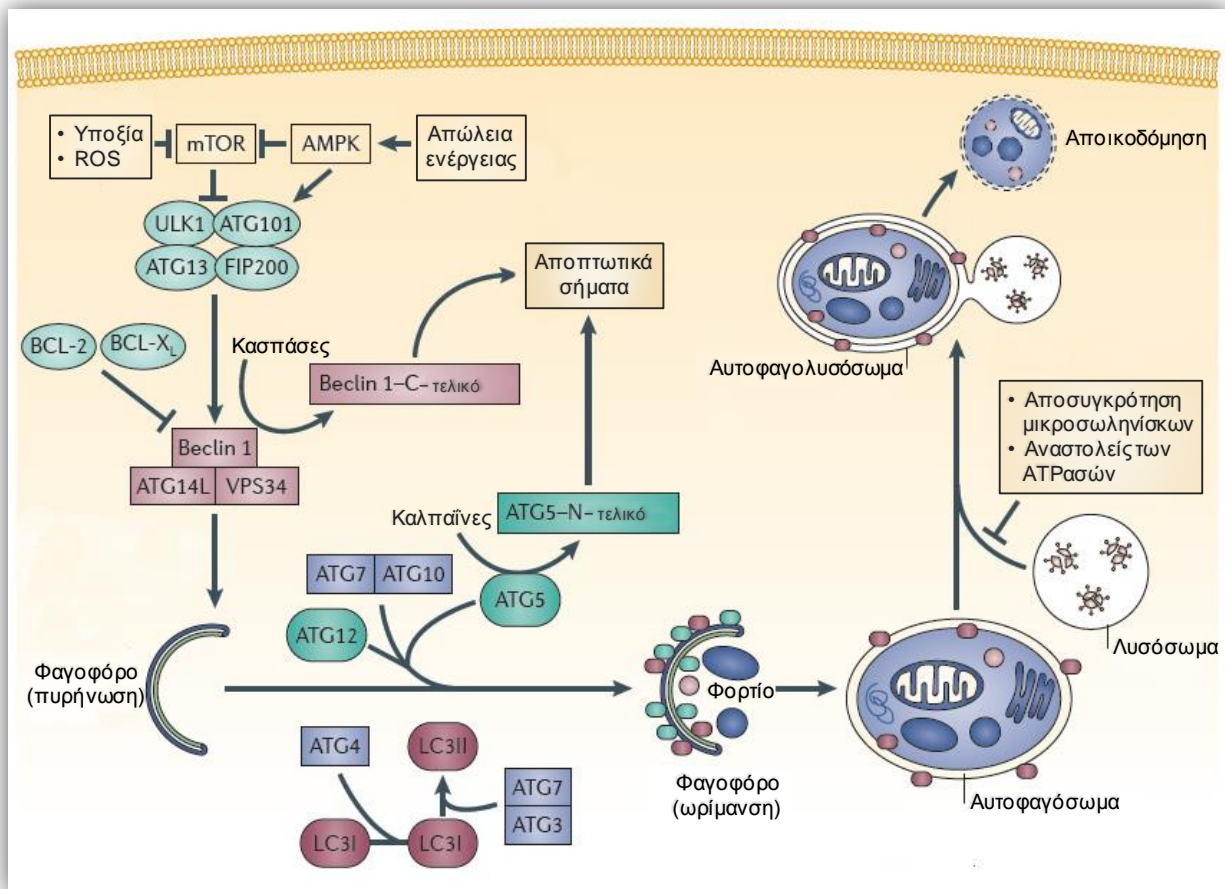
μεταβάλλει την κυτταρική σηματοδότηση και επηρεάζει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις [219, 221, 253-255, 257, 258, 262-269].

Μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας, δύναται να καταστραφούν συσσωματώματα πρωτεϊνών, σε αντίθεση με το μηχανισμό του πρωτεασώματος (*proteasome*), όπου είναι δυνατή η αποικοδόμηση μίας και μόνο διαλυτής πρωτεΐνης. Ως εκ τούτου, η αυτοφαγία δρα συμπληρωματικά του πρωτεασώματος σε συνθήκες στρες. Επίσης, η αυτοφαγία διεγείρεται όταν το μονοπάτι του πρωτεασώματος αναστέλλεται σε κύτταρα που είναι επιδεκτικά στην αυτοφαγία, γεγονός που υποστηρίζει την μερική, συμπληρωματική αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση των δύο αυτών βασικών μηχανισμών αποικοδόμησης πρωτεϊνών.

Η διαδικασία της απόπτωσης, ως τρόπος κυτταρικού θανάτου αποκλίνει αρκετά από αυτόν της αυτοφαγίας. Μελέτες όμως, ισχυρίζονται πως υπάρχει αλληλεπίδραση, θετική ή αρνητική, των δύο αυτών μηχανισμών και σε πολλές περιπτώσεις η αναστολή της απόπτωσης επάγει την αυτοφαγία και αντίστροφα. Η συγκλίνουσα δράση των δύο μηχανισμών στηρίζεται στην καταστολή της προ-αυτοφαγοσωμικής πρωτεΐνης Beclin-1 και στην επακόλουθη παρεμπόδιση της αυτοφαγίας από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub>. Συνεπώς, ενδεχόμενη απενεργοποίηση των αντι-αποπτωτικών αυτών μορίων ενισχύει τη δράση τόσο της απόπτωσης όσο και της αυτοφαγίας. Επιπροσθέτως, προ-αποπτωτικά BH3-only μέλη της υπερ-οικογένειας Bcl-2, όπως οι πρωτεΐνες Bik και Bnip3, προάγουν τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Τουναντίον, η αντιθετική δραστηριότητα των δύο μηχανισμών βασίζεται, από τη μία πλευρά, στην κυτταρο-προστατευτική ιδιότητα της αυτοφαγίας, η οποία προκαλεί την εξάλειψη πιθανών πηγών προ-αποπτωτικών ερεθισμάτων, όπως τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, λειτουργώντας με αυτόν τον τρόπο ανασταλτικά στην επαγωγή της απόπτωσης. Από την άλλη πλευρά, η μεσολαβούμενη από την απόπτωση ενεργοποίηση πρωτεασών, όπως της Κασπάσης-3 και καλπαΐνης, δημιουργούν μέσω της πρωτεόλυσης των αυτοφαγικών πρωτεϊνών Beclin-1 και Atg5 προ-αποπτωτικά κλάσματα (καρβοξυτελικά και αμινοτελικά θραύσματα, αντιστοιχώς), τα οποία καταστέλλουν την αυτοφαγία (αφού δεν μπορεί να συγκροτηθεί το αυτοφαγόσωμα), ενώ συγχρόνως ενισχύουν περαιτέρω την αποπτωτική διαδικασία (**Εικόνα 1.36**) [219, 221, 253, 270-272].

Η αυτοφαγία φαίνεται να εμπλέκεται με διπλό ρόλο και στην εξέλιξη του καρκίνου, όπου ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το στάδιο του όγκου και την

ακολουθούμενη θεραπεία, δύναται από τη μία πλευρά να προάγει την επιβίωση, μέσω προστασίας των καρκινικών κυττάρων από το μεταβολικό στρες, και να διαμεσολαβεί στην ανθεκτικότητά τους έναντι χημειοθεραπευτικών παραγόντων και ακτινοθεραπείας, ενώ εναλλακτικά να οδηγεί στην καταστολή της ανάπτυξης του όγκου και στον κυτταρικό θάνατο, μέσω αποικοδόμησης ογκογόνων πρωτεϊνών [221, 253, 258, 273-277]. Μία σημαντική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί η ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη p53. Ως μεταγραφικός παράγοντας επιδρά θετικά στην αυξορρύθμιση αυτής μέσω ενεργοποίησης αυτοφαγικών επαγωγέων, όπως του DRAM1 και της σεστρίνης-2 (ενεργοποιεί την AMPK). Αντιθέτως, τα βασικά επίπεδα της p53 στο κυτταρόπλασμα συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του mTOR, το οποίο διαδοχικά απενεργοποιεί το αυτοφαγικό σύμπλοκο Atg1/ULK, ρυθμίζοντας συνεπώς με αρνητικό τρόπο την προαγωγή και εξέλιξη του συγκεκριμένου τύπου κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 1.36) [186, 199, 270, 276, 278].

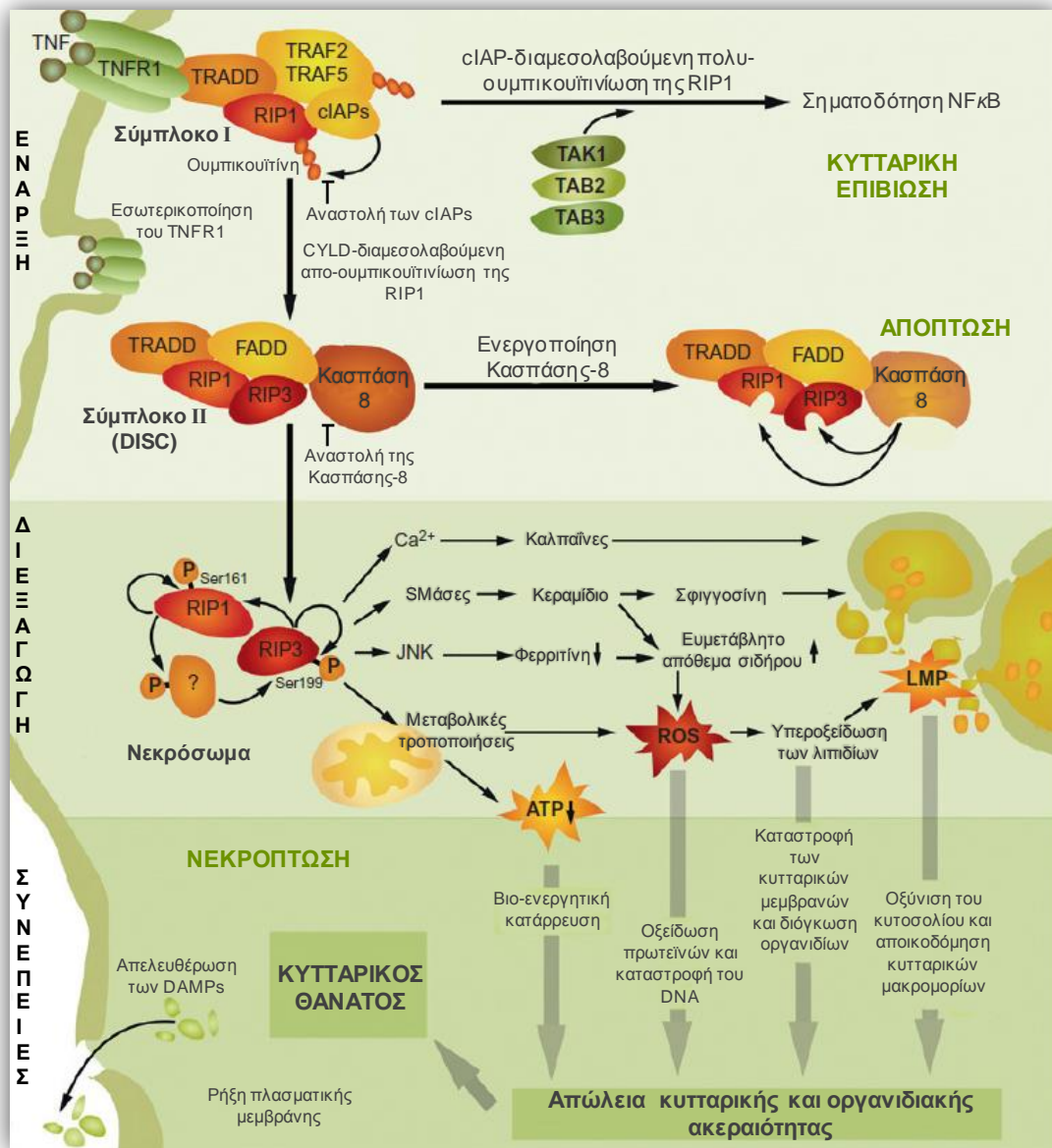


**Εικόνα 1.36** Σκιαγράφηση των σημαντικότερων ρυθμιστών και γεγονότων κατά την αυτοφαγία και συγκρότηση του αυτοφαγοσώματος [221].

### 1.3.7.3 Προγραμματισμένη νέκρωση

Η προγραμματισμένη νέκρωση (*programmed necrosis*) συνιστά έναν επιπλέον τύπο μη-αποπτωτικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ο ευρέως γνωστός και συχνότερος τύπος αυτής συναντάται στη νεκρόπτωση (*necroptosis*), η ενεργοποίηση της οποίας προκαλείται από ερεθίσματα όμοια με αυτά που επάγουν και την προώθηση του «εξωγενούς» μονοπατιού της απόπτωσης, καθώς αφορά στη σύνδεση των προσδετών (*ligands*) TNF, FasL (CD95L) και TRAIL στους αντίστοιχους διαμεμβρανικούς τους υποδοχείς. Το πλέον χαρακτηριστικό και εκτενώς μελετημένο μοντέλο νεκρόπτωσης αφορά στον προσδέτη TNF $\alpha$  και στον αντίστοιχο υποδοχέα του TNFR1. Η έναρξη του προγράμματος της νεκρόπτωσης επιτυγχάνεται με τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού συμπλόκου I (TNFR1 σύμπλοκο). Η κυτταροπλασματική πλευρά του τριμερούς υποδοχέα TNFR1 στρατολογεί μία σειρά πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η πρωτεΐνη-«προσαρμοστής-γέφυρα» TRADD, η κινάση RIP1, οι πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης τύπου cIAP και οι παράγοντες TRAF2 και TRAF5, συνθέτοντας όλες μαζί το σύμπλοκο I. Οι πρωτεΐνες τύπου cIAP μεσολαβούν στην ουμπικουϊτινίωση της RIP1, προωθώντας έτσι το κανονικό μονοπάτι (*canonical pathway*) ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF $\kappa$ B, και συνεπώς προάγοντας την κυτταρική επιβίωση. Με την ενδοκύττωση, όμως, του TNFR1 και την απο-ουμπικουϊτινίωση της RIP1 [είτε εξαιτίας απενεργοποίησης των cIAPs, είτε λόγω δράσης του ενζύμου CYLD (απο-ουμπικουϊτινώνει πρωτεΐνες στόχους ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου)] δημιουργείται ένα νέο υπερμοριακό σύμπλοκο II (γνωστό και ως DISC σύμπλοκο), το οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες RIP1, RIP3, TRADD, FADD και Κασπάση-8. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η Κασπάση-8 ενεργοποιείται στο σύμπλοκο αυτό και πρωτεολύει υποστρώματα στόχους της, τόσο ενεργοποιώντας κάποια (για παράδειγμα, την Κασπάση-3) όσο και απενεργοποιώντας άλλα (όπως, τις κινάσες RIP1 και RIP3), οδηγώντας τελικά στην απόπτωση. Στην περίπτωση, όμως, που η ενεργοποίηση της Κασπάσης-8 κατασταλεί, είτε μέσω φαρμακολογικών παραγόντων και μορίων-αναστολέων αυτής (για παράδειγμα, η πρωτεΐνη FLIP), είτε μέσω γενετικών τροποποιήσεων (για παράδειγμα, μεταλλαγές), τότε το σύμπλοκο II προάγει ισχυρά προ-νεκρωτικά σήματα (**Εικόνα 1.37**) [219, 221, 230, 279-285].

Η εμπλοκή της πρωτεΐνης RIP1 στη νεκρόπτωση επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά το έτος 2008 από το εργαστήριο του J.Yuan (Tufts University, Massachusetts, USA), όπου ταυτοποιήθηκε ως μοριακός στόχος των νεκροστατινών 1 και 3 (*necrostatins 1 and 3*), οι οποίες συνιστούν μικρά μόρια που καταστέλλουν τη νεκρόπτωση, αλλά όχι και τις άλλες δράσεις της RIP1 κινάσης. Λίγο αργότερα, έρευνες απέδειξαν την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση των RIP1 και RIP3 κινασών, δομώντας ως εκ τούτου το νεκρόσωμα (*necrosome*), σύμπλοκο το οποίο εμπλέκεται ισχυρά στις περισσότερες περιπτώσεις της νεκρόπτωσης [279, 280, 282, 284, 286, 287]. Η διαμοριακή αυτή αλληλεπίδραση συνεπάγεται την αυτο-φωσφορυλίωση της RIP1 στη θέση σερίνη 161 (*Ser<sup>161</sup>*) και τη φωσφορυλίωση της RIP3 στη θέση σερίνη 199 (*Ser<sup>199</sup>*). Ο ακριβής τρόπος φωσφορυλίωσης της RIP3 δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, καθώς πολλοί υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται από την RIP1, ενώ άλλοι ισχυρίζονται πως η RIP3 αυτο-φωσφορυλιώνεται στη θέση αυτή. Η ενεργοποίηση της RIP3 οδηγεί στην περαιτέρω φωσφορυλίωση (άμεση ή έμμεση) της RIP1. Η πρόσδεση της RIP1 στην RIP3 καταργείται από τη δράση της νεκροστατίνης 1 (αναστολέας της RIP1), αποδεικνύοντας ότι η ενεργότητα κινάσης της RIP1 είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση του νεκροσώματος. Πρόσφατες έρευνες (2012) καταδεικνύουν απαραίτητη για τη διεξαγωγή της νεκρόπτωσης μία ψευδο-κινάση, την MLKL, η οποία φωσφορυλιώνεται από την ενεργή RIP3 στις θέσεις Thr<sup>357</sup> και Ser<sup>358</sup> και προσδέεται εκλεκτικά σε αυτήν, συμμετέχοντας ως εκ τούτου στην κατωροϊκή δράση του νεκροσώματος. Το σύμπλοκο RIP1/RIP3/MLKL στρατολογεί, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την μιτοχονδριακή φωσφατάση PGAM5, η οποία απαντάται σε δύο ισομορφές (PGAM5S και PGAM5L) και φυσιολογικά εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η διαδοχική προσέλκυση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης DRP1, μίας GTPάσης που ελέγχει την μιτοχονδριακή διάσπαση, μέσω αποφωσφορυλίωσής της στη θέση Ser<sup>637</sup> από την PGAM5S, προκαλεί κατάτμηση του μιτοχονδρίου, βήμα αρχικό, αλλά καθοριστικό για τη διεξαγωγή της νεκρόπτωσης, καθώς πειράματα απενεργοποίησης είτε της DRP1 είτε της PGAM5 αποτρέπουν την επαγωγή της προγραμματισμένης νέκρωσης [288-290].



**Εικόνα 1.37** Το μοριακό μονοπάτι της νεκρόπτωσης, σχηματικά, με εμφανή την λειτουργική επικοινωνία απόπτωσης – νεκρόπτωσης [279].

Η διεξαγωγή της νεκρόπτωσης μέσω της δράσης του νεκροσώματος περιλαμβάνει: α) την δια μέσου του  $\text{Ca}^{2+}$  ενεργοποίηση των καλπαϊνών, η οποία διαδοχικά διευκολύνει τη διαπερατότητα των λυσοσωμικών μεμβρανών (*LMP*, *lysosomal membrane permeabilization*) και την απελευθέρωση των λυσοσωμικών υδρολασών στο κυτοσόλιο, καθώς και την απενεργοποίηση, μέσω πρωτεόλυσης, της αντλίας  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  στην πλασματική μεμβράνη, β) την δια μέσου σφιγγομυελινάσης (*SMase*) παραγωγή κεραμιδίου (*ceramide*), το οποίο μετατρέπεται σε σφιγγοσίνη, προκαλώντας ενίσχυση της διαπερατότητας των λυσοσωμικών μεμβρανών, γ) την προώθηση του διαμεσολαβούμενου από τις JNK κινάσες σηματοδοτικού μονοπατιού

επιδρώντας στα επίπεδα αποθήκευσης του σιδήρου εξαιτίας της διάσπασης της φερριτίνης, δ) την επαγωγή της γλυκογονόλυσης και γλουταμινόλυσης, δεδομένης της ενίσχυσης της δράσης των αντίστοιχων μεταβολικών ενζύμων PYGL, GLUL και GLUD1 από την RIP3 κινάση και ε) την επαγωγή μεταβολικών μετατροπών στα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της ANT από τη RIP1 κινάση, πρωτεΐνης που συμβάλλει στη συναλλαγή κυτοσολικού ADP με μιτοχονδριακό νεοσυντιθέμενο ATP, με συνακόλουθη την πρόκληση σημαντικής μείωσης των επιπέδων ATP στο κυτταρόπλασμα [279, 284, 287, 291-294].

Όλες αυτές οι διαδικασίες συγκλίνουν σε μία σειρά γεγονότων με τελικό αποτέλεσμα την προγραμματισμένη νέκρωση. Αν και ακόμα ο ακριβής τρόπος διεξαγωγής και εκτέλεσης (*execution*) της νεκρόπτωσης δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, εντούτοις αναφέρονται ως ακολούθως συμβάντα που κατέχουν εξέχουσα θέση στην επιτυχημένη υλοποίηση αυτής. Ανάμεσά τους, κυρίαρχο ρόλο καταλαμβάνει η υπερ-παραγωγή μορίων ROS, τα οποία επάγουν την άμεση καταστροφή βιο-μακρομορίων, όπως DNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων, ενώ οδηγούν και σε αποσταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών (πλασματική, λυσοσωμική και ενδοπλασματικού δικτύου), μέσω της υπεροξειδωσής λιπιδίων, καθώς δημιουργούνται αλδεΐδες, οι οποίες «επιτίθενται» στα πρωτεϊνικά και λιπιδικά τμήματα των μεμβρανών, οδηγώντας έτσι στη διαρροή πρωτεασών και στην αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$ . Στα μιτοχόνδρια παρεμποδίζεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση εξαιτίας των προϊόντων της εν λόγω υπεροξειδωσής. Ως αποτελέσματα της δράσης του νεκροσώματος θεωρούνται, επίσης, η μη αναστρέψιμη βιο-ενεργητική κατάρρευση, η διόγκωση οργανιδίων και η απελευθέρωση μορίων τύπου DAMP [πρωτεΐνες ή άλλου τύπου μόρια (για παράδειγμα DNA και ATP) τα οποία σε συνθήκες στρες απελευθερώνονται είτε έξω από τον πυρήνα είτε έξω από το κύτταρο προκαλώντας την αποικοδόμησή τους] εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητας των μεμβρανών. Η απώλεια αυτή της ακεραιότητας των οργανιδίων, αλλά και του κυττάρου συνολικά, οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο (**Εικόνα 1.37**) [279, 284].

Ένα ακόμη γεγονός που συντελεί στα μειωμένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ATP, εντοπίζεται στα αυξημένα επίπεδα του ενεργού PARP1 πυρηνικού ενζύμου, το οποίο κατέχει ρόλο-κλειδί στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας, κυρίως μέσω επιδιόρθωσης του DNA και μεταγραφικής ρύθμισης επιλεγμένων γονιδίων

στόχων. Ενεργοποιείται με ταχείς ρυθμούς από γονιδιωματικά DNA θραύσματα και στρατολογεί επιδιορθωτικούς παράγοντες προσθέτοντας ADP-ριβόζη σε πρωτεΐνες που συνδέονται με τη χρωματίνη. Απώλεια της PARP1 πολυμεράσης οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στην ενδεχόμενη καταστροφή του DNA, ενώ υπερ-ενεργοποίηση αυτής, έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξάρτητο από Κασπάσες κυτταρικό θάνατο. Η PARP1 διαμεσολαβεί με ποικίλους τρόπους στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Σε ένα πιθανό σενάριο, η καταστροφή του αλκυλιωμένου DNA προάγει τη δια μέσου της PARP1 συσσώρευση μορίων PAR [*poly(ADP-ribose)*], καθώς και την ταχύτατη εξάντληση των αποθεμάτων του κυτοσολικού  $NAD^+$  και του ATP, όπου μέσω «ενεργειακής κατάρρευσης» των γλυκολυτικών κυττάρων (κύτταρα που εξαρτώνται άμεσα από τα επίπεδα του κυτοσολικού  $NAD^+$  για γλυκόλυση και παραγωγή ενέργειας) προωθεί τον κυτταρικό θάνατο. Σε μία εναλλακτική προσέγγιση, η υπερ-ενεργοποιημένη PARP1 πρωτεΐνη προκαλεί (πιθανώς μέσω σηματοδότησης PAR) την απελευθέρωση του AIF από το μιτοχόνδριο στο κυττόςολιο και τη μετάβαση αυτού στον πυρήνα όπου επάγει την ανεξάρτητη από Κασπάσες κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA, η οποία διαδοχικά δύναται να προκαλέσει την περαιτέρω ενεργοποίηση του PARP1, κινητοποιώντας με αυτόν τον τρόπο έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης και ισχυρής ανάδρασης. Προς έκπληξη, στην προώθηση του εν λόγω κυτταρικού θανάτου συμμετέχουν και οι πρωτεΐνες TRAF2 και RIP1, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της JNK1 κινάσης, η οποία συμβάλλει καθοριστικά στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στην κυτταρική νέκρωση. Διαπιστώνοντας, λοιπόν, ότι η δράση της RIP1 ενδέχεται να εντοπίζεται κατωροϊκά της ενεργοποίησης του PARP1, πολλοί ερευνητές κατατάσσουν τη μορφή αυτή θανάτου ως τμήμα της νεκρόπτωσης, ενώ άλλοι τη διαφοροποιούν και την χαρακτηρίζουν ως ένα διακριτό τύπο προγραμματισμένης νέκρωσης, πρόσφατα γνωστό και ως «παρθάνατο» (*parthanatos*) [219, 220, 279, 284, 294-298].

## **1.4 Θεραπεία του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης**

Η επιτυχής αντιμετώπιση του καρκίνου αποτελεί κεντρικό στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων, καθώς μέχρι και σήμερα συνιστά μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Από τη στιγμή που μέσω συνδυασμού τεχνικών, όπως



ενδοφλέβια πυελογραφία (*IVP: intravenous pyelography*), κυστοσκοπία (*cystoscopy*), κυτταρολογία (*cytology*), διουρηθρική βιοψία (*transurethral biopsy*), απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (*MRI: magnetic resonance imaging*) και αξονική τομογραφία (*CT scan*), μπορεί και ανιχνεύεται κακοήθεια στην ουροδόχου κύστη, η θεραπεία αυτής καθορίζεται από τον τύπο του καρκινώματος (ουροθηλιακός ή μη), από το στάδιο και τον βαθμό κακοήθειας του εν λόγω όγκου, από το μέγεθος και τον αριθμό των καρκινωμάτων, καθώς και από το εάν αυτοί χαρακτηρίζονται ως επιφανειακοί, διηθητικοί ή μεταστατικοί [20, 299].

Οι τέσσερις τύποι μίας τυπικής θεραπείας, οι οποίοι χρησιμοποιούνται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό είναι οι εξής:

α) Χειρουργική επέμβαση (*Surgery*). Κατά περίπτωση δύναται να πραγματοποιηθεί διουρηθρική εκτομή (*TUR, transurethral resection*) με εκπομπή ενέργειας μέσω της χρήσης κυστοσκοπίου (*cystoscope*) και ολική ή τμηματική κυστεκτομή (*radical/segmental cystectomy*), ανάλογα με τον βαθμό διήθησης του όγκου [20, 300].

β) Ακτινοθεραπεία (*Radiation therapy*). Μέσω της χρήσης υψηλής ενέργειας ακτινοβολίας (όπως για παράδειγμα ακτίνες X) στοχεύεται ο θάνατος ή τουλάχιστον η παρεμπόδιση της περαιτέρω ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Η ακτινοθεραπεία ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης της ακτινοβολίας διακρίνεται σε εξωτερική (ακτινοβόληση από ειδικό μηχάνημα εξωτερικά του σώματος) και εσωτερική (ραδιενεργά υλικά, τα οποία ενίονται κατευθείαν στον όγκο ή κοντά σε αυτόν) [301].

γ) Χημειοθεραπεία (*Chemotherapy*). Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται κατά βάση στη θεραπεία του καρκίνου και στοχεύουν στην άρση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων είτε μέσω θανάτωσης αυτών είτε καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Τα φάρμακα είναι δυνατόν να λαμβάνονται διά του στόματος ή να πραγματοποιείται ενδοφλέβια χορήγηση αυτών, με κίνδυνο, κατά περίπτωση, την εμφάνιση συστημικής τοξικότητας (συμβατική χημειοθεραπεία). Τα τελευταία γενεάς όμως φάρμακα, όντας περισσότερο εξειδικευμένα, καταφέρνουν να ξεπερνούν τον «σκόπελο» αυτό (στοχευμένη χημειοθεραπεία). Εναλλακτικά, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να ενίονται κατευθείαν στον όγκο (ενδοκυστικά, *intravesically*), όταν αυτό είναι

δυνατόν, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο οποίος συνιστά έναν συμπαγή όγκο [20, 301-303].

δ) Βιολογική θεραπεία (*Biological therapy*). Η θεραπεία αυτή, που είναι γνωστή και ως Βιο-θεραπεία ή Ανοσο-θεραπεία, χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών για την αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων. Σε περιπτώσεις επιθητικού μη-διδειδυτικού στον μυϊκό ιστό (*non-muscle invasive*) καρκίνου της ουροδόχου κύστης, χορηγούνται ενδοκυστικά μέσω καθετήρα βακτήρια τύπου BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*). Τα εν λόγω βακτήρια σχετίζονται με την εμφάνιση της φυματίωσης και ενώ ο τρόπος δράσης τους στη θεραπεία του καρκίνου είναι άγνωστος, έχει διαπιστωθεί πως διεγείρουν τον ανοσοποιητικό μηχανισμό, ο οποίος καταστρέφει τυχόν καρκινικά κύτταρα που έχουν απομείνει έπειτα από την διουρηθρική εκτομή [20, 304].

Νέοι τύποι θεραπειάς που βρίσκονται υπό φάση κλινικών δοκιμών είναι οι ακόλουθοι:

α) Χημειοπροστασία (*Chemoprevention*). Έγκειται στη χρήση φαρμάκων, βιταμινών και άλλων συστατικών για να ελαττωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ή επανεμφάνισης του καρκίνου.

β) Φωτοδυναμική θεραπεία (*Photodynamic therapy*). Η θεραπεία αυτή βασίζεται στη χρήση ενός ανενεργού φαρμάκου, την ενδοφλέβια χορήγησή του και την επακόλουθη ενεργοποίησή του μέσω έκθεσης αυτού σε συγκεκριμένου τύπου λέιζερ (*laser*). Σημαντικό της πλεονέκτημα είναι η ισχύη της παράπλευρη επίδραση σε φυσιολογικά κύτταρα [20, 305].

## 1.4.1 Χημειοθεραπεία ανθρώπινου καρκίνου

### 1.4.1.1 Cisplatin (Σισπλατίνη)

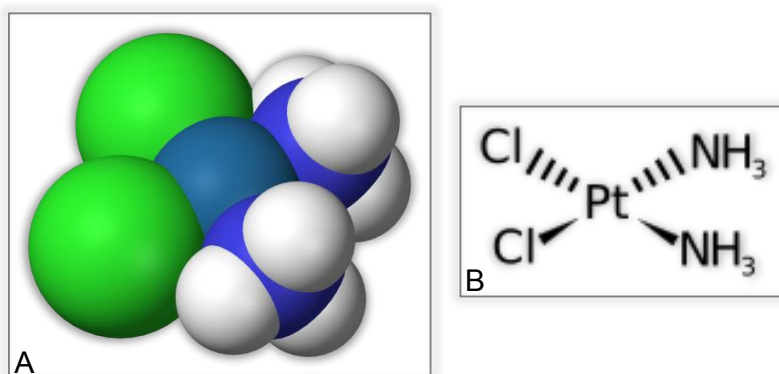
Η Cisplatin ή *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος (II) [*cis-diamminedichloroplatinum* (II)], ή cDDP, ή *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] αποτελεί ένα ισχυρό αντι-καρκινικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο, το οποίο ταξινομείται στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Ήταν το πρώτο μέλος της ομάδας του, στην οποία αργότερα προστέθηκαν η Carboplatin (*Καρβοπλατίνη*) και η Oxaliplatin (*Οξάλιπλατίνη*). Περιγράφηκε αρχικά από τον M. Peyrone (γνωστό και ως άλας του

Reygone) το 1845, ενώ η δομή της μελετήθηκε από τον χημικό A. Werner το 1893. Η αναγνώριση της κυτταροστατικής της δράσης έγινε τυχαία το 1965 στο Πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν (ΗΠΑ), όταν ο βιοφυσιικός B. Rosenberg και οι συνεργάτες του πειραματιζόνταν επάνω στην επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου στην ανάπτυξη βακτηρίων. Παρατήρησαν ότι όταν τα ηλεκτρόδια που βύθιζαν στην καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν από λευκόχρυσο (πλατίνα), τότε η κυτταρική διαίρεση του βακτηρίου *Escherichia coli* διακοπτόταν, με ταυτόχρονη παραγωγή νηματίων μέχρι και 300 φορές μεγαλύτερων από τα κανονικά βακτήρια. Το γεγονός αυτό οφειλόταν στην αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και όχι στη διέγερση κάποιας αυξητικής διεργασίας. Τα επόμενα χρόνια μελετήθηκε η θεραπευτική δραστηριότητα της Cisplatin σε διάφορους τύπους κακοήθων νεοπλασιών, όπου αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική σε μεταστατικά νεοπλάσματα όρχεων, ωοθηκών, τραχήλου της μήτρας, ουροδόχου κύστης και εγκεφάλου, καθώς επίσης και στον μικρο-κυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, αλλά και στον καρκίνο του προστάτη σε συνδυασμό με άλλα κυτταροστατικά φάρμακα [306-308].

Παρά τις τοξικές της δράσεις, όπως ωτοτοξικότητα (*ototoxicity*) (~23-50%), περιφερική νευροπάθεια (*peripheral neuropathy*) (~62%) και νεφροτοξικότητα (*nephrotoxicity*) (~20-40%), στους ασθενείς στους οποίους χορηγείται, η Cisplatin αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα βασικό συστατικό ποικίλων πρωτοκόλλων συνδυασμένης χημειοθεραπείας για πλήθος διαφορετικών κακοηθειών, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα το M-VAC [*Methotrexate-Vinblastine-Adriamycin (Doxorubicin)-Cisplatin*] φαρμακολογικό κοκτέιλ, το οποίο διαμόρφωσε για έτη την συνήθη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο (ή μεταστατικό) καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Εξαιτίας, όμως, της «συστημικής» τοξικότητας που προκαλεί το M-VAC, έχουν αναπτυχθεί νέα θεραπευτικά σχήματα τα οποία περιλαμβάνουν διάφορους συνδυασμούς φαρμάκων, με τη Cisplatin να κατέχει κεντρικό ρόλο σε αυτά (για παράδειγμα, το GC κοκτέιλ: *Gemcitabine-Cisplatin*).

Η Cisplatin αποτελείται από ένα άτομο πλατίνας (*Pt*) το οποίο περιβάλλεται από δύο ομάδες αμμωνίας ( $NH_3$ ) και δύο άτομα χλωρίου (*Cl*) σε *cis* θέση (**Εικόνα 1.38**). Είναι ένα ιδιαίτερα πολικό μόριο που εισβάλλει στα κύτταρα σχετικά αργά σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες μικρο-μοριακών αντι-καρκινικών φαρμάκων. Η πρόσληψή της επηρεάζεται από παράγοντες όπως η συγκέντρωση ιόντων νατρίου και καλίου, το pH (σχετική οξύτητα: συγκέντρωση  $H^+$ ) και η παρουσία αναγωγικού

μέσου. Εκτός από την παθητική διάχυση, έχει αναφερθεί και ο ρόλος των μεταφορέων χαλκού (*copper*) ή των διαύλων επικοινωνίας (*gated channels*) στην είσοδό της στο κύτταρο. Ενδοκυτταρικά, ενεργοποιείται από την αντικατάσταση του ενός εκ των δύο ατόμων χλωρίου με νερό ( $H_2O$ ). Αυτό το θετικά φορτισμένο παράγωγο μπορεί να αντιδράσει με μία ποικιλία κυτταρικών συστατικών τα οποία φέρουν νουκλεοφιλικές (ή νουκλεόφιλες) θέσεις και συμπεριλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, κυτταροσκελετικά μικροϊνίδια, μεμβρανικά φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, RNA και DNA. Όμως, είναι γενικά αποδεκτό ότι το DNA είναι ο προτιμότερος *in vivo* στόχος για τη Cisplatin. Το άτομο της πλατίνας δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με τα N-7 άτομα του ιμιδαζολικού δακτυλίου της γουανίνης και της αδενίνης τα οποία τοπολογούνται στην μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας, καταλήγοντας έτσι στη δημιουργία διαμοριακών συμπλόκων DNA-Cisplatin ευρέως γνωστά ως “DNA adducts”. Όταν η πρόσδεση αφορά στην μία αλυσίδα του DNA και περιλαμβάνει γειτονικές βάσεις, όπως συναντάται και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα σχηματιζόμενα “adducts” περιγράφονται ως ενδοκλωνικά σύμπλοκα (GpG 1,2-, ApG 1,2- και GpXpG 1,3-*intrastrand adducts*) ή σταυρωτές διασυνδέσεις (*crosslinks*), ενώ όταν περιλαμβάνει γουανίνες που τοποθετούνται σε αντικριστές αλυσίδες στο DNA, αναφέρονται ως G-G διακλωνικές σταυρωτές διασυνδέσεις (*interstrand crosslinks*). Σε όλες τις περιπτώσεις, πάντως, οι δύο αμινομάδες (*carrier ligands*) παραμένουν δεσμευμένες στην πλατίνα. Τέλος, δύνανται να δημιουργούνται σταυρωτές αλληλεπιδράσεις και ομοιοπολικές συζεύξεις μεταξύ DNA και πρωτεΐνης, με τη Cisplatin να δρα ως μικρο-μοριακός διαμεσολαβητής-γέφυρα [306, 309-313].



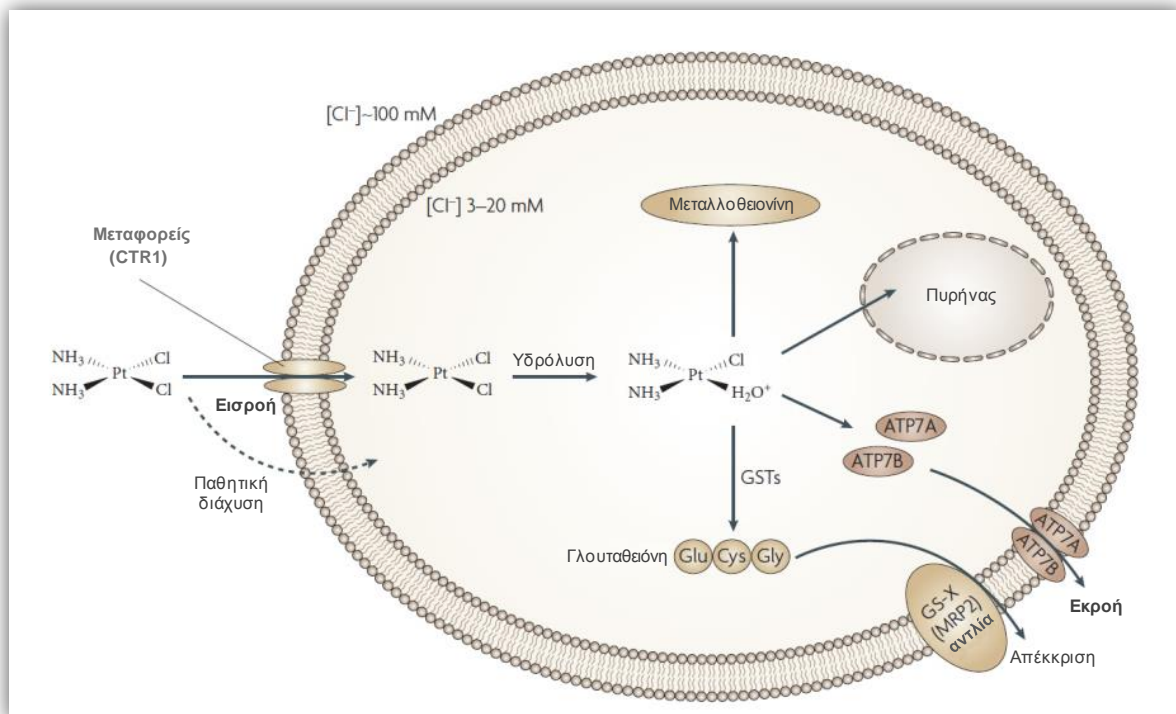
**Εικόνα 1.38** Α. Τρισδιάστατη «χωροπληρωτική» μορφή του μορίου της Cisplatin, όπου με μπλε και άσπρο χρώμα παριστάνονται οι δύο ομάδες αμμωνίας και με πράσινο χρώμα τα δύο άτομα του χλωρίου. Β. Συντακτικός τύπος του μορίου της Cisplatin [[en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)].

Η δημιουργία των τύπου “adduct” συμπλόκων προκαλεί σοβαρές αλλαγές στη δομή και λειτουργία του DNA, όπως ξεδίπλωμα και αποσυσπείρωση των ελίκων ή κάμψη των αλυσίδων και επακόλουθη παρεμπόδιση των κυτταρικών διαδικασιών της αντιγραφής και μεταγραφής, οι οποίες απαιτούν διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, σε διαφορετικό όμως βαθμό, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις επάγεται παρατεταμένη αναστολή της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Αποτέλεσμα αυτών είναι η ενεργοποίηση ποικίλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, όπως αυτών που εμπλέκονται στην αναγνώριση και επιδιόρθωση του κατεστραμμένου γονιδιωματικού DNA, στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, κυρίως μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης [306, 307, 309, 314, 315].

Λίγο μετά τα αρχικά και πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών με τη Cisplatin, η προσοχή στράφηκε στις εργαστηριακές μελέτες, οι οποίες στόχευαν στην αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο οι όγκοι αποκτούσαν ανθεκτικότητα στη Cisplatin κατά τη διάρκεια της θεραπείας και του λόγου που κάποιοι εξ αυτών εμφανίζονταν πρωτογενώς ανθεκτικοί. Μελέτες απέδειξαν πως η ανθεκτικότητα αυτή πιθανώς να επιτυγχάνεται δια μέσου δύο ευρέου φάσματος φάσης μηχανισμών: α) αποτυχία επαρκούς ποσότητας του εν λόγω φαρμάκου να προσεγγίσει το DNA στόχο και β) αδυναμία να επιτευχθεί κυτταρικός θάνατος μετά τη δημιουργία των τύπου “adduct” συμπλόκων DNA-Cisplatin. Πολλά κύτταρα που αποκτούν ανθεκτικότητα παρουσιάζουν έναν πλειομορφικό φαινότυπο, ο οποίος διαμορφώνεται από ποικίλα διαφοροποιημένα μονοπάτια, τα οποία κυρίως αφορούν στην πρόσληψη του φαρμάκου, στην αναγνώριση και επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA, καθώς και στην απόπτωση [306, 307, 309].

Ο βασικότερος λόγος που συνηγορεί για την ανθεκτικότητα στη Cisplatin μέσω ανεπαρκούς πρόσδεσης στο DNA είναι η μειωμένη συσσώρευση του φαρμάκου ενδοκυτταρικά. Αυτό ενδέχεται να συμβαίνει λόγω μειωμένης εισροής, εκτεταμένης εκροής ή/και ενδοκυττάριας απενεργοποίησης της Cisplatin μέσω σύνδεσης αυτής με πρωτεΐνες που περιέχουν θειόλη. Η μειωμένη είσοδος θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της καταστολής του γονιδίου που εκφράζει την κύρια πρωτεΐνη-μεταφορέα της Cisplatin μέσα στο κύτταρο CTR1 (*copper transporter 1*, μεταφορέας χαλκού 1), ενώ η αυξημένη έξοδος πιθανότατα οφείλεται σε ενεργοποίηση πρωτεϊνών εκροής. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν κυρίως οι ATPάσες ATP7A και ATP7B, οι οποίες αποτελούν και αυτές μεταφορείς χαλκού τύπου-p (*copper transporting p-type*

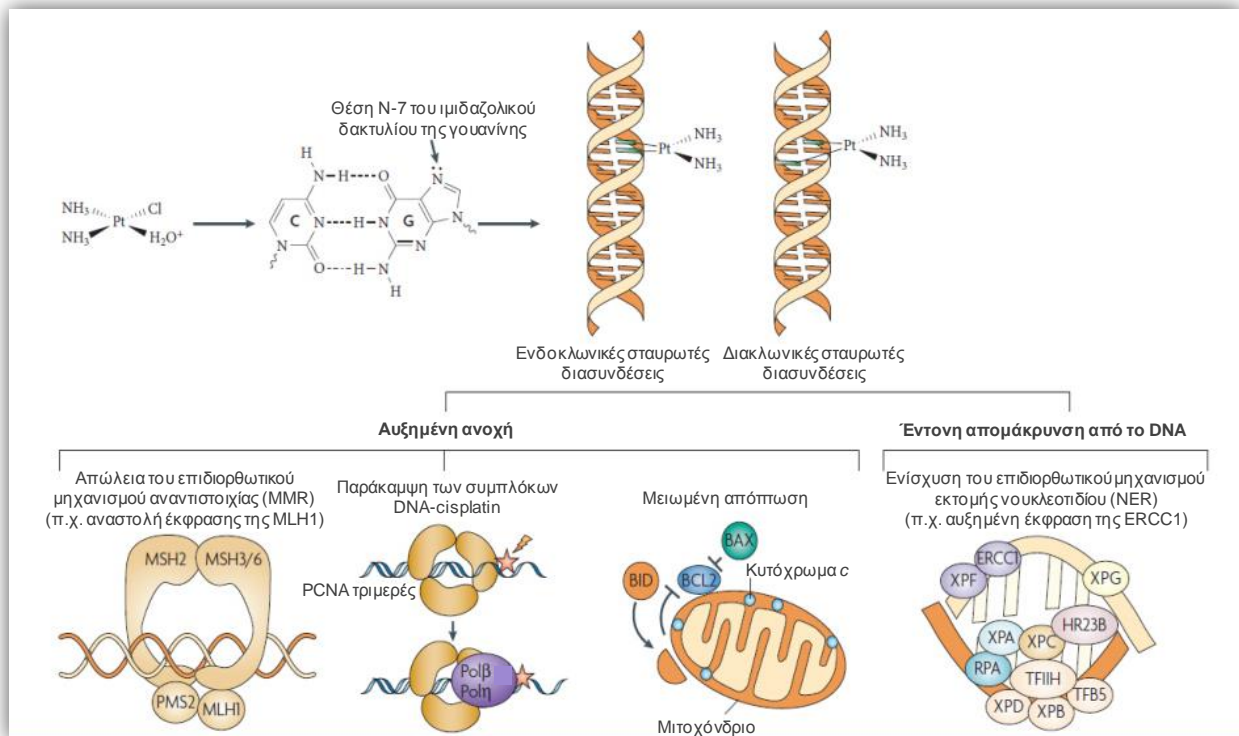
*adenosine triphosphates*). Μικρότερο ρόλο στην εκροή φαίνεται να διαδραματίζουν διακριτές υπο-οικογένειες της μεγάλης οικογένειας των μεμβρανικών πρωτεϊνών ABC (*ATP-binding cassette*), όπως η MDR (*multidrug resistant* ή ABCB), με χαρακτηριστικότερο εκπρόσωπο την MDR1 πρωτεΐνη (ή P-glycoprotein) και MRP (*multidrug resistant-associated protein* ή ABCC2), με σημαντικότερη την πρωτεΐνη MRP2 (ή cMOAT, *canalicular multispecific organic anion transporter*). Η αποτοξίνωση της Cisplatin πραγματοποιείται δια μέσου της πρόσδεσής της σε θειόλες, με σημαντικότερες εξ αυτών τις μεταλλοθειονίνες (*metallothioneins*) και τη γλουταθειόνη (*GSH, glutathione*). Οι μεταλλοθειονίνες συνιστούν πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, γνωστές για την αποτοξίνωση ιόντων βαρέων μετάλλων, με επακόλουθη κύρια δράση την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Η γλουταθειόνη, τριπεπτίδιο που περιέχει θείο (Glu-Cys-Gly), συνδέεται με τη Cisplatin μέσω μίας διαδικασίας που απαιτεί τη συμμετοχή ενζύμων-μεταφορέων GST (*glutathione-S transferases*) και αποβάλλεται από το κύτταρο δια μέσου των αντλιών εξόδου γλουταθειόνης (*GS-X pumps*), οι οποίες λειτουργούν με την αρωγή της πρωτεΐνης MRP2 απαιτώντας συγχρόνως την κατανάλωση ATP (**Εικόνα 1.39**) [306, 307, 309, 314-326].



**Εικόνα 1.39** Σχηματική απεικόνιση των μοριακών μηχανισμών ανάπτυξης ανθεκτικότητας των όγκων στη Cisplatin, εξαιτίας της αδυναμίας του φαρμάκου, λόγω ανεπαρκών ποσοτήτων αυτού, να προσεγγίσει τον DNA στόχο [306].

Μετά τον σχηματισμό των τύπου “adduct” συμπλόκων DNA-Cisplatin η κυτταρική επιβίωση, και ως εκ τούτου η ανθεκτικότητα του όγκου στο φάρμακο, μπορεί να προκύψει είτε με επιδιόρθωση του DNA, είτε με απομάκρυνση των εν λόγω συμπλόκων, είτε με άλλους μηχανισμούς ανοχής. Από τα τέσσερα μεγάλα DNA-επιδιορθωτικά μονοπάτια, το NER (*nucleotide-excision repair*, επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίου), το BER (*base-excision repair*, επιδιορθωτικός μηχανισμός εκτομής βάσης), το MMR (*mismatch repair*, επιδιορθωτικός μηχανισμός ανορθόδοξης συμπληρωματικότητας -αναντιστοιχίας-) και το DSBRR (*double-strand-break repair*, επιδιορθωτικός μηχανισμός δίκλωνης ρήξης), ο NER θεωρείται ο σημαντικότερος μηχανισμός επιδιόρθωσης για την απομάκρυνση βλαβών από το DNA μετά την επίδραση της Cisplatin. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στη NER-ενδονουκλεάση ERCC1 (*excision repair cross-complementing-1*), η οποία δημιουργεί ετεροδιμερή σύμπλοκα με τον XPF (*xeroderma pigmentosum (XP), complementation group F*) παράγοντα, προκαλώντας ως εκ τούτου εκτομές στο 5' άκρο του DNA, πλησίον της περιοχής πρόσδεσης αυτού με τη Cisplatin. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, επιγενετικές ρυθμίσεις φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στην εν λόγω ανθεκτικότητα, καθώς αναστολή των απο-ακετυλασών τύπου HDAC (*histone deacetylase*) προωθεί την πρόσδεση ενός κατάλληλου μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή του γονιδίου XPC και την επακόλουθη αυξημένη έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει καταλυτικά στον επιδιορθωτικό μηχανισμό τύπου NER. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγει και η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως για παράδειγμα του γονιδίου MLH1 (*MutL homologue-1*), το οποίο με αυτήν την υπερ-μεθυλιωμένη μορφή συμβάλλει σημαντικά στην απώλεια δράσης του MMR επιδιορθωτικού μηχανισμού. Αυξημένη, όμως, ανοχή στην επαγόμενη από τη Cisplatin καταστροφή του DNA μπορεί, επίσης, να προκληθεί και από την απώλεια λειτουργίας του επιδιορθωτικού μονοπατιού τύπου MMR, μέσω διακριτών μηχανισμών. Κατά τη διάρκεια δραστηριοποίησης του MMR, τα επαγόμενα από τη Cisplatin σύμπλοκα του DNA αναγνωρίζονται από τις MMR πρωτεΐνες MSH2, MSH3 και MSH6 (*homologues of the bacterial protein MutS*), σε μία προσπάθεια επιδιόρθωσης αυτών (“adducts”) και διατήρησης της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Στην πραγματικότητα, όμως, κάτι τέτοιο δεν επιτυγχάνεται αφού μετά από αρκετούς ανεπιτυχείς κύκλους επιδιόρθωσης προκαλείται τελικά αποπτωτική απόκριση. Για τον λόγο αυτό, η απώλεια του MMR,

όσον αφορά στα τύπου “adducts” σύμπλοκα DNA-Cisplatin, καταλήγει σε μειωμένη απόπτωση και, συνεπώς, σε ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Την αντοχή αυτή υποστηρίζει και η υπερ-έκφραση μίας πρωτεΐνης που ανήκει στην ομάδα των HMG (*high-mobility group*) πρωτεϊνών, η HMG1, η οποία προφυλάσσει τα σύμπλοκα DNA-Cisplatin από την επιδιορθωτική μηχανή. Ένα εναλλακτικό μονοπάτι ανάπτυξης αντοχής περιλαμβάνει την αυξημένη παράκαμψη της αντιγραφής, μέσω της οποίας ορισμένες DNA πολυμεράσες, όπως η «β» και η «η», μπορούν να αντιπαρέλθουν τα σύμπλοκα DNA-Cisplatin χωρίς να παρεμποδίζεται η δράση τους. Τέλος, καθοριστικό ρόλο στην ανθεκτικότητα έναντι της τοξικής δράσης της Cisplatin κατέχει και η μειωμένη ενεργότητα, ή απώλεια, του αποπτωτικού μηχανισμού, η οποία επιτυγχάνεται δια μέσου ποικίλων διαδικασιών, όπως η λειτουργική αδρανοποίηση της ογκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η επαγωγή των αντι-αποπτωτικών μορίων Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub>, η μειορρύθμιση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bad, η αυξημένη σηματοδοτική δράση του PI3K/Akt μονοπατιού, η παρεμπόδιση της ενεργότητας των Κασπασών και η υπερ-έκφραση του *Ras* γονιδίου ή η εμφάνιση μεταλλαγών σε αυτό (**Εικόνα 1.40**) [306, 307, 309, 313, 314, 316, 327-333].



**Εικόνα 1.40** Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των όγκων στη Cisplatin μετά την πρόσδεση αυτής στο DNA, σχηματικά [306].



Με βάση τις νέες πληροφορίες που αφορούν στους μηχανισμούς δράσης και φαρμακολογικής ανοχής των όγκων, μπορούν να προταθούν τεσσάρων ειδών στρατηγικές για την παράκαμψη και επιτυχή αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των ασθενών με καρκίνο στη Cisplatin. Αυτές περιλαμβάνουν: α) χρήση στην κλινική πράξη νέων και βελτιωμένων φαρμάκων πλατίνας, όπως Oxaliplatin (Οξαλιπλατίνη), Picoplatin (Πικοπλατίνη) και Satraplatin (Σατραπλατίνη), β) βελτιωμένους τρόπους παροχής και στόχευσης της πλατίνας στους όγκους μέσω λιποσωμάτων, πρόσδεσης σε υδατοδιαλυτά συν-πολυμερή και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αυτής, γ) συν-χορηγεία των φαρμάκων πλατίνας με φαρμακολογικούς στοχευμένους ρυθμιστές των μηχανισμών ανθεκτικότητας, όπως Decitabine (Ντεσιταμπίνη ή αλλιώς 2'-δεοξυ-5'-αζακυτιδίνη) που αποτελεί ισχυρό από-μεθυλιωτικό παράγοντα του DNA και TLK286 το οποίο αποτελεί προ-φάρμακο που ενεργοποιείται από τα υψηλά επίπεδα του ενζύμου GSTP1 στους ανθεκτικούς στη Cisplatin όγκους και δ) συνδυασμός των φαρμάκων πλατίνας με νέα μοριακά στοχευμένα φάρμακα, όπως τα Bevacizumab (Μπεβασιζουμάμπη, αναστολέας της αγγειογένεσης) και Trastuzumab (Τραστουζουμάμπη, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα HER2 παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του EGF και αποτρέποντας τη μετάδοση σήματος που σχετίζεται με απορρυθμισμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό) [306, 307, 316, 332, 334-339].

#### **1.4.1.2 Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη)**

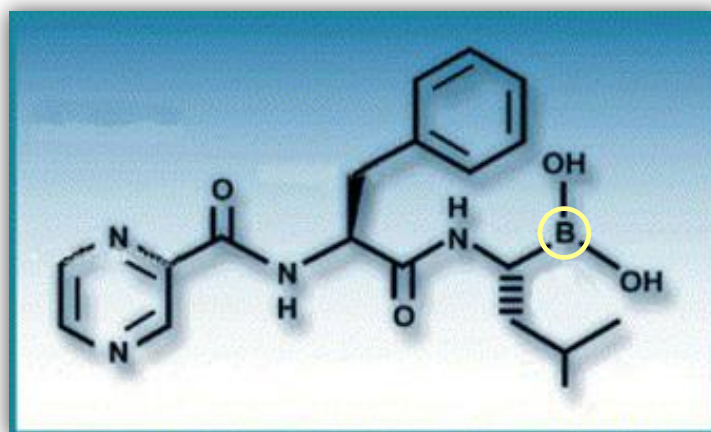
Το Bortezomib ως μία χημική ουσία βασισμένη στο άτομο του Βορίου, “B” (*Boron*), με μοριακό τύπο  $C_{19}H_{25}BN_4O_4$  και μοριακό βάρος 384,237 g/mol, συντέθηκε για πρώτη φορά το έτος 1995 από την εταιρεία Myogenics/ProScript (Boston, USA). Το φάρμακο, έχοντας αλλάξει δύο διαφορετικά ονόματα, MG-341 και PS-341, με τελική πλέον αποδεκτή ονομασία Bortezomib ως δραστικό συστατικό, και Velcade ως εμπορικό σκεύασμα, αποτελεί από τον μήνα Μάιο του έτους 2003, και μετά την τελική έγκριση και πιστοποίηση χρήσης του σε κλινικό επίπεδο από τον αρμόδιο οργανισμό FDA (*Food and Drug Administration*, USA), ένα από τα σημαντικότερα θεραπευτικά εργαλεία στην αντιμετώπιση του ανθρώπινου πολλαπλού μυελώματος (*multiple myeloma*) [340-344].

Σήμερα, το Bortezomib, διακινούμενο εμπορικά από την εταιρεία Millennium Pharmaceuticals (Massachusetts, USA) και την Janssen-Cilag, αποτελεί, είτε σε

μορφή «μονο-σχήματος» (μόνο Bortezomib), είτε σε μορφή φαρμακευτικού «κοκτέιλ» (για παράδειγμα, Bortezomib σε συνδυασμό με Carboplatin, Vorinostat, Doxorubicin, Gemcitabine και Irinotecan), ένα από τα σημαντικότερα δραστικά χημειοθεραπευτικά συστατικά πλήθους, υπό εξέλιξη, κλινικών δοκιμών που στοχεύουν στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση διαφορετικών τύπων ανθρώπινων κακοηθειών, χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων αποτελούν το πολλαπλό μυέλωμα, ο μη-μικρο-κυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (*non-small cell lung cancer, NSCLC*), ο καρκίνος του προστάτη (*prostate cancer*), το καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων (*renal cell carcinoma*) και η οξεία μυελογενής λευχαιμία (*acute myeloid leukemia, AML*) [342, 343, 345, 346].

Η φαρμακοδυναμική του ισχύς προσδιορίζεται από την ποσοτικοποίηση του βαθμού αναστολής του πρωτεασώματος των περιφερικών μονοκυττάρων του αίματος. Η εντυπωσιακά ενισχυμένη ευαισθησία κυτταρικών σειρών μυελώματος στην κατάργηση της πρωτεασωμικής λειτουργίας υπό τη δράση του Bortezomib, σε σχέση με την αντίστοιχη άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών, καθώς και φυσιολογικών περιφερικών μονοκυττάρων, αποτελεί ένα εντυπωσιακό, αλλά προς το παρόν αδιευκρίνιστο, φαινόμενο με ιδιαίτερη αξία στην κλινική πράξη της χημειοθεραπευτικής αντιμετώπισης του πολλαπλού μυελώματος. Παρ' όλες τις παράπλευρες τοξικές του δράσεις, όπως αυτές εκδηλώνονται με την ανάπτυξη περιφερικής νευροπάθειας (*peripheral neuropathy*) στο περίπου 30% των ασθενών, καθώς και μυελοκαταστολής (*myelosuppression*) με τη μορφή ουδετεροπενίας και θρομβοκυτταροπενίας, το Bortezomib παραμένει μία από τις ισχυρότερες και πλέον αποτελεσματικές φαρμακολογικές επιλογές, τόσο σε πρωτόκολλα συνδυασμένης χορήγησής του με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (για παράδειγμα, αναστολείς του VEGF ή αναστολείς της οικογένειας των απο-ακετυλασών των ιστονών τύπου HDAC), όσο και σε αυτά όπου δοκιμάζεται η ανεξάρτητη και αυτόνομη ογκο-κατασταλτική του ενεργότητα σε μορφή φαρμακολογικών «μονο-σχημάτων» [340, 341, 344, 347].

Το Bortezomib (*N-pyrazinecarbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid*) δομικά συνιστά ένα τροποποιημένο διπεπτίδιο βορονικού οξέος, ενώ λειτουργικά χαρακτηρίζεται ως ένας μοναδικός, ισχυρός και ειδικός αναστολέας των ενδοκυτταρικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από το πρωτεάσωμα (**Εικόνα 1.41**) [347, 348].



**Εικόνα 1.41** Συντακτική δομή του Bortezomib, η διπεπτιδική οργάνωση του οποίου αναπαριστάται εναλλακτικά ως Pyz-Phe-BoroLeu (όπου, Phe: Φαινυλαλανίνη, Leu: Λευκίνη και B: Βόριο [347]).

Το 26S πρωτεάσωμα (*proteasome*) (όπου ως “S” ορίζεται ο συντελεστής καθίζησης “Svedberg” που αντανακλά το συνολικό μοριακό βάρος και το τρισδιάστατο σχήμα ενός βιομορίου ή ενός πολυ-βιομοριακού συμπλέγματος) συνιστά ένα πολυ-πρωτεϊνικό και πολυ-καταλυτικό ενζυμικό σύμπλεγμα, το οποίο ανιχνεύεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα όλων των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η πρωταρχική λειτουργία του πρωτεασώματος εντοπίζεται όχι μόνο στην αποικοδόμηση των εσφαλμένως και ανορθόδοξα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον χώρο ή των μεταλλαγμένων και δομικά ελαττωματικών (έως και κατεστραμμένων) μορφών, αλλά και των διακριτών φυσιολογικών πρωτεϊνικών συστατικών η απουσία ή παρουσία των οποίων δρα καταλυτικά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή/και της κυτταρικής επιβίωσης. Ανάμεσα στα υποστρώματα στόχους του πρωτεασώματος συγκαταλέγονται, μεταξύ άλλων, μεταγραφικοί παράγοντες (και ρυθμιστικά συμπλέγματα αυτών), μόρια μεταγωγής σήματος, ογκο-κατασταλτικοί σηματοδότες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων δίνονται ως ακολούθως [343, 345, 349-351]:

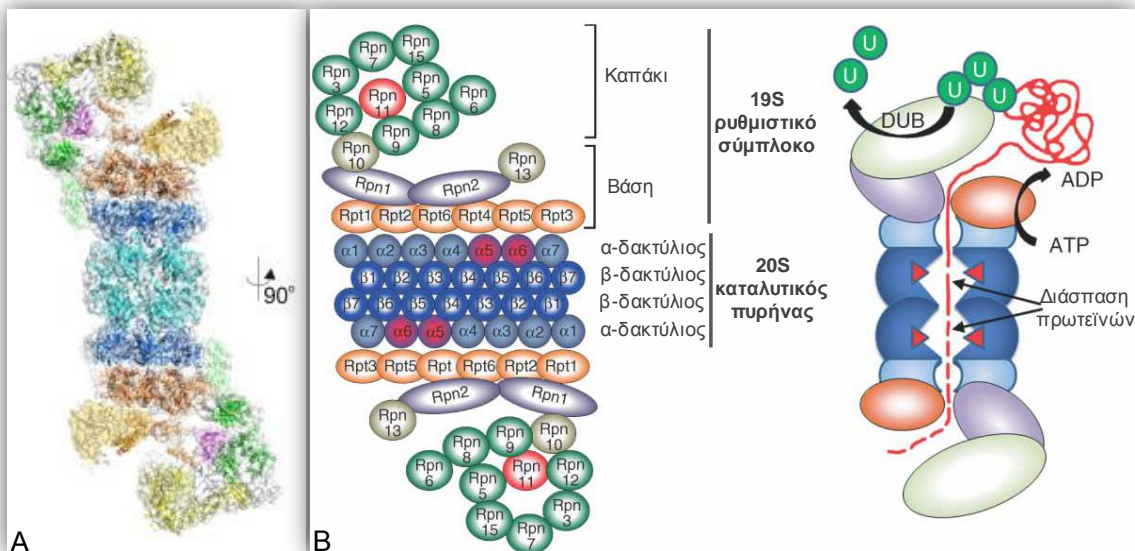
- ▶ IκB: αναστολέας του NFκB μεταγραφικού συμπλόκου-παράγοντα
- ▶ p53: ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη-μεταγραφικός παράγοντας – καταστολή από την πρωτεΐνη MDM2
- ▶ HIF1α: μεταγραφικός παράγοντας σταθεροποιούμενος από υποξία

- ▶ pRb: αναστολέας του μεταγραφικού παράγοντα E2F1
- ▶ Bax: επαγωγέας απόπτωσης
- ▶ IAPs (XIAP, cIAP-1 και cIAP-2): αναστολείς απόπτωσης
- ▶ Bcl-2: αναστολέας απόπτωσης
- ▶ c-Myc και N-Myc: αδιευκρίνιστος ο μηχανισμός συσχέτισης υπερ-έκφρασης αυτών και αντι-ογκογόνου απόκρισης – μεταγραφικοί παράγοντες
- ▶ c-Fos και c-Jun: μεταγραφικοί παράγοντες
- ▶ JNK: κινάση – ενεργοποίηση των Κασπασών 8 και 3 μετά από υπερ-έκφραση αυτής
- ▶ Cdc25: φωσφατάση εμπλεκόμενη στον κυτταρικό κύκλο
- ▶ Cyclins (A, B, D και E): ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιητές των Cdk (Cyclin-dependent kinases)
- ▶ p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>: αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Cdk)
- ▶ Δομικά ελαττωματικές -μεταλλαγμένες- πρωτεΐνες: ενεργοποίηση απόπτωσης μετά τη συσσωμάτωση αυτών

Όταν καταστέλλεται η αποικοδόμηση των εν λόγω πρωτεϊνών, το κυτταροβιολογικό αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα δραματικό ειδικότερα για τα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα, τα οποία ενδεχομένως απαιτούν υψηλή διαθεσιμότητα «μιτογόνων» πρωτεϊνών που υποστηρίζουν σθεναρά την επιταχυνόμενη και ανεξέλεγκτη μιτωτική πορεία. Ως εκ τούτου, η αναστολή της αποικοδομητικής ενεργότητας του πρωτεασώματος θα μπορούσε να διακόψει, ή να επιβραδύνει, την πορεία ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου όγκου μέσω της πρόκλησης ενός προγράμματος αποπτωτικού θανάτου, όπως έχει αποκαλυφθεί σε περιπτώσεις κυττάρων τόσο ανθρώπινου πολλαπλού μυελώματος όσο και καρκίνου ωοθηκών, προστάτη, παγκρέατος, καθώς και λευχαιμίας [342, 345, 347, 349, 350].

Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από έναν 20S καταλυτικό πυρήνα και δύο 19S ρυθμιστικά συμπλέγματα, τοποθετημένα στα αμφότερα άκρα του κεντρικού 20S σωματιδίου. Η 20S «ψύχα» (*core*) του πρωτεασώματος συγκροτείται από δύο εξωτερικούς (με  $\alpha 1 - \alpha 7$  πρωτεϊνικές υπομονάδες, έκαστος) και δύο εσωτερικούς (με  $\beta 1 - \beta 7$  πρωτεϊνικές υπομονάδες, έκαστος) δακτυλίους (*rings*), η επάλληλη στίβαξη

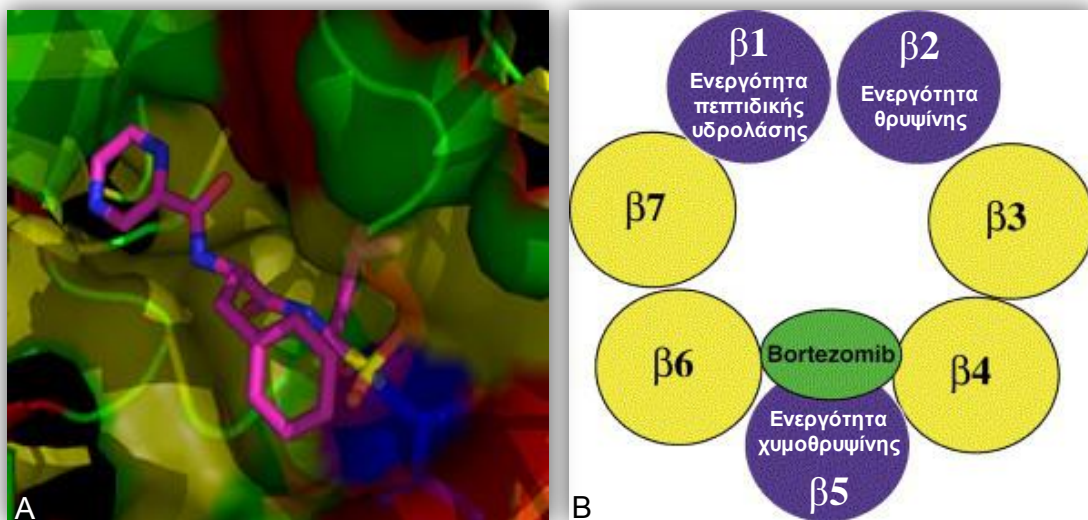
των οποίων οδηγεί στη δημιουργία μίας υπερμοριακής δομής σχήματος κυλίνδρου. Ο εν λόγω κύλινδρος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός εσωτερικού διαύλου, η περιορισμένη διάμετρος του οποίου επιτρέπει την εκλεκτική διόδο μόνο των αποδιαταγμένων ή στοχευμένα τροποποιημένων (για παράδειγμα, φωσφορυλιωμένων και ουμπικουϊτινωμένων), αλλά όχι των «φυσιολογικών», πρωτεϊνών. Στο 19S σωματίδιο, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ανιχνεύονται τουλάχιστον 18 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες κατανέμονται σε δύο διακριτά υπο-συγκροτήματα, ευρέως γνωστά ως «βάση» (*base*) και «καπάκι» (*lid*). Η «βάση» θεμελιώνεται από 6 ATPάσες, τις Rpt1-6, και δύο μη-ATPάσες, τις Rpn1 και Rpn2, ενώ συνδέεται απευθείας με τον δακτύλιο «α» του 20S κεντρικού σωματιδίου και θεωρείται υπεύθυνη για το ξεδίπλωμα των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Αντίθετα, το «καπάκι» δομείται από τις 8 μη-ATPάσες Rpn3, Rpn5-9, Rpn11 και Rpn12, και είναι η θέση η οποία αναγνωρίζει τα πολυ-ουμπικουϊτινωμένα υποστρώματα, ενώ συγχρόνως προκαλεί διάσπαση των αλυσίδων ουμπικουϊτίνης σε μονομερή που επαναχρησιμοποιούνται. Ανάμεσα στα δύο υπο-συγκροτήματα, «βάση» και «καπάκι», τοποθετούνται δύο μη-ATPάσες, οι Rpn10 και Rpn13, οι οποίες συνιστούν τους κύριους υποδοχείς της αναγνώρισης και σύνδεσης ουμπικουϊτίνης. (Εικόνα 1.42) [347-350, 352-357].



**Εικόνα 42.** Μοριακό μοντέλο της δομής και γενικός μηχανισμός δράσης του 26S πρωτεασώματος. **A.** Τρισδιάστατη δομή, όπου οι βασικές υπομονάδες είναι κωδικοποιημένα χρωματισμένες. **B.** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης και διεύθετησης των  $\alpha$ - και  $\beta$ -δακτυλίων που διαμορφώνουν τον 20S καταλυτικό πυρήνα, μαζί με τις Rpt και Rpn πρωτεϊνικές υπομονάδες των

19S ρυθμιστικών σωματιδίων του 26S πρωτεασώματος (αριστερά) (όπου οι α5 και α6 υπομονάδες που έχουν τονιστεί με κόκκινο κατέχουν δράση RNάσης), και εικονογραφημένη παράσταση της ειδικής αποικοδομητικής λειτουργίας αυτού (δεξιά). DUB: Deubiquitinating enzymes, ένζυμα αποσυμπικουϊτίνωσης (A: [352] και B: [358]).

Ενώ οι δύο α δακτύλιοι ενώνονται με τα αντίστοιχα 19S ρυθμιστικά σωματίδια, διαμορφώνοντας τον στενό διάυλο εισόδου των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών, οι δύο β δακτύλιοι σχηματίζουν τον καταλυτικό θάλαμο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τρεις διακριτές ενζυμικές ενεργότητες (συνολικά 6 ενεργά κέντρα), συμβατικά αποκαλούμενες ως: (α) η προσομοιάζουσα με αυτή της χυμοθρυψίνης (*chymotrypsin-like*) (υπομονάδα β5), (β) η προσομοιάζουσα με αυτή της θρυψίνης (*trypsin-like*) (υπομονάδα β2) και (γ) προσομοιάζουσα με αυτή της πεπτιδικής υδρολάσης σε «μετα-γλουταμυλική» θέση (*post-glutamyl peptide hydrolase-like: PGPH*) («ψευδο-ενεργότητα Κασπάσης») (υπομονάδα β1) (**Εικόνα 1.43**).



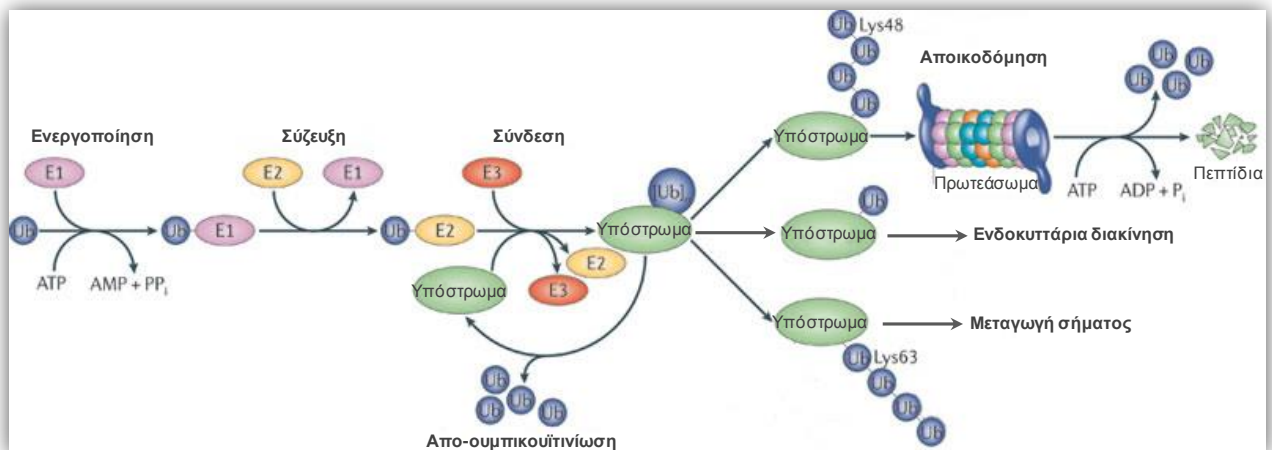
**Εικόνα 1.43** Α. Τρισδιάστατο, «χωροπληρωτικό» μοντέλο της μοριακής δομής του Bortezomib, όπου αποκαλύπτεται η ειδική αλληλεπίδραση με διακριτά δομικά στοιχεία του πρωτεασώματος (του ζυμομύκητα). Β. Σχηματική παρουσίαση της θέσης ειδικής δέσμευσης του Bortezomib στην υπομονάδα β5, εντός της περιοχής του β δακτυλίου (μία κρίσιμη θρεονίνη) που ευθύνεται για την πρωτεολυτική ενεργότητα τύπου χυμοθρυψίνης (A: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org) και B: [347]).

Οι προορισμένες προς αποικοδόμηση πρωτεΐνες πρωτεολύονται από τον 20S καταλυτικό πυρήνα με προοδευτικό και καθορισμένο τρόπο, απελευθερώνοντας πεπτίδια σχετικού μήκους 3 – 25 αμινοξέων. Η ανασταλτική δράση του Bortezomib εντοπίζεται στην ικανότητα αυτού να αναγνωρίζει, και να συνδέεται, εκλεκτικά και ομοιοπολικά σε ένα κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης της β5 υπομονάδας του 20S πυρήνα, το οποίο σχετίζεται άμεσα με την πρωτεολυτική ενεργότητα τύπου χυμοθρυψίνης. Η συγγένεια σύνδεσης, αν και αντιστρεπτής μορφής, είναι εξαιρετικά υψηλής τάξης μεγέθους ( $K_i = 0.6 \text{ nM}$ ), διασφαλίζοντας έτσι την ειδική και σταθερή (δεδομένου του αργού ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου) στόχευση σε σχέση με την λειτουργική αδρανοποίηση του πρωτεασώματος (**Εικόνα 1.43**) [347, 348, 350, 356, 359-361].

Ο κώδικας αναγνώρισης των πρωτεϊνών που προορίζονται για πρωτεολυτική αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα περιλαμβάνει, κυρίως, μία ειδικού τύπου μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία χαρακτηρίζεται από την ομοιοπολική προσθήκη ενός μικρού πεπτιδίου 76 αμινοξέων με μοριακό βάρος 8,5 kDa, ευρέως αποκαλούμενο ως ουμπικουϊτίνη (*ubiquitin*), σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης (*lysine*) της πρωτεΐνης στόχου. Οι επισημασμένες (*tagged*), με τουλάχιστον 4 μόρια ουμπικουϊτίνης, πρωτεΐνες αναγνωρίζονται εκλεκτικά από το 19S ρυθμιστικό σύμπλεγμα, όπου και πραγματοποιείται η απομάκρυνση της ουμπικουϊτίνης με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή της σε ένα νέο κύκλο ρυθμιζόμενης πρωτεόλυσης. Τα δομικά συστατικά της βάσης του 19S σωματιδίου μέσω της ενδογενούς ενεργότητας τύπου μοριακού συνόδου που κατέχουν, και μετά από κατανάλωση ATP, μπορούν να αποδιατάσσουν-«ξεδιπλώνουν» τα πρωτεϊνικά υποστρώματα, προωθώντας τα διαδοχικά στο εσωτερικότερο καταλυτικό διαμέρισμα του 20S σωματιδίου για πρωτεολυτική διάσπαση [343, 362, 363].

Η διαδικασία της στοχευμένης ουμπικουϊτινίωσης πρωτεϊνών στόχων ελέγχεται από την ιεραρχικά ρυθμιζόμενη δραστηριότητα τριών τύπων ενζύμων, ευρέως γνωστών ως E1, E2 και E3. Το ένζυμο E1 ενεργοποιεί την ουμπικουϊτίνη μέσω υδρόλυσης ATP και τη μεταφέρει διαδοχικά σε ένα κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης του E2, το οποίο με τη σειρά του προσφέρει την ουμπικουϊτίνη στο ένζυμο E3. Η ικανότητα του E3 να συνδέεται με την εκάστοτε πρωτεΐνη και συγχρόνως να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο E2-ουμπικουϊτίνη, του επιτρέπει να μεταφέρει και να συνδέει ομοιοπολικά την ουμπικουϊτίνη στην πρωτεΐνη στόχο,

δημιουργώντας έτσι μία ειδική «ετικέτα» (“*flag*”) επισήμανσης αυτής που θα την κατευθύνει στοχευμένα στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Αν και ο ακριβής αριθμός των E3 ενζύμων, ή όπως εναλλακτικά αποκαλούνται E3 λιγασών ουμπικουϊτίνης (*E3 ubiquitin ligases*), παραμένει άγνωστος, υπολογίζεται πως το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περισσότερα από 500 διακριτά πρωτεϊνικά μέλη. Το γεγονός αυτό όχι μόνο διασφαλίζει την εκλεκτικότητα, ειδικότητα, αξιοπιστία και ασφάλεια του μηχανισμού ρυθμιζόμενης αποικοδόμησης πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα, αλλά ενδεχομένως ενδεικνύει και τον θεμελιώδη βιολογικό τους ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών, περιλαμβάνοντας, μεταξύ άλλων, την απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες, την ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, καθώς και την ενεργοποίηση ενός προγράμματος κυτταρικού θανάτου τύπου απόπτωσης ή/και αυτοφαγίας (**Εικόνα 1.44**) [343, 347, 348, 362-364].



**Εικόνα 1.44** Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων και των ενζύμων που συμμετέχουν στο σύστημα ουμπικουϊτίνωσης των προς αποικοδόμηση και σηματοδότηση πρωτεϊνών στόχων (υποστρωμάτων) (τροποποιημένο από [365]).

Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει επιπρόσθετους ρόλους της ουμπικουϊτίνωσης πέραν αυτού της πρωτεόλυσης, οι οποίοι εξαρτώνται από τη θέση σύζευξης, καθώς και από τον αριθμό των μορίων ουμπικουϊτίνης που θα προσδεθούν. Συγκεκριμένα, ενώ όταν η αλυσίδα της πολυ-ουμπικουϊτίνης (τουλάχιστον 4 μόρια ουμπικουϊτίνης) συνδέεται στη θέση λυσίνη 48 (*Lys48* ή *K48*) της πρωτεΐνης στόχου, ενεργεί ως σήμα για την εκ του πρωτεασώματος μεσολαβούμενη πρωτεόλυσή της, όταν συνδέεται στη λυσίνη 63 (*Lys63* ή *K63*) προωθεί τη συγκρότηση συμπλόκων που δύνανται να οδηγήσουν σε ενδοκύττωση, ενεργοποίηση σηματοδοτικών



μονοπατιών, όπως αυτό των ΙΚΚ, τροποποιήσεις του ριβοσώματος και επιδιόρθωση του γονιδιωματικού DNA. Επίσης, η μονο-ουμπικουϊτινίωση της πρωτεΐνης στόχου, οδηγεί συνήθως σε αλλαγές που αφορούν τόσο στη λειτουργία όσο και στα μονοπάτια ενδοκυτταρικής διακίνησης (*intracellular trafficking*) αυτής. Μονο-ουμπικουϊτινίωση των ιστονών (*histones*) φαίνεται να συσχετίζεται με δομική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, αλλά και ενεργοποίηση ειδικών σηματοδοτικών δικτύων (**Εικόνα 1.44**) [353, 365-374].

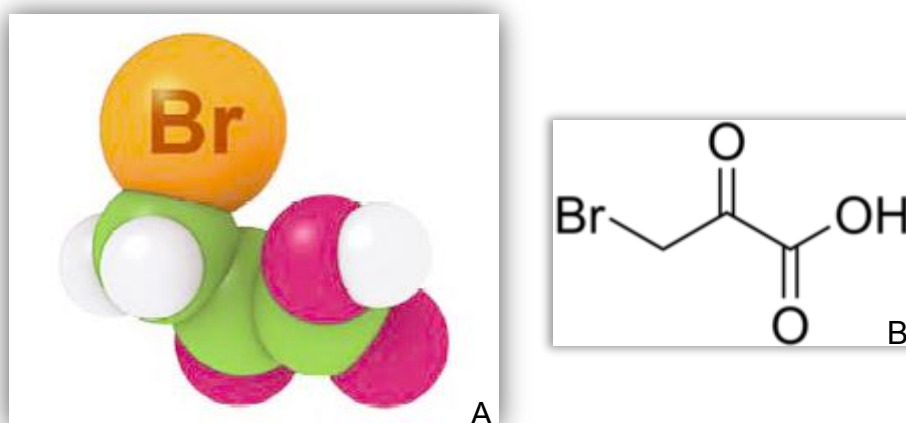
Ένα από τα πλέον μελετημένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από τη δράση του συστήματος ουμπικουϊτίνης-πρωτεασώματος είναι αυτό του μεταγραφικού παράγοντα-συμπλόκου NFκB (p50/p65 υπομονάδες) και του ρυθμιστικού συμπλόκου του NFκB/IκB. Υπό φυσιολογικές συνθήκες κυτταρικής ανάπτυξης, ο NFκB κατακρατείται στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasmic sequestration-retention*) σε λειτουργικά ανενεργή μορφή μέσω της υψηλής συγγένειας σύνδεσης με τον ομοειδή πρωτεϊνικό του αναστολέα IκB. Αντίθετα, σε συνθήκες κυτταρικού στρες, ο IκB αναστολέας φωσφορυλιώνεται εκλεκτικά από το σύστημα των ΙΚΚ ενδοκυτταρικών κινασών και μέσω της διαδοχικής του πολυ-ουμπικουϊτινίωσης κατευθύνεται στο πρωτεάσωμα, όπου και αποικοδομείται, ελευθερώνοντας και επιτρέποντας έτσι στον NFκB να μετακινηθεί στον κυτταρικό πυρήνα και να ενεργοποιήσει μεταγραφικά τα ομοειδή γονίδια στόχους του. Ως εκ τούτου, η αναστολή της δράσης του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα την απαγόρευση της πυρηνικής διαμερισματοποίησης του NFκB μεταγραφικού παράγοντα και τη συνεχή απομόνωσή του στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που οδηγεί στην μεταγραφική καταστολή των αντι-αποπτωτικών γονιδίων στόχων αυτού και στην ενδεχόμενη ανάπτυξη γενικευμένης χημειο-ευαισθησίας των εκάστοτε υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων [345, 347, 350, 351, 353, 375-379].

Ιδιαίτερης σημασίας κρίνεται και η ρύθμιση του μοριακού μονοπατιού του p53 μεταγραφικού παράγοντα σε πολλαπλά επίπεδα από την ουμπικουϊτίνη. Το γονίδιο *MDM2* αποτελεί βασικό στόχο της p53, αλλά ταυτόχρονα και κρίσιμο αρνητικό ρυθμιστή αυτής. Αυτό συμβαίνει διότι η *MDM2* πρωτεΐνη συνιστά μία E3 λιγάση, η οποία προκαλεί την ρυθμιζόμενη πολυ-ουμπικουϊτινίωση της p53 οδηγώντας την στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση παρεμποδίζοντας έτσι την μεταγραφική της λειτουργία (για παράδειγμα, την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *p21<sup>Cip1/Waf1</sup>* και *MDM2*). Αντίθετα, η μονο-ουμπικουϊτινίωση της p53

προκαλεί την έξοδό της από τον κυτταρικό πυρήνα και τη μετάβασή της στο μιτοχόνδριο, σε συνθήκες στρες, όπου και ρυθμίζει τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασης με διακριτά μέλη της υπερ-οικογένειας Bcl-2 [365, 380-384].

#### 1.4.1.3 3-Bromopyruvate (3-Βρωμοπυροσταφυλικό οξύ)

Το 3-BrPA (*3-Bromo-Pyruvic Acid* ή *3-Bromopyruvate* ή *3-Bromo-2-oxopropanoic Acid*, 3-Βρωμοπυροσταφυλικό Οξύ) αποτελεί ένα αλογονοποιημένο παράγωγο του πυροσταφυλικού οξέος και έναν ισχυρό αλκυλιωτικό παράγοντα, ο οποίος δρα στις ελεύθερες σουλφυδρικές ομάδες των καταλοίπων κυστεΐνης σε πρωτεΐνες (Εικόνα 1.45). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση του παρασίτου *Trypanosoma brucei* ως γλυκολυτικός αναστολέας, καθώς το πρωτόζωο αυτό παράγει ATP κυρίως μέσω γλυκόλυσης [211, 385-387].



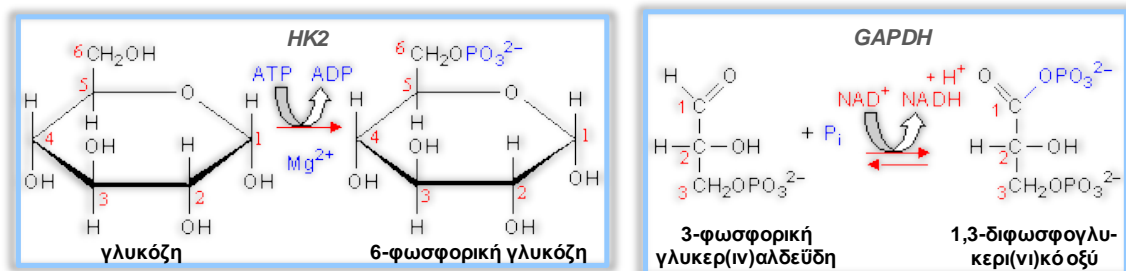
**Εικόνα 1.45** «Χωροπληρωτικό» μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του 3-BrPA (A), καθώς και ο συντακτικός τύπος αυτού (B) (A: <http://www.blumdesignwerks.com> και B: <http://en.wikipedia>).

Το συνθετικό παράγωγο του πυροσταφυλικού οξέος και δομικό ανάλογο του (γα)λακτικού οξέος (*lactic acid*), 3-BrPA, λειτουργεί ως εκλεκτικός αναστολέας μεταβολικών ενζύμων, χαρακτηριστικότερος αντιπρόσωπος των οποίων αποτελεί το ένζυμο HK2 (*Hexokinase II*, Εξωκινάση 2), που συνιστά έναν κομβικό γλυκολυτικό πρωτεϊνικό ρυθμιστή, η ενζυμική ενεργότητα του οποίου ευθύνεται για τη μετατροπή της γλυκόζης (*Glucose*) σε 6-φωσφορική γλυκόζη (*Glucose-6-P*), συνοδευόμενη από σύγχρονη κατανάλωση ATP (Εικόνα 1.46). Η φωσφορυλιωμένη (ενδεχομένως μέσω της Akt κινάσης) HK2 προσδένεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου

αλληλεπιδρά με τον διάυλο ανιόντων VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), μέσω της αμινοτελικής και της πιθανής BH4 περιοχής της [388, 389]. Η τοπολογία αυτή της δίνει το πλεονέκτημα πρόσβασης στο ATP που παρέχει το μιτοχόνδριο (στη μορφή MgATP) και της προσφέρει ανθεκτικότητα στην αρνητική ανάδρομη καταστολή της από την 6-φωσφορική γλυκόζη. Η αλληλεπίδραση της HK2 με το διάυλο VDAC ανταγωνίζεται την πρόσδεση της πρωτεΐνης Bcl-X<sub>L</sub> στο VDAC. Ως εκ τούτου, η απελευθερωμένη Bcl-X<sub>L</sub> πρωτεΐνη προσδένεται με την Bax, αποτρέποντας τη σύνδεση της τελευταίας με την πρωτεΐνη Bak, γεγονός που θα οδηγούσε στη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και στη δημιουργία διαύλου, μέσω του οποίου το κυτόχρωμα *c* και ο προ-αποπτωτικός παράγοντας AIF θα απελευθερώνονταν από το μιτοχόνδριο επάγοντας τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση ή προγραμματισμένη νέκρωση). Επιπροσθέτως, η προσδεσμένη στο μιτοχόνδριο HK2 φαίνεται πως ελαττώνει τα επίπεδα παραγωγής ελεύθερων ριζών ROS από το μιτοχόνδριο μέσω ενός μηχανισμού ανακύκλωσης του ADP. Καθίσταται λοιπόν σαφές πως η HK2 είναι απαραίτητη για τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα (όπως τα καρκινικά), καθώς από τη μία προστατεύει το κύτταρο από την αποπτωτική διαδικασία και από την άλλη υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών έχοντας προνομιούχο πρόσβαση στο νεο-συντιθέμενο ATP [387, 390-397].

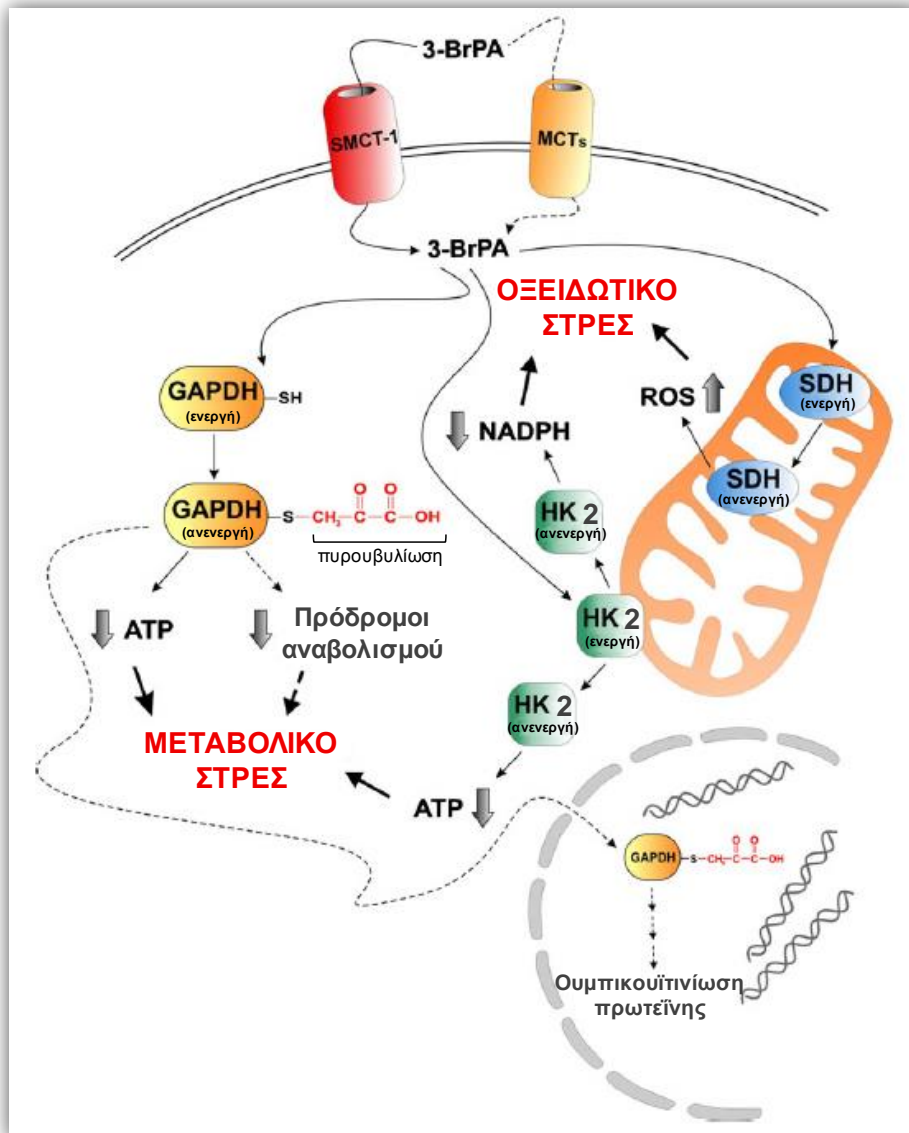
Η σύνδεση λοιπόν της μιτοχονδριακής HK2 στη VDAC πρωτεΐνη κρίνεται απαραίτητη για την επιβίωση και εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου. Την αλληλεπίδραση αυτή προάγει και η ενεργοποιημένη Akt κινάση μέσω δύο βασικών μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά στη μετατόπιση της Akt κινάσης στο μιτοχόνδριο και στην διαδοχική άμεση φωσφορυλίωση της μιτοχονδριακής HK2 πρωτεΐνης, στη θέση του κρίσιμου αμινοξικού καταλοίπου θρεονίνη 473 (*Thr*<sup>473</sup>), ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό θετικά την πρόσδεση της HK2 στον διάυλο VDAC [389, 398, 399]. Ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την έμμεση δράση της Akt, καθώς μέσω της απενεργοποίησής της επάγεται η δράση της GSK-3β κινάσης, η οποία μεταβαίνει στο μιτοχόνδριο όπου και φωσφορυλιώνει τον VDAC (πιθανότατα στη θέση θρεονίνη 51, *Thr*<sup>51</sup>), προκαλώντας την απομάκρυνση της HK2 από αυτόν και ευνοώντας έτσι την πρόσδεση της Bcl-X<sub>L</sub>, και ως εκ τούτου τη δρομολόγηση γεγονότων που θα οδηγήσουν στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τελικά στον κυτταρικό θάνατο [389, 400-404].

Ο γλυκολυτικός αναστολέας 3-BrPA φαίνεται ότι εισέρχεται εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα δια μέσου της χρήσης των, αυξημένων σε αριθμό, διαύλων (γα)λακτικού οξέος. Η ισχυρή εξάρτηση των κυττάρων ενός τυπικού υποξικού όγκου από την γλυκολυτική διαδικασία και η αναστολή του HK2 γλυκολυτικού ενζύμου από τη δράση του 3-BrPA, εντός του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος, δια μέσου ενδεχόμενης τροποποίησης ενός ή περισσότερων καταλοίπων κυστεΐνης, καθιστούν τον εν λόγω αναστολέα έναν ιδιαίτερα υποσχόμενο χημειοθεραπευτικό παράγοντα στην στοχευμένη αντιμετώπιση του ανθρώπινου καρκίνου. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η κυτταροτοξική δραστηριότητα του 3-BrPA εντοπίζεται κυρίως στην δραματική μείωση των επιπέδων του κυτταρικού ATP, εξαιτίας της παρεμπόδισης εισόδου της γλυκόζης στο γλυκολυτικό μονοπάτι και της αποδέσμευσης της HK2 από το μιτοχόνδριο, γεγονότα που σχετίζονται στενά και με μία σειρά αποπτωτικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την αποφωσφορυλίωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bad, την επακόλουθη μετακίνηση της πρωτεΐνης Bax στο μιτοχόνδριο, την διαδοχική απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* και AIF στο κυτοσόλιο και τελικά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [224, 405-408]. Συνήγορο στα εν λόγω φαινόμενα αποτελεί και η πρόσφατη αποκάλυψη της δράσης του 3-BrPA επί του μεταβολικού ενζύμου GAPDH [*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερ(ιν)αλδεΐδης], το οποίο καταλύει τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκερ(ιν)αλδεΐδης (*Glyceraldehyde-3-P*) σε 1,3-διφωσφογλυκερι(νι)κό (*1,3-Diphosphoglycerate*) (Εικόνα 1.46).



**Εικόνα 1.46** Τα μονοπάτια της γλυκόλυσης και οι κρίσιμοι βιοχημικοί δρόμοι αυτής, όπου εμπλέκονται τα δύο βασικά ένζυμα στόχοι του 3-BrPA, η HK2 εξωκινάση (*Hexokinase II*, Εξωκινάση 2) και GAPDH αφυδρογονάση (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερ(ιν)αλδεΐδης) [<http://www.rpi.edu>].

Μέσω της πυρουβιλώσης (*pyruvylation*) της εν λόγω αφυδρογονάσης στο ενεργό αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνη 152 (Cys<sup>152</sup>), το 3-BrPA εμφανίζει αρνητική επίδραση στην ενζυμ(ατ)ική της λειτουργία και προάγει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η τροποποίηση αυτή ενδεχομένως να οδηγεί στη μετατόπιση της GAPDH στον πυρήνα και στην επερχόμενη συμπικουϊτινίωση και αποικοδόμησή της, προσομοιάζοντας έτσι την επίδραση της *S*-νιτροζυλίωσης στο εν λόγω μόριο (Εικόνα 1.47) [405, 409-411].



**Εικόνα 1.47** Απεικόνιση των κυριότερων μεταβολικών στόχων του 3-BrPA που θεμελιώνουν την αντι-καρκινική του δράση. Η πρόσληψη του 3-BrPA πιθανολογείται πως πραγματοποιείται μέσω των μεταφορέων του λακτικού οξέος (SMCT1 και MCTs). Οι τελικές εκφάνσεις της δράσης του 3-BrPA αναπαρίστανται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα υποθετικά μονοπάτια σημειώνονται με στικτές γραμμές. SMCT1: *Sodium-coupled*

*monocarboxylate transporter 1*, Μονοκαρβοξυλικός μεταφορέας 1 συζευγμένος με νάτριο, MCTs: *Monocarboxylate transporters*, Μονοκαρβοξυλικοί μεταφορείς [405].

Αν και οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στην αντι-γλυκολυτική δυναμική του 3-BrPA, η δράση του εντοπίζεται και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως στην αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (*SDH, succinate dehydrogenase*), η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος και συμμετέχει καταλυτικά στην μιτοχονδριακή αναπνοή [405, 412]. Έτσι, αναστολή του ως άνω ενζύμου οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP και αυξημένη σύνθεση ROS. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα ROS στο κυτοσόλιο, εξαιτίας της καταστολής της μιτοχονδριακής HK2 εξωκινάσης και της μειωμένης αποτοξίνωσης των ROS λόγω των ελαττωμένων επιπέδων NADPH, αποκαλύπτουν έναν επιπλέον ρόλο του 3-BrPA στον κυτταρικό θάνατο, πέραν αυτού της επαγωγής βιοενεργητικής κρίσης, ο οποίος περιλαμβάνει κυρίως την απορρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (**Εικόνα 1.47**). Το μόριο NADPH, το οποίο παράγεται από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών ή από τον κύκλο του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο (παράγωγο του μηλικού οξέος), κρίνεται αναγκαίο ως θεμελιώδης συμπαράγοντας τόσο στη διαδικασία της λιπογένεσης όσο και στην αναγέννηση της αντι-οξειδωτικής γλουταθειόνης (*GSH*), η οποία συμμετέχει καθοριστικά στην αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών ROS στο κυτοσόλιο [393, 405].

Εκτός από την ισχυρή αντι-καρκινική δράση του σε επίπεδο κυτταρικών καλλιιεργειών (μεταξύ άλλων, HL60 ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων, Raji ανθρώπινων κυττάρων λεμφώματος και AS-30D ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος), ο γλυκολυτικός αναστολέας 3-BrPA επιδεικνύει και μία έντονη θεραπευτική δραστηριότητα *in vivo*, όπου τόσο η τοπική έγχυση όσο και η ενδοφλέβια χορήγηση αυτού σε συστήματα ανάπτυξης πειραματικών όγκων τύπου “Xenograft” (ετερόλογου μοσχεύματος ή αλλομοσχεύματος) (μεταξύ άλλων, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, παγκρεατικού όγκου και καρκίνου του μαστού) σε πρότυπους ζωικούς οργανισμούς (*animal models*) φαίνονται να καταστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη του εκάστοτε τύπου όγκου. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της κυτταροτοξικής δράσης του 3-BrPA εντοπίζεται στην ικανότητά του να εξοντώνει εκλεκτικά καρκινικά κύτταρα με έντονη μιτοχονδριακή ανεπάρκεια, ή/και κύτταρα

όγκου που αναπτύσσονται σε υποξικά περιβάλλοντα, συνθήκες που και οι δύο, συνήθως, προάγουν έντονα την ενίσχυση του γλυκολυτικού φαινοτύπου [386, 387, 408, 410, 413-415].

*Σκοπός*  
*Διδακτορικής Διατριβής*



## Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η διερεύνηση της ενεργοποίησης προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου τύπου απόπτωσης, αυτοφαγίας και νέκρωσης, σε συνδυασμό με τη μελέτη της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας κρίσιμων μονοπατιών σηματοδότησης, ως θεμελιώδεις βιομοριακές αποκρίσεις ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων στην συμβατική (Cisplatin) και στοχευμένη (Bortezomib και 3-BrPA) δράση επιλεγμένων φαρμακολογικού τύπου χημικών ενώσεων, με τελικό στόχο την ανάπτυξη αξιόπιστων προ-κλινικών, κυτταρικών και ζωικών, μοντέλων με ισχυρή θεραπευτική δυναμική έναντι διακριτών μορφών ανθρώπινης κακοήθειας και ειδικότερα αυτής της ουροδόχου κύστης.

*Υλικά και Μέθοδοι*

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

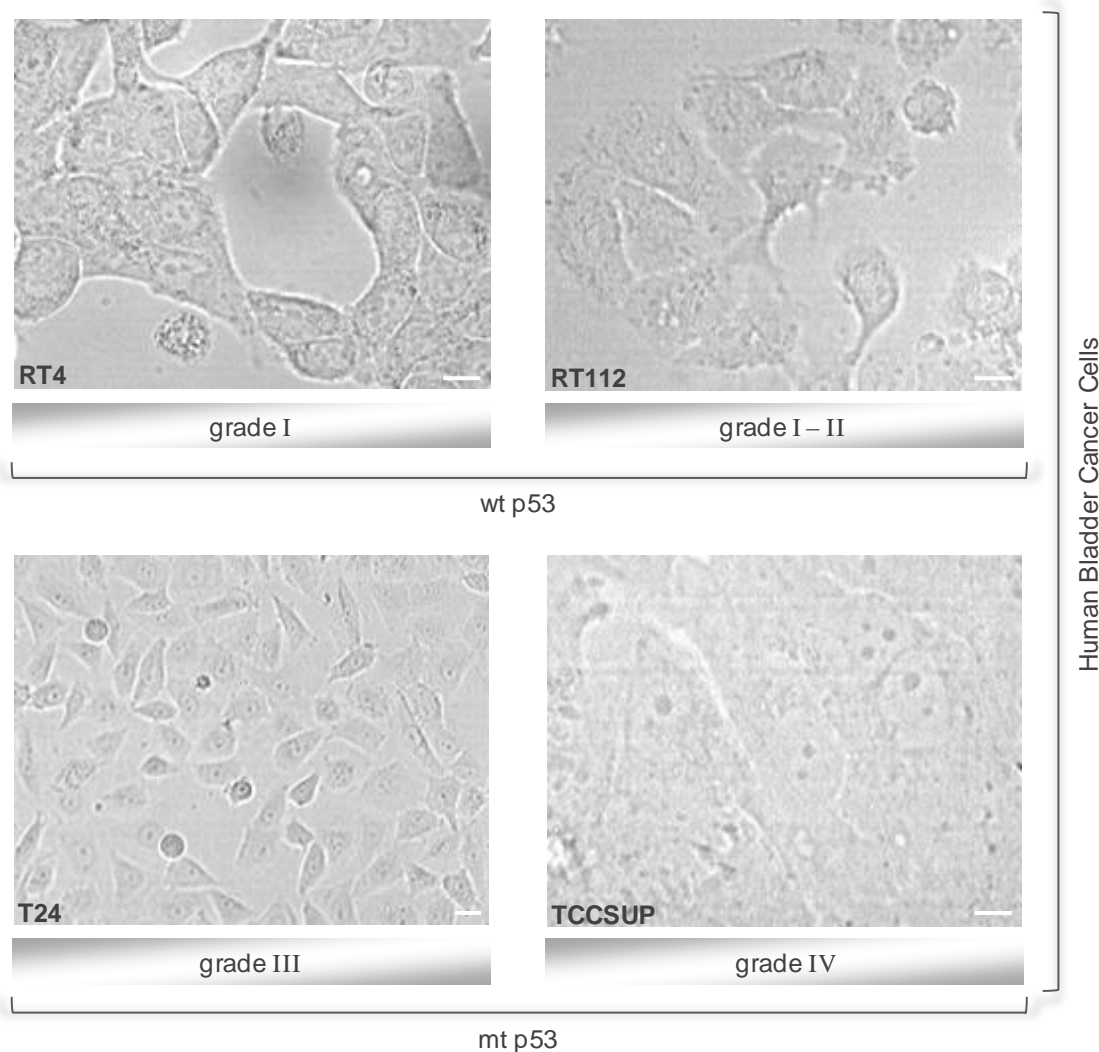
#### 2.1.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας, προερχόμενες από ανθρώπινο “*Transitional Cell Carcinoma, TCC*” καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ήταν οι RT4, RT112, T24 και TCCSUP (Πίνακας 2.1 και Εικόνα 2.1). Πρόκειται για κύτταρα διαφορετικού σταδίου, βαθμού κακοήθειας, μεταστατικότητας, διαφοροποίησης και γονιδιωματικού προφίλ. Η κυτταρική σειρά RT4 αγοράστηκε από την ATCC (*American Type Culture Collection*), οι T24 και RT112 προσφέρθηκαν από τον Professor J. R. Masters (Prostate Cancer Research Centre, Institute of Urology, UCL, London, UK), ενώ η TCCSUP χορηγήθηκε ευγενώς από τον Professor A. Ullrich (Max-Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany). Η T24-X αποτελεί μία νέα κυτταρική σειρά, η οποία προήλθε από όγκους αλλομοσχευμάτων T24 (“*Xenografts*”) ανοσο-ανεπαρκών ποντικών [*SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mice*] μετά από υποδόρια ένεση T24 καρκινικών κυττάρων (βλέπε 2.10). Τέλος, τα HCT116-*p53*<sup>+/+</sup> και HCT116-*p53*<sup>-/-</sup> ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Dr. J. C. Marine (VIB-K.U.Leuven, Leuven, Belgium).

**Πίνακας 2.1** Χαρακτηριστικά γνωρίσματα καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.

Κυτταρικός τύπος	Βαθμός κακοήθειας	Μεταστατικό δυναμικό	Διαφοροποίηση	Γενετικό υπόβαθρο <i>p53</i>
RT4	I	χαμηλό	υψηλή	wt <i>p53</i>
RT112	I - II	μέτριο	μέτρια	wt <i>p53</i>
T24	III	υψηλό	σχεδόν ανύπαρκτη	mt <i>p53</i>
TCCSUP	IV	υψηλό	ανύπαρκτη	mt <i>p53</i>

*wt (wild-type): φυσικός τύπος, mt (mutant): μεταλλαγμένος τύπος*



**Εικόνα 2.1** Φωτογραφίες ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης RT4, RT112, T24 και TCCSUP με τη χρήση ανάστροφης μικροσκοπίας. Παρατηρείται εμφανώς η δημιουργία μίας «ιστολογικού» τύπου οργάνωσης στα κύτταρα RT4 (χαμηλός βαθμός κακοήθειας), σε αντίθεση με τη «μονήρη» μορφή των T24 κυττάρων (υψηλός βαθμός κακοήθειας), τα οποία χαρακτηρίζονται, μεταξύ άλλων, τόσο από υψηλό μιτωτικό δείκτη, όσο και από ένα ιδιαίτερα ενισχυμένο μεταστατικό δυναμικό. *Human Bladder Cancer Cells*: Ανθρώπινα Καρκινικά Κύτταρα Ουροδόχου Κύστης, *grade*: βαθμός κακοήθειας, *wt* (*wild-type*): φυσικός τύπος, *mt* (*mutant*): μεταλλαγμένος τύπος (Ράβδοι Μεγέθυνσης: 10-20  $\mu\text{m}$ ).

Τα RT4 αποτελούν καρκινικά κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης και χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Προσομοιάζουν αρκετά στον φυσιολογικό φαινότυπο και δεν εμφανίζουν μεταστατικότητα. Είναι ευμεγέθη, έχουν πεπλατυσμένο σχήμα και διατάσσονται σε ομάδες-νησίδες. Ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι σχετικά χαμηλός,

όμοιος με αυτόν των φυσιολογικών ουροθηλιακών κυττάρων, ενώ περιέχουν φυσικού τύπου (*wt*) γονίδιο της πρωτεΐνης p53 («φύλακας-προστάτης» της γονιδιωματικής ακεραιότητας). Τα RT112 είναι κύτταρα ενδιάμεσης διαφοροποίησης, με κακοήθεια ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή των RT4. Εμφανίζουν μία σχετική οργάνωση, εμφανώς όμως χαλαρότερη από αυτή των χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας κυττάρων. Διαιρούνται αργά, ενώ το μεταστατικό τους δυναμικό διατηρείται σε μέτρια επίπεδα. Η καρκινική σειρά T24 απαρτίζεται από κύτταρα μεγάλης επιθετικότητας και κακοήθειας, ενώ η διαφοροποίησή της είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Τα κύτταρα έχουν σχήμα ατρακτοειδές με οξύληκτα άκρα, είναι σχετικά μικρά, ενώ διακρίνονται οι μεγάλοι πυρήνες με τους πολλούς πυρηνίσκους. Παρουσιάζουν πολύ υψηλό μιτωτικό δυναμικό, σχηματίζοντας *in vitro* πολύστιβες σειρές, ενώ η έντονη μεταστατικότητα που διαθέτουν αντανακλάται στον τρόπο που αναπτύσσονται, σε μονήρη μορφή, αποφεύγοντας τη συγκρότηση συσσωματωμάτων, όπως τα χαμηλότερης κακοήθειας κύτταρα. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου της πρωτεΐνης p53 που φέρει έλλειψη της TAC τριπλέτας που κωδικοποιεί για την τυροσίνη 126 (p53<sup>ΔY126</sup>). Τα T24-X κύτταρα αλλομοσχεύματος (X: *Xenograft*) μορφολογικά είναι όμοια με τα T24, ενώ οι όποιες διαφορές τους εντοπίζονται σε γονιδιακό και κυτταρογενετικό επίπεδο, γεγονός που αντανακλά τόσο την λειτουργική όσο και την φαρμακο-γονιδιωματική διαφοροποίησή τους. Τα TCCSUP, τέλος, αποτελούν τα πλέον κακοήθη κύτταρα εκ των προ-αναφερθέντων με ιδιαίτερα υψηλό μιτωτικό ρυθμό. Συνιστούν αδιαφοροποίητα κύτταρα, με μορφή που προσεγγίζει το σχήμα των T24, ενώ συγχρόνως εμφανίζονται λίγο μεγαλύτερα και ελαφρώς πιο πεπλατυσμένα. Πολλαπλασιάζονται σχετικά γρήγορα, ενώ και αυτά προσδιορίζονται από μία μεταλλαγμένου τύπου (*mt: mutant*) πρωτεΐνη p53.

### **2.1.2 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης *in vitro***

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες, μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (*incubator-chamber*), όπου επιτυγχάνεται σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) και σχετική υγρασία υψηλότερη από 95% (**Εικόνα 2.2**). Η εύρυθμη ανάπτυξη όλων

των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) σε τελική συγκέντρωση 1X, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS: *Fetal Bovine Serum*), 2 mM L-γλουταμίνη (*L-glutamine*), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (*Sodium pyruvate*), 50 mM όξινο δισάνθρακικό νάτριο (*Sodium bicarbonate*), 1X διαλύματος μη-απαραίτητων αμινοξέων (*Non-essential amino acids*) και ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης (*Penicillin*) (100 U/ml)/στρεπτομυκίνης (*Streptomycin*) (100 µg/ml) για την αποφυγή ενδεχόμενων βακτηριακών μολύνσεων. Το αναλυτικό πρωτόκολλο για την παρασκευή ενός τέτοιου θρεπτικού υλικού παρατίθεται ως ακολούθως:

Διάλυμα DMEM 10X	50 ml
Διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS)	50 ml
Διάλυμα άλατος όξινου δισάνθρακικού νατρίου	28,65 ml
Διάλυμα L-γλουταμίνης	10 ml
Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης	5 ml
Διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων	5 ml
Διάλυμα άλατος πυροσταφυλικού νατρίου	5 ml
Αποστειρωμένο νερό (H <sub>2</sub> O)	346,35 ml
Τελικός όγκος	500 ml

Το νερό που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του υλικού καλλιέργειας είναι συγκεκριμένης ωσμωμοριακότητας (18,2 ΜΩ/cm), ενώ η αποστείρωσή του πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 120°C για 30 λεπτά. Το διάλυμα ορού εμβρύου βοός (FBS), πριν χρησιμοποιηθεί, απενεργοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 55°C για 30 λεπτά. Όλα τα υλικά που απαιτούνται για την παρασκευή του ως άνω θρεπτικού μέσου καλλιέργειας προμηθεύονται από την εταιρεία Biochrom AG (Berlin, Germany), ενώ το DMEM χωρίς γλυκόζη (*DMEM no glucose*) από την Invitrogen (Berlin, Germany).

Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, καθώς και οι χειρισμοί των κυττάρων διενεργούνται κάτω από πλήρως αποστειρωμένες συνθήκες που εξασφαλίζονται μέσα στους ειδικούς θαλάμους νηματικής ροής (*laminar flow*) τάξης II, οι οποίοι περιέχουν ειδικά φίλτρα απολύμανσης και βιολογικής διήθησης σωματιδίων του αέρα, ευρέως

γνωστά ως φίλτρα HEPA (**Εικόνα 2.2**). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται όπως περιγράφεται από τους Hayflick και Moorhead (1961) [416] και για την επίτευξή της είναι απαραίτητη η ελεγχόμενη θρυψινοποίηση μέσω χρήσης διαλύματος 0,25% θρυψίνης/0,02% EDTA (Biochrom AG, Berlin, Germany), όπου καταστρέφονται παροδικά τα μόρια προσκόλλησης της επιφάνειας των κυττάρων με το στερεό υπόστρωμα του δοχείου στο οποίο αναπτύσσονται, αλλά και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο να εναιωρηθούν στο διάλυμα και να διαμοιραστούν σε περισσότερα του ενός θυγατρικά δοχεία φύλαξης και κυτταρικής αύξησης. Κατόπιν, τα κύτταρα του εναιωρήματος καταμετρώνται με ειδικό αιμοκυτταρόμετρο, έτσι ώστε να μεταφέρεται στα θυγατρικά δοχεία ανακαλλιέργειας συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων στη συγκέντρωση που απαιτείται κάθε φορά. Ανάλογα με την κυτταρική σειρά και το μιτωτικό δυναμικό αυτής, η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (είθισται, κάθε δύο ημέρες). Τα «δοχεία» ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως φλάσκες (φέρουσες ειδικά φίλτρα στο πάμα) ή τρυβλία petri, όταν αυτό απαιτείται, από ειδικό υλικό (πολυστυρένιο), το οποίο βοηθάει στην προσκόλληση των κυττάρων σε αυτά.



**Εικόνα 2.2** Ανάστροφο μικροσκόπιο στο οποίο πραγματοποιείται η παρατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργειες *in vitro* (A), θάλαμος νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας τάξης II (B) και επωαστικός κλίβανος CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση των κυττάρων *in vitro* (Γ) [A: [www.analis.be](http://www.analis.be), B: [www.hiwtc.com](http://www.hiwtc.com) και Γ: [www.ex-lab.com](http://www.ex-lab.com)].

### 2.1.3 Φύλαξη, κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων καρκίνου ουροδόχου κύστης

Η φύλαξη των καρκινικών σειρών πραγματοποιείται με κατάψυξη των κυττάρων σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια (αμπούλες) (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Denmark) και ακόλουθη μεταφορά τους σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο (*liquid nitrogen*). Η διαδικασία κατάψυξης γίνεται σταδιακά και περιγράφεται ως ακολούθως:

- Πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, η οποία έχει αποκτήσει την απαιτούμενη πυκνότητα κυττάρων (~80%).
  - Εν συνεχεία, προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης και ακολουθεί επώαση για λίγα λεπτά (ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο) στον κλίβανο CO<sub>2</sub> με τους 37°C.
  - Τα κύτταρα αποκολλώνται από το υπόστρωμα και η απενεργοποίηση της θρυψίνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη διπλάσιας, τουλάχιστον, ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 1X, ενώ ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon (15 ml).
  - Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 στροφές/λεπτό (*rpm*), σε θερμοκρασία 4°C για 5 λεπτά (ψυχόμενη φυγόκεντρος, Hermle Labortechnik, Germany).
  - Κατόπιν, αφαιρείται το υπερκείμενο υλικό και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ειδικό θρεπτικό μέσο κατάψυξης (*freezer medium*).
  - Μεταφέρονται σε ειδικό πλαστικό φιαλίδιο (αμπούλα), το οποίο τοποθετείται ακολούθως σε δοχείο (Nalgene Labware, Thermo Fischer Scientific, Denmark) που περιέχει ισοπροπανόλη 100% επιτρέποντας την ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 1°C ανά λεπτό, και μεταφέρεται σε καταψύκτη -80°C.
  - Τέλος, ακολουθεί η τοποθέτηση των φιαλιδίων κρυο-φύλαξης (*cryo-preservation*) στα ειδικά δοχεία αποθήκευσης υγρού αζώτου, όπου η θερμοκρασία αγγίζει τους -196°C, για μακροχρόνια φύλαξη.
- ❖ Η χημική σύσταση του θρεπτικού μέσου κατάψυξης, σε τελικό όγκο 5 ml, είναι η ακόλουθη:



Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM 1X	3,5 ml
Διάλυμα ορού εμβρύου βοός ( <i>FBS</i> )	1,0 ml
Διάλυμα DMSO	0,5 ml
Τελικός όγκος	5 ml

Το DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) συνιστά έναν ισχυρό κρυο-προστατευτικό παράγοντα που βοηθάει την ψύξη των κυττάρων, αποφεύγοντας τη διάτρησή τους από την αλλαγή θερμοκρασίας, αλλά και από τους κρυστάλλους του εκάστοτε υδατικού διαλύτη που θα δημιουργηθούν στο υλικό φύλαξης στις τόσο χαμηλές θερμοκρασίες.

Σε αντιδιαστολή, η διαδικασία της απόψυξης πραγματοποιείται πιο γρήγορα εφαρμόζοντας την ως ακολούθως περιγραφόμενη πορεία:

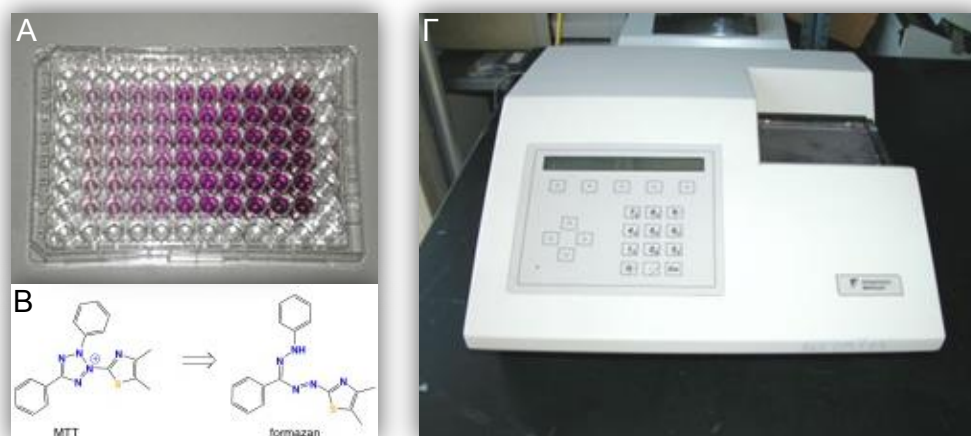
- Η ειδική φιάλη (αμπούλα) μεταφέρεται από το υγρό άζωτο στο υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 37°C και ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση.
- Αφού ολοκληρωθεί η ταχεία απόψυξη και το περιεχόμενο του φιαλιδίου έχει επανέλθει σε υγρή κατάσταση, πραγματοποιείται μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon (15 ml) και προστίθεται ποσότητα φρέσκου DMEM 1X.
- Εν συνεχεία, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 1000 στροφές/λεπτό (*rpm*) για 5 λεπτά, ενώ το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα (ίζημα) επαναιωρούνται σε 5 ml φρέσκου, πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 1X.
- Διεξάγεται εκ νέου φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 1000 στροφές/λεπτό (*rpm*) για 5 λεπτά. Έπειτα, το υπερκείμενο υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα (ίζημα) επαναιωρούνται σε 5 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού (DMEM 1X) και μεταφέρονται σε φλάσκα καλλιέργειας.
- Ακολουθεί τοποθέτησή τους στον επωαστικό θάλαμο κυτταρικής καλλιέργειας και διατήρησή τους σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.

## 2.2 Ποσοτική ανάλυση κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω δοκιμασίας MTT

Με τη δοκιμασία MTT δύναται να προσδιοριστεί η μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση η βιωσιμότητα των κυττάρων σε

μία *in vitro* καλλιέργεια [417]. Το MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] συνιστά μία κίτρινη χρωστική, άλας του τετραζολίου, η οποία μετατρέπεται σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης (*MTT-formazan*) από την σουκινική αφυδρογονάση των μιτοχονδρίων (**Εικόνα 2.3**). Η ένταση του μωβ χρώματος της συγκεκριμένης χημικής ένωσης μετράται με ειδικό φωτόμετρο τύπου ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων είναι ανάλογη του αριθμού των ενεργών μιτοχονδρίων και συνεπώς αποκαλύπτει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται ακολούθως:

- Σε ειδικές και αποστειρωμένες πλάκες 48 μικρο-βοθρίων (πηγαδιών) στρογγυλού επίπεδου πυθμένα (*48-well plates*) μεταφέρονται  $2 \times 10^4 - 4 \times 10^4$  κύτταρα (ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο) σε τελικό όγκο θρεπτικού μέσου 500  $\mu$ l, έτσι ώστε να επιτευχθεί κάλυψη ταπητίου σε ποσοστό ~60%.
- Μετά το πέρας 24 ωρών επώασης στον επωαστικό κλίβανο, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται αντίστοιχος όγκος (500  $\mu$ l) θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει τις συγκεντρώσεις του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα, ενώ ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιούνται μικρο-βοθρία τα οποία περιέχουν σκέτο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς την προσθήκη άλλης ουσίας.
- Έπειτα από 24 (ή περισσότερες) ώρες από τη χορήγηση του φαρμάκου, αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο υλικό και τοποθετούνται 200  $\mu$ l 0,5 mg/ml διαλύματος MTT σε κάθε μικρο-βοθρίο.
- Κατόπιν 4 ωρών επώασης στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%), αφαιρείται το διάλυμα MTT και οι παραγόμενοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται σε 300  $\mu$ l ισοπροπανόλης 100%.
- Ακολουθεί ισχυρή κυκλική ανάδευση της πλάκας για 10 λεπτά, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάλυση της χρωστικής των κρυστάλλων στον οργανικό διαλύτη.
- Ποσότητα 100  $\mu$ l από κάθε δείγμα μεταφέρεται σε νέα επίπεδη πλάκα 96 μικρο-βοθρίων και κατόπιν σε ειδικό φωτόμετρο τύπου ELISA (Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories, Virginia, USA) (**Εικόνα 2.3**) μετράται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 550 nm, με την οπτική απορρόφηση αναφοράς να υπολογίζεται στα 630 nm.



**Εικόνα 2.3** Πλάκα μικρο-βοθρίων 96 θέσεων έπειτα από τη δοκιμασία MTT, κατά την οποία όσο αυξάνεται ο πληθυσμός των κυττάρων που περιέχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια, τόσο πιο έντονο γίνεται το μωβ χρώμα (Α), εξαιτίας της μετατροπής της χρωστικής MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης (*formazan*) (Β). Η ακριβής μέτρηση των αντίστοιχων τιμών πραγματοποιείται σε συσκευή ELISA Reader (Dynatech MR5000) (Γ). [Α: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org), Β: [www.biodiscovery.imb.uq.edu](http://www.biodiscovery.imb.uq.edu) και Γ: [www.dotmed.com](http://www.dotmed.com)].

Η απορρόφηση που μετράται στα μικρο-βοθρία των κυττάρων στα οποία δεν χορηγείται χημειοθεραπευτικός παράγοντας θεωρείται ως το 100% της κυτταρικής επιβίωσης για το εκάστοτε πείραμα.

Κάθε δοκιμασία επιτελείται τρεις διαφορετικές φορές σε τρία τουλάχιστον μικρο-βοθρία σε κάθε πείραμα, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ακεραιότητα, η αξιοπιστία, η στατιστική βαρύτητα και η επαναληψιμότητα της κάθε πειραματικής διαδικασίας.

- ❖ Η χημική σύνθεση του διαλύματος MTT, είναι η εξής:

Θρεπτικό μέσο MEM (χωρίς ερυθρό της φαινόλης) 1X	23,90 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1 M	0,25 ml
Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 mM	0,25 ml
Διάλυμα μη-απαραίτητων αμινοξέων 100X	0,25 ml
Διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου 100 mM	0,25 ml
Διάλυμα όξινου δισανθρακικού νατρίου 7,5% w/v	0,10 ml
Τελικός όγκος	25 ml

Στα 25 ml διαλύματος MTT προστίθενται 12,5 mg MTT σκόνη (Sigma-Aldrich, USA). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και διήθηση μέσω αποστειρωμένου ηθμού με πόρους διαμέτρου 0,22  $\mu\text{m}$ . Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 4°C.

### 2.3 Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η ανάλυση FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) αποτελεί μία εξειδικευμένη αντίδραση κυτταρομετρίας ροής, η οποία στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε φυσιολογική κατάσταση, σε διαδικασία απόπτωσης ή νέκρωσης. Έγινε χρήση της τυποποιημένης συσκευασίας (*kit*) AnnexinV-FITC/7AAD (Beckman Coulter Inc., California, USA), η οποία βασίζεται στην ικανότητα της AnnexinV (Αννεξίνης 5) να προσδένεται στη φωσφατιδυλοσερίνη, ένα φωσφολιπίδιο το οποίο εκτίθεται στην επιφάνεια των κυττάρων που βρίσκονται στα πρώτα στάδια της απόπτωσης. Η 7AAD (*7-Amino-Actinomycin D*) συνιστά μία χρωστική η οποία προσδένεται στο DNA (στα ζεύγη βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης) και επιτρέπει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό κυττάρων που βρίσκονται στο αρχικό στάδιο της απόπτωσης και αυτών που βρίσκονται στην τελευταία φάση της απόπτωσης ή στη νέκρωση [418-420]. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται ως ακολούθως:

- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε ειδικά τρυβλία petri (διαμέτρου 100 mm), σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X τελικού όγκου 8 ml και σε τέτοια συγκέντρωση ώστε τελικά να επιτευχθεί ποσοστό κάλυψης ταπητίου περί τα 60%.
- Την επόμενη ημέρα αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται ίδια ποσότητα θρεπτικού μέσου, το οποίο όμως τώρα περιέχει αντίστοιχες συγκεντρώσεις του κατά περίπτωση φαρμάκου που θα χρησιμοποιηθεί.
- Μετά την παρέλευση 24 ωρών, τα τρυβλία τοποθετούνται σε πάγο και γίνεται μηχανική αποκόλληση των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικών αποξεστήρων (*scrappers*, Sarstedt, Germany).
- Συλλέγεται το υπερκείμενο υλικό με τα αιωρούμενα σε αυτό κύτταρα και ακολουθεί μεταφορά σε σωλήνα τύπου falcon (15 ml).
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.

- Το υπερκείμενο αναρροφάται και προστίθεται 1 ml PBS 1X σε κάθε σωλήνα. Γίνεται καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση εκ νέου στους 4°C, στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.
- Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, τοποθετούνται 100 µl Binding Buffer 1X και τα σωληνάρια διατηρούνται στον πάγο.
- Προστίθενται 20 µl διαλύματος AnnexinV-FITC σε κάθε δείγμα και τα σωληνάρια διατηρούνται στον πάγο και σε συνθήκες σκότους για 20 λεπτά.
- Έπειτα, σε κάθε σωληνάριο εισάγονται 10 µl 7AAD και ακολουθεί προσεκτική ανάδευση.
- Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο και στο σκοτάδι για 15 λεπτά και κατόπιν αναλύονται με κυτταρομετρία ροής με τη βοήθεια του μετρητή Beckman Coulter-Cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc., California, USA) και επεξεργάζονται περαιτέρω με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4 Συσσκευή κυτταρομετρίας ροής τύπου Beckman Coulter-Cytomics FC500 [[beckmancoulter.com](http://beckmancoulter.com)].

## 2.4 Ημι-ποσοτική αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Semi-quantitative RT-PCR*)

### 2.4.1 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικό εκχύλισμα

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

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης επιστρώνονται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (διαμέτρου 60 mm) σε τέτοια συγκέντρωση ώστε να επιτευχθεί ~60% κάλυψη του τρυβλίου και επωάζονται σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.
- Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM 1X το οποίο έχει εμπλουτισθεί με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του εκάστοτε χημειοθεραπευτικού παράγοντα, ενώ ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται τρυβλίο που περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM 1X).
- Μετά το πέρας 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και αφαιρείται το υπερκείμενο, αφού πρώτα έχουν συλλεχθεί τα κύτταρα που αιωρούνται σε αυτό. Σε κάθε τρυβλίο, στο ταπήτιο του οποίου βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα, καθώς και σε αυτά που έχουν απομονωθεί από το υπερκείμενο, προστίθεται συνολικά 1 ml TRI Reagent (MRC Inc., Cincinnati, USA).
- Ακολουθεί προσεκτική ανάδευση και μεταφορά των κυττάρων που είναι διαλυμένα στην τριζόλη σε σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml). Τα δείγματα αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των νουκλεο-πρωτεϊνικών συμπλόκων.
- Εν συνεχεία, προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 200 µl χλωροφόρμιο (Sigma-Aldrich, USA), ακολουθεί έντονη ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 15 λεπτά. Σε αυτό το βήμα είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε τρεις φάσεις: μία οργανική φάση στο κάτω μέρος όπου βρίσκεται το DNA, μία ενδιάμεση στην οποία εντοπίζονται οι πρωτεΐνες και μία ανώτερη υδατική η οποία περιέχει το RNA.
- Συλλέγεται προσεκτικά η άνω φάση και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf.
- Για την κατακρήμνιση και το διαχωρισμό του RNA προστίθενται 500 µl ισοπροπανόλης 100% και τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπεται φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται 1 ml 75% παγωμένης αιθανόλης και ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση. Στο βήμα αυτό, επιτυγχάνεται ξέπλυμα, αφαλάτωση και τελικός καθαρισμός του RNA.
- Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται στους 4°C, στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και αφήνεται να απομακρυνθεί και να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη από το RNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Το RNA διαλυτοποιείται σε ανάλογη ποσότητα διπλά αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (*ddH<sub>2</sub>O*), ενώ τα δείγματα RNA ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (βλέπε 2.4.4) και τελικά φυλάσσονται στους -80°C.

#### 2.4.2 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (*RT: Reverse Transcription*)

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής προστίθενται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου eppendorf (1,5 ml) τα ακόλουθα αντιδραστήρια (ενδιάμεσος τελικός όγκος 12,5 μl):

Ολικό RNA (1 μg)	x μl
Εκκινητής oligo-(dT) (50 mM)	1 μl
Διάλυμα dNTPs (40 mM)	1 μl
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	10,5 - x μl
Τελικός όγκος	12,5 μl

[Ο άγνωστος όγκος x προκύπτει ως εξής: τα δείγματα φωτομετρούνται και έτσι λαμβάνεται η οπτική πυκνότητα (*OD: Optical Density*) του καθενός σε μg/μl. Εφόσον επιθυμείται σε κάθε αντίδραση να εισαχθεί 1 μg RNA, τότε θα ισχύει  $x = 1/OD$ ].

Κατόπιν, το κάθε δείγμα επωάζεται στους 65°C για 5 λεπτά, έτσι ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη του RNA και αμέσως μετά τα σωληνάρια τοποθετούνται στον πάγο. Στο κάθε σωληνάριο, με τον ήδη υπάρχοντα ενδιάμεσο όγκο προστίθενται τα

ακόλουθα αντιδραστήρια (Kit αντίστροφης μεταγραφής, Invitrogen, Berlin, Germany), έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να ανέλθει στα 20  $\mu\text{l}$  (12,5  $\mu\text{l}$  + 7,5  $\mu\text{l}$  = 20  $\mu\text{l}$ ):

Διάλυμα “First Strand Buffer” 5X	4,0 $\mu\text{l}$
Διάλυμα DTT (0,1 M)	2,0 $\mu\text{l}$
Διάλυμα αναστολέα της RNάσης (RNase Out, 40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Αντίστροφη Μεταγραφήση (MMLV-RT) (150 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
Τελικός όγκος	7,5 $\mu\text{l}$

Στη συνέχεια, μετά από ήπια ανάδευση το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 50 λεπτά όπου πραγματοποιείται ο πολυμερισμός και έπειτα σε θερμοκρασία 70°C για 15 λεπτά, όπου το ένζυμο απενεργοποιείται. Τα δείγματα αραιώνονται 1:5 (δηλαδή προστίθενται στο καθένα 80  $\mu\text{l}$  υπερκάθαρου νερού) και τελικά φυλάσσονται στους -20°C.

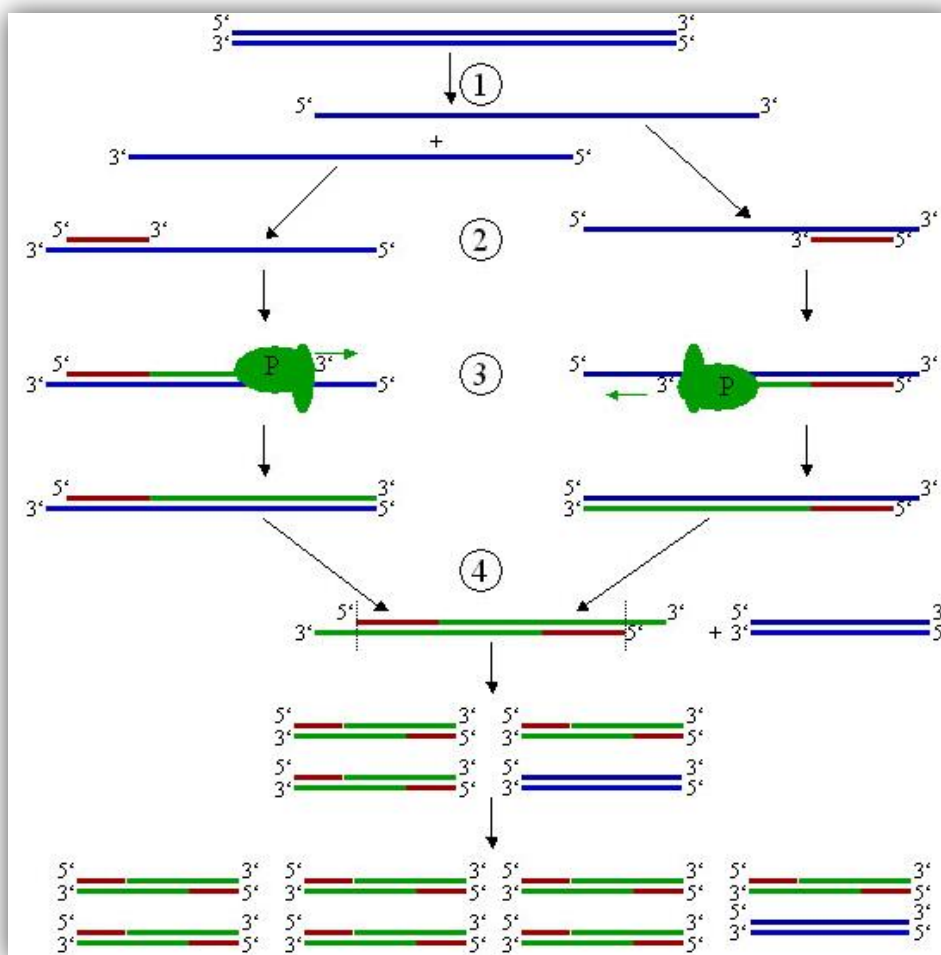
#### 2.4.3 Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR: Polymerase Chain Reaction*)

Η αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης συνιστά μία πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων [421]. Η μέθοδος βασίζεται στην επανάληψη μίας διαδικασίας τριών βημάτων (**Εικόνα 2.5**):

1. Θερμική αποδιάταξη του DNA (*denaturation*). Το DNA ή cDNA που απομονώθηκε θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία στους 94 – 96°C. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εξασθενήσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων αδερίνης–θυμίνης και γουανίνης–κυτοσίνης στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Έτσι, το δίκλωνο DNA μεταπίπτει στην μονόκλωνη και αποδιαταγμένη κατάσταση. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί το μονόκλωνο DNA θα χρησιμοποιηθεί ως καλούπι (μήτρα) από την DNA πολυμεράση για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με κατεύθυνση 5'  $\rightarrow$  3'.



2. Επαναδιάταξη-Υβριδοποίηση ολιγο-εκκινητών (*primer annealing*). Στο αποδιαταγμένο DNA προστίθενται δύο συνθετικά ολιγο-νουκλεοτίδια (ολιγο-εκκινητές) μήκους 15-35 bp και η θερμοκρασία ελαττώνεται στην μέση τιμή  $T_m$  (*Temperature melting*, θερμοκρασία τήξης) που απαιτείται για την υβριδοποίηση των ολιγο-εκκινητών. Συνήθως, η υβριδοποίηση επιτυγχάνεται μεταξύ 50°C και 63°C. Οι ολιγο-εκκινητές [πρόσθιος (*F*) και ανάστροφος (*R*)] είναι αντιστοίχως συμπληρωματικοί με τις αμφοτερόπλευρες περιοχές των 3' άκρων των τμημάτων DNA που επιθυμείται να πολλαπλασιαστεί. Τα υβριδοποιημένα ολιγο-νουκλεοτίδια χρησιμεύουν ως πρωταρχικά τμήματα παρέχοντας το 3' άκρο που απαιτείται για την προσθήκη των συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση.



**Εικόνα 2.5** Η αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR*) και τα «βήματα» που απαιτούνται για την πραγματοποίησή της, σχηματικά. (1) Αποδιάταξη στους 94 – 96°C. (2) Επαναδιάταξη στους 50 – 63°C. (3) Επιμήκυνση στους 72°C. (4) Ο πρώτος κύκλος έχει ολοκληρωθεί. Οι δύο νέοι κλώνοι αποτελούν το υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο, διπλασιάζοντας έτσι κάθε φορά την ποσότητα του DNA. (P: *Polymerase*, Πολυμεράση) [[www.serc.carleton.edu](http://www.serc.carleton.edu)].

3. Επιμήκυνση των ολιγο-εκκινητών (*primer extension*). Μετά την υβριδοποίηση, το διάλυμα της αντίδρασης εφοδιάζεται με περίσσεια δεοξυ-νουκλεοτιδίων (*dNTPs*) και με μία θερμο-ανθεκτική DNA πολυμεράση. Το ένζυμο που καταλύει την συγκεκριμένη αντίδραση απομονώθηκε για πρώτη φορά από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Δύναται να επιμηκύνει τους ολιγο-εκκινητές, καταλύοντας τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα στο 3' ελεύθερο "OH-" του ολιγο-εκκινητή και τον διαθέσιμο "α" φωσφόρο του εκάστοτε dNTP. Το ένζυμο αυτό, που ονομάστηκε Taq πολυμεράση, έχει μία υψηλή άριστη θερμοκρασία δράσης  $T_{opt}$  (*T optimum*). Έτσι, το στάδιο της επιμήκυνσης των ολιγο-εκκινητών πραγματοποιείται συνήθως στους 72°C, όπου η ταχύτητα πολυμερισμού υπερβαίνει τα 60 νουκλεοτίδια/δευτερόλεπτο.

Οι συγκεντρώσεις των υλικών και αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσ(ιδ)ωτές αντιδράσεις πολυμεράσης της συγκεκριμένης Διατριβής παρουσιάζονται ως ακολούθως (**Πίνακας 2.2**), ενώ το σύνολο των αντιδράσεων έλαβε χώρα σε ειδικά σωληνάρια τύπου eppendorf (0,2 ml) στον θερμικό κυκλοποιητή Biometra T3000 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) (**Εικόνα 2.6**).

**Πίνακας 2.2** Τυπικό πρωτόκολλο αντίδρασης PCR που ακολουθήθηκε στην παρούσα ερευνητική Διδακτορική Διατριβή.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
GoTaq Green Master Mix 2X	12,5 μl	1X
Πρόσθιος ( <i>Forward</i> ) ολιγο-εκκινητής, 10 pmole	1 μl	0,4 pmole
Ανάστροφος ( <i>Reverse</i> ) ολιγο-εκκινητής, 10 pmole	1 μl	0,4 pmole
DNA/cDNA	1 μl	10 – 100 ng
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	9,5 μl	-
Τελικός όγκος	25 μl	-

Οι ολιγο-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρεία Operon (California, USA), ενώ για τον πολυμερισμό χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) GoTaq Green Master Mix από την εταιρεία Promega (Madison, USA).



**Εικόνα 2.6** Ο θερμικός κυκλοποιητής (*thermocycler*) Biometra T3000 [[labfish.de](http://labfish.de)].

Ένα αντιπροσωπευτικό πρωτόκολλο για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων κωδικοποιών γενετικών τόπων από cDNA (*c: copy/complementary*) ή gDNA (*g: genomic*) καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, καθώς και οι επιμέρους θερμοκρασίες και το χρονικό διάστημα εφαρμογής της κάθε θερμοκρασίας, παρατίθενται στον **Πίνακα 2.3**.

**Πίνακας 2.3** Τυπικό θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στις αντιδράσεις PCR (*Ta*: θερμοκρασία επαναδιάταξης, *Tm*: θερμοκρασία τήξης).

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο	
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 5 λεπτά
Θερμική αποδιάταξη cDNA ή gDNA ( <i>denaturation</i> )	95°C για 30 δευτερόλεπτα
Επαναδιάταξη ολιγο-εκκινητών ( <i>annealing</i> )	Ta (Tm-5)°C για 30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση ολιγο-εκκινητών ( <i>extension</i> )	72°C για 30 δευτερόλεπτα
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10 λεπτά

} Αριθμός κύκλων  
28-40

#### 2.4.4 Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA και προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των ριβοσωμικών υπομονάδων του RNA και των διαφορετικού μήκους τμημάτων DNA πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η πυκνότητα του πηκτώματος που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με το μέγεθος των τμημάτων του νουκλεϊκού οξέος που αναμένεται να διαχωριστεί. Η συγκέντρωση του πηκτώματος για την ηλεκτροφόρηση του RNA είναι 1%, ενώ για τα παραγόμενα προϊόντα της PCR αντίδρασης κυμαίνεται από 2 – 3,5%. Σε γενικές γραμμές, ισχύει πως όσο μικρότερα σε μέγεθος είναι τα προς διαχωρισμό τμήματα, τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης απαιτείται στο πήκτωμα. Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή ενός πηκτώματος αγαρόζης και την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, έχει ως ακολούθως:

- Ζυγίζονται αντιστοίχως 1 / 2–3,5 gr αγαρόζης (Invitrogen, Berlin, Germany) και προστίθενται σε 100 ml διαλύματος TBE 0,5X.
- Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων, όπου και ακολουθεί η θέρμανσή του για περίπου 3 λεπτά, έως ότου ομοιογενοποιηθεί πλήρως.
- Εν συνεχεία, μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί η σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας του διαλύματος, αποφεύγοντας επιμελώς την επαναφορά σε χαμηλή θερμοκρασία και την διαδοχική πήξη του.
- Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (*EtBr*), τελικής συγκέντρωσης 10 µg/ml και έντονη ανάδευση [το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται (*intercalate*) μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων και να επιτρέπει την ανίχνευση μορίων DNA και RNA μετά από ενεργοποίηση με υπεριώδη ακτινοβολία].
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (Consort, USA), όπου εφαρμόζονται ειδικά κτενάκια (*combs*), τα οποία εξυπηρετούν στη δημιουργία διαδρομών-«πηγαδιών» στο πήκτωμα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1-2 ώρες, έως ότου δημιουργηθεί «ομοιόμορφο» δίκτυο αγαρόζης.
- Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την πλήρη κάλυψη του πηκτώματος, αφαιρούνται τα ειδικά κτενάκια και ακολουθεί φόρτωση 10 µl δείγματος στα «πηγάδια» του πηκτώματος (στην περίπτωση του RNA

δημιουργείται και φορτώνεται ένα μείγμα αποτελούμενο από 2 μl RNA, 2 μl χρωστικής και 6 μl υπερκάθαρου νερού).

- Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με εφαρμογή αντίστοιχης τάσης πεδίου 80/100 Volt για DNA/RNA, με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα να μεταναστεύουν προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης υπό την επίδραση τάσης του εν λόγω ηλεκτρικού πεδίου.
  - Το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή απεικόνισης με λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας (Vilber Lourmat, France), όπου πραγματοποιείται ανίχνευση των ζωνών που διαχωρίστηκαν και φωτογράφιση με τη βοήθεια ενσωματωμένης ψηφιακής φωτογραφικής κάμερας.
- ❖ Η σύσταση του διαλύματος TBE 10X περιγράφεται ως ακολούθως:

Tris-Base	108 gr
Βορικό οξύ	55 gr
Διάλυμα EDTA (0,5 M) (pH=8)	40 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	~950 ml
Τελικός όγκος	1000 ml

Το διάλυμα διηθείται με ηθμό Whatman (Kent, UK) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους.

Η απουσία «μοριακού νεφελώματος» (*smear*) από το πήκτωμα αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση του ολικού RNA υποδηλώνει ότι το απομονωμένο RNA εκχύλισμα είναι υψηλής ποιότητας και μεγάλης αξιοπιστίας για περαιτέρω επεξεργασία. Όσον αφορά στην αξιολόγηση των προϊόντων της PCR, η ποσοτική και ποιοτική διαφοροποίηση των επιμέρους ζωνών σε απόκριση της δράσης του εκάστοτε φαρμακευτικού παράγοντα αποδίδει επακριβώς τις μεταβολές μεταγραφικής έκφρασης και ενεργοποίησης των υπό μελέτη γονιδιακών τόπων.

## 2.5 Συλλογή, ανίχνευση και μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών

### 2.5.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα

- Σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (διαμέτρου 100 mm) επιστρώνονται καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης σε τέτοια συγκέντρωση ώστε να επιτευχθεί κάλυψη του τρυβλίου ~60% και αναπτύσσονται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο CO<sub>2</sub>.
- Την επόμενη ημέρα αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται υλικό καλλιέργειας DMEM 1X στο οποίο έχουν προστεθεί οι κατάλληλες επιλεγμένες συγκεντρώσεις του εκάστοτε φαρμακευτικού σκευάσματος, ενώ ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται τρυβλίο που περιέχει μόνο θρεπτικό μέσο DMEM 1X.
- 24 ώρες μετά τα τρυβλία τοποθετούνται στον πάγο και ακολουθεί μηχανική απόξεση των κυττάρων από το ταπήτιο των τρυβλίων.
- Κατόπιν τούτου, τα κύτταρα καθώς και όλο το αιωρούμενο υλικό συλλέγονται και τοποθετούνται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon (15 ml).
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στους 4°C, στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.
- Σε κάθε σωλήνα αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml TBS 1X. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και μεταφορά των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml).
- Έπεται φυγοκέντρωση στους 4°C, στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η διαδικασία του ξεπλύματος με TBS 1X επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.
- Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 600 μl sample buffer, το οποίο πρώτα έχει προ-θερμανθεί στους 100°C για 5 λεπτά.
- Τα δείγματα αναδεύονται προσεκτικά και θερμαίνονται στους 100°C για 2 λεπτά.
- Ακολουθεί περαιτέρω διάρρηξη των κυττάρων και εκχύλιση των πρωτεϊνών με «ηχοβολισμό» (*sonication*) σε κατάλληλη συσκευή παραγωγής υπερήχων.

Κάθε δείγμα «ηχοβολείται» για χρονικό διάστημα 10 δευτερολέπτων 3 διαδοχικές φορές.

- Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά, στις 12500 στροφές/λεπτό (*rpm*), σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κάθε υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση ξανά για 15 λεπτά, στις 12500 στροφές/λεπτό (*rpm*), σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf.
- Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά, διαχωρίζεται σε επιμέρους ποσότητες (*aliquots*) και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  έως  $-40^{\circ}\text{C}$ .

❖ Το διάλυμα TBS 10X παρασκευάζεται ως εξής:

Tris-Base (20 mM)	12,1 gr
Χλωριούχο νάτριο ( <i>NaCl</i> , 137 mM)	40,0 gr
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	~470 ml
Τελικός όγκος	500 ml

Το pH ρυθμίζεται στο 7,6 με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Κατόπιν, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τα 500 ml (ογκομετράται), αναδεύεται επαρκώς, διηθείται με ηθμό Whatman και αποστειρώνεται.

❖ Η χημική σύσταση και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών του διαλύματος sample buffer παρατίθενται κάτωθι:

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH=6,8)	0,625 ml
Διάλυμα γλυκερόλης (100%)	0,500 ml
Διάλυμα SDS (20%)	1,500 ml
Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης	0,250 ml
Διάλυμα αναστολέα πρωτεασών ( <i>PMSF</i> )	0,050 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	1,500 ml

Σκόνη κυανού της βρωμοφαινόλης	2 – 3 κόκκοι
Τελικός όγκος	5 ml

### 2.5.2 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων μέσω της μεθόδου Bradford είναι η εξής:

- Σε ειδικά σωληνάρια τύπου erpendorf προστίθενται 5 μl του εκάστοτε πρωτεϊνικού δείγματος, 795 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό (*ddH<sub>2</sub>O*) και 200 μl χρωστικής Bradford, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 1000 μl.
- Ακολουθεί ήπια ανακίνηση και τα δείγματα αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C.
- Έπειτα, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε ειδικό φασματοφωτόμετρο (SmartSpec™ 3000, BioRad, California, USA) σε μήκος κύματος 595 nm.
- Η τιμή του κάθε δείγματος υπολογίζεται με βάση μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία συσχετίζει την απορρόφηση με τα “μg” πρωτεΐνης και από την τιμή αυτή αφαιρείται η αντίστοιχη τιμή του «τυφλού» (δείγμα αναφοράς, το οποίο περιέχει 800 μl *ddH<sub>2</sub>O* και 200 μl Bradford).
- Έτσι, με βάση την απορρόφηση του κάθε πρωτεϊνικού δείγματος από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς προκύπτουν τα “μg” της πρωτεΐνης.

### 2.5.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης

Σε πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης (*SDS-PAGE*) αναλύεται το σύνολο των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ακρυλαμίδη πολυμερίζεται και σχηματίζει ένα δίκτυο με πόρους δια μέσου των οποίων διέρχονται οι προς διαχωρισμό πρωτεΐνες. Ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς ανίχνευση πρωτεϊνών, το σχετικό μέγεθος των πόρων μπορεί να μεταβάλλεται ως αποτέλεσμα της εκάστοτε συγκέντρωσης της αναλογίας



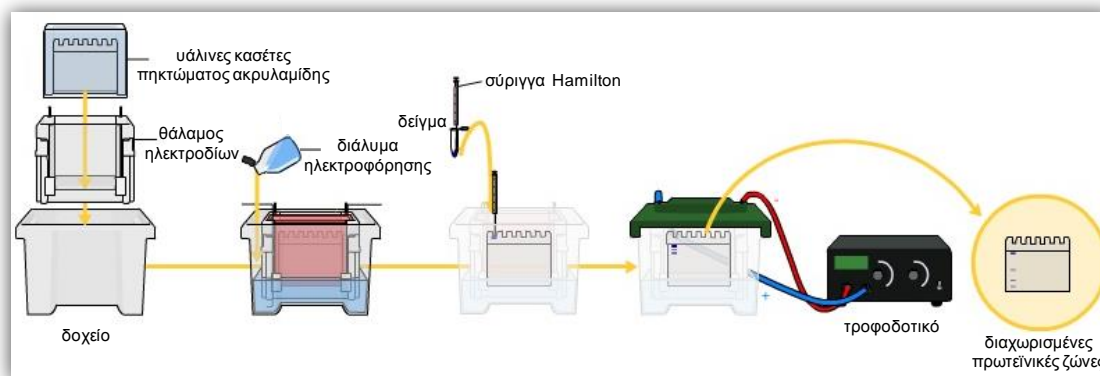
ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης. Τα πηκτώματα πολυ-ακρυλαμίδης αποτελούνται από δύο επιμέρους τμήματα: το πήκτωμα συμπίκνωσης (*stacking gel*) και το πήκτωμα διαχωρισμού (*separating gel*). Η ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα συμπίκνωσης διασφαλίζει την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδο («πακετάρισμα») των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα διαχωρισμού, στο οποίο και πραγματοποιείται η διάκριση και διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους μέγεθος και βάρος. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού μεγέθους δύναται να καλύψουν μεγαλύτερη απόσταση εντός του πηκτώματος σε δεδομένο χρονικό διάστημα, καθώς κινούνται ταχύτερα ανάμεσα από τους πόρους του δικτύου της πολυ-ακρυλαμίδης. Οι επιμέρους συγκεντρώσεις και όγκοι των χημικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή του πηκτώματος συμπίκνωσης και διαχωρισμού παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.4**.

**Πίνακας 2.4** Χημική σύσταση και καταγραφή αντιδραστηρίων επιμέρους πηκτωμάτων πολυ-ακρυλαμίδης.

	Πήκτωμα συμπύκνωσης 5%	Πήκτωμα διαχωρισμού 10%	Πήκτωμα διαχωρισμού 12%	Πήκτωμα διαχωρισμού 15%
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl	2,5 ml (pH=6,8)	5 ml (pH=8,9)	5 ml (pH=8,9)	5 ml (pH=8,9)
Διάλυμα ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης (30:1)	3,4 ml	6,65 ml	7,98 ml	9,97 ml
Διάλυμα SDS (10%)	0,1 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Διάλυμα APS ( <i>ammonium persulfate</i> ) (10%)	0,4 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
Διάλυμα TEMED	0,04 ml	0,016 ml	0,016 ml	0,016 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	13,56 ml	7,78 ml	6,45 ml	4,45 ml
Τελικός όγκος	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml

Η ακριβής διαδικασία ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυ-ακρυλαμίδης είναι η ακόλουθη (**Εικόνα 2.7**):

- Σε ειδικά υάλινα πλακίδια της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Mini Protean II, BioRad Laboratories, USA) εγχύεται αρχικά το διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (10, 12 ή 15 %) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 περίπου ώρες, έτσι ώστε να στερεοποιηθεί το πήκτωμα και να πολυμεριστεί πλήρως, με ορθό και ομοιόμορφο τρόπο η ακρυλαμίδα.
- Έπειτα, το διάλυμα πηκτώματος συμπύκνωσης (5%) μεταφέρεται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, ενώ τοποθετούνται αμέσως και τα ειδικά πλαστικά κτένια, τα οποία θα σχηματίσουν τα «πηγαδάκια»/βοθρία-διαδρομές όπου θα προστεθούν στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά δείγματα. Το σύστημα αφήνεται για άλλες 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να στερεοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα συμπύκνωσης.
- Κατόπιν, το σύστημα με τα υάλινα πλακίδια και τα πηκτώματα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή όπου θα πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση. Προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*Running Buffer 1X*) και με προσοχή αφαιρούνται τα κτένια. Τα πρωτεϊνικά δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 100°C, για 5 λεπτά.
- Εν συνεχεία, από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα «φορτώνεται» ποσότητα όχι μεγαλύτερη από 50 μg συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης (η οποία έχει υπολογιστεί μέσω της διαδικασίας Bradford, βλέπε 2.5.2) σε κάθε πηγάδι/βοθρίο, καθώς και διάλυμα δείκτη πρότυπων πρωτεϊνικών μοριακών βαρών (molecular weight protein marker, Biochrom, Germany).
- Η συσκευή καλύπτεται πλήρως από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζεται τάση 60 Volt για περίπου 2 ώρες.



**Εικόνα 2.7** Διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης (*SDS-PAGE*) [[en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)].

- ❖ Η χημική σύσταση του αρχικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (*Running Buffer 10X*) με τις επιμέρους ποσότητες συστατικών που προστίθενται παρουσιάζονται ως ακολούθως:

Tris-Base	15,1 gr
Γλυκίνη	93,0 gr
Διάλυμα SDS (20%)	25 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	~465 ml
Τελικός όγκος	500 ml

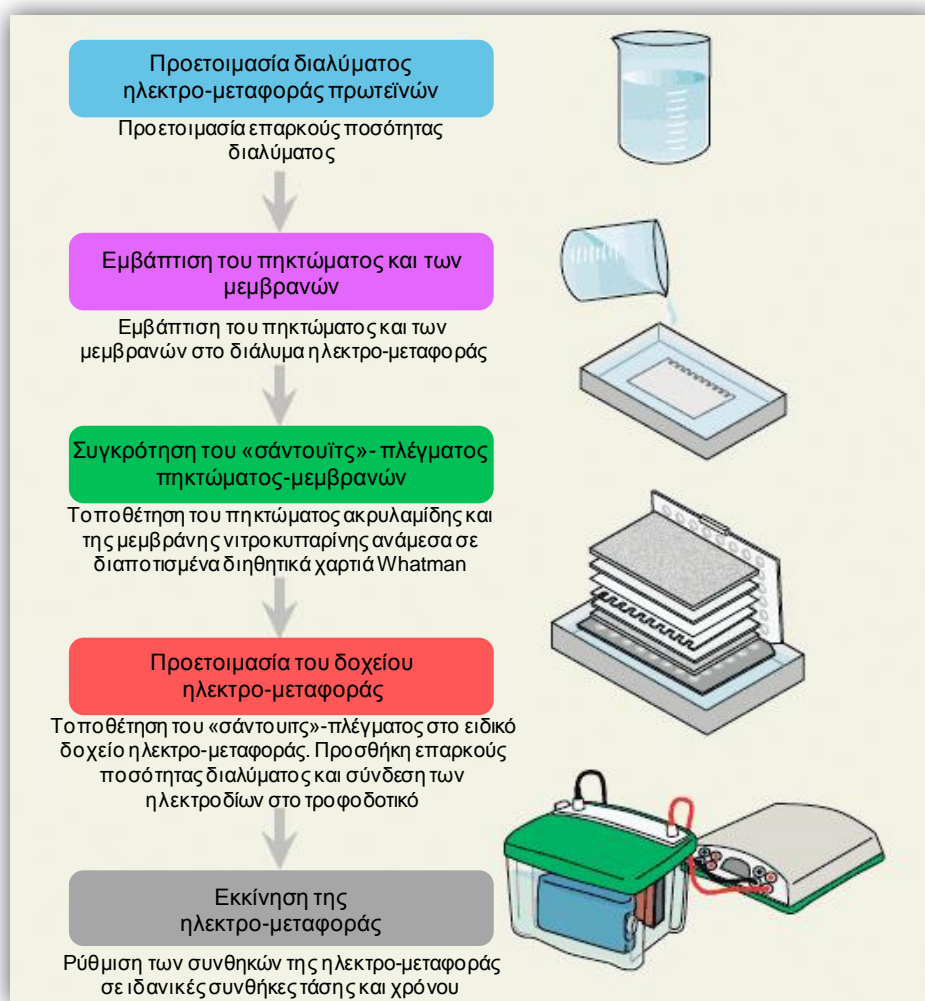
Εφόσον το διάλυμα συμπληρωθεί έως τα 500 ml με υπερκάθαρο νερό (*ddH<sub>2</sub>O*), ακολουθεί ισχυρή ανάδευση μέχρι την πλήρη ομοιογενοποίησή του και τελική διήθησή του με ηθμό Whatman.

#### 2.5.4 Στύπωμα Western (*Western blot*)

Αφού οι πρωτεΐνες έχουν ηλεκτροφορηθεί για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα στο πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης, ακολουθεί η ηλεκτρο-μεταφορά τους σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran, Whatman, Kent, UK). Η διαδικασία που πραγματοποιείται αναλύεται παρακάτω (**Εικόνα 2.8**):

- Σε ειδικό πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών τοποθετείται σπόγγος και 2 χαρτιά τύπου Whatman, τα οποία προηγουμένως έχουν εμποτισθεί σε διάλυμα ηλεκτρο-μεταφοράς πρωτεϊνών (*Transfer Buffer 1X*).
- Στη συνέχεια, το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται επάνω στο χαρτί τύπου Whatman και ακολούθως η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αφού έχει διαβρεχθεί πρώτα για 2-3 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς, αποτίθεται πάνω στο πήκτωμα με προσοχή για να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.
- Έπειτα, 2 ακόμη χαρτιά τύπου Whatman εμβαπτίζονται στο διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών και μεταφέρονται εκ νέου επάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

- Έπεται και ο δεύτερος εμποτισμένος σπόγγος στο πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών, επάνω από τα 2 χαρτιά και τελικά η συσκευή κλείνεται με προσοχή.
- Η συσκευή μεταφέρεται στο δοχείο ηλεκτρο-μεταφοράς, συμπληρώνεται ποσότητα του ειδικού διαλύματος, ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το πλέγμα μεταφοράς πρωτεϊνών, και τέλος, εφαρμόζεται τάση 30 Volt για περίπου 15 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου.



**Εικόνα 2.8** Διαδικασία στύψματος Western (*Western blot*) [[bio-rad.com](http://bio-rad.com)].

- ❖ Η χημική σύνθεση του διαλύματος ηλεκτρο-μεταφοράς (*Transfer Buffer 1X*) είναι η εξής:

Tris-Base	3 gr
Γλυκίνη	15 gr
Μεθανόλη (100%)	200 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	800 ml
Τελικός όγκος	1000 ml

### 2.5.5 Επώσεις με αντισώματα

Στη συνέχεια, οι αντιγονικοί επίτοποι των υπό μελέτη πρωτεϊνών επεξεργάζονται καταλλήλως για να αλληλεπιδράσουν ειδικά με κατάλληλο(α) αντίσωμα(τα), σύμφωνα με τη διαδικασία που παρατίθεται ως ακολούθως:

- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρείται προσεκτικά από το πλέγμα ηλεκτρομεταφοράς και τοποθετείται σε νέο πλαστικό δοχείο, όπου ακολουθεί προσθήκη ειδικού διαλύματος έκπλυσης [TBS-T 1X (διάλυμα TBS 1X το οποίο περιέχει 0,1% απορρυπαντικό Tween-20)], σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, υπό συνθήκες συνεχούς ανάδευσης.
- Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα έκπλυσης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε ειδικό διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισώματος (*Blocking Solution*) 5% w/v NFM [5 gr σκόνη γάλακτος μηδενικής περιεκτικότητας σε λιπαρά (*non-fat milk*) διαλυμένη σε 100 ml TBS-T 1X].
- Έπειτα, το διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων απομακρύνεται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εσωκλείεται σε ειδική αποστειρωμένη σακούλα, μέσα στην οποία εισάγεται το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος (*primary antibody*) στην εκάστοτε ιδανική αραιώση [συνήθως 1:1000 (v/v)]. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 5% w/v NFM σε TBS-T 1X ή από 5% w/v BSA (grade V) (αλβουμίνη από ορό μόσχου διαλυμένη σε TBS-T 1X), ανάλογα με τον τύπο και τις ιδιαιτερότητες του εκάστοτε αντισώματος που χρησιμοποιείται. Η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση, ενώ η επώαση συνεχίζεται σε θερμοκρασία 4°C για ~16 ακόμα ώρες.

- Την επόμενη ημέρα, η μεμβράνη μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται για 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.
- Κατόπιν, το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος αφαιρείται και ακολουθούν 6 πλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μία με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης (TBS-T 1X).
- Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται για 30 λεπτά στο διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων (5% w/v NFM), σε θερμοκρασία δωματίου αναδεδόμενη συνεχώς (το στάδιο αυτό μπορεί να παραλείπεται κατά περίπτωση).
- Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό αποστειρωμένο σακουλάκι και εισάγεται κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ειδικούς αντιγονικούς επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος, σε αραιώση συνήθως 1:2000 (v/v) σε διάλυμα TBS-T 1X το οποίο περιέχει 5% (w/v) σκόνη γάλακτος μηδενικής περιεκτικότητας σε λιπαρά (NFM). Η επώαση διαρκεί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα, που κατά περίπτωση μπορεί να είναι anti-rabbit, anti-mouse ή anti-goat (δηλαδή να έχει ειδικότητα δέσμησης έναντι του πρωτογενούς αντισώματος που παρήχθη σε κουνέλι, ποντίκι ή κατσίκια, αντίστοιχα) είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (*HRP: horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich, Germany).
- Το διάλυμα που περιέχει το δευτερογενές αντίσωμα αφαιρείται, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε καθαρό πλαστικό δοχείο και ακολουθούν 6 ξεπλύματα διάρκειας 10 λεπτών το καθένα με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης (TBS-T 1X).
- Έπειτα, γίνεται προσθήκη διαλύματος λουμινόλης (ECL, GE Healthcare Life Sciences, USA) επί της μεμβράνης και το ένζυμο της υπεροξειδάσης, το οποίο βρίσκεται προσδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, η οποία μεταπίπτει στη βασική της μορφή με παράλληλη εκπομπή φωτός (φωτονίων).
- Τέλος, οι μεμβράνες μεταφέρονται σε ειδική συσκευή ανίχνευσης της χημειοφωταύγειας (LAS 4000 Imager, Fujifilm Life Science, USA), όπου εντοπίζονται, εκπέμποντας φως, οι περιοχές που αντιστοιχούν στις προς ανίχνευση και αντιγονικό χαρακτηρισμό πρωτεΐνες. Με τη βοήθεια ψυχόμενης (-30°C) φωτογραφικής κάμερας CCD, που είναι συνδεδεμένη με

τη συσκευή, λαμβάνονται φωτογραφίες των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης, οι οποίες επεξεργάζονται περαιτέρω με τη χρήση του εξειδικευμένου λογισμικού AIDA Image Analyzer v.4.22.

## 2.6 Παροδική διαμόλυνση ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου ουροδόχου κύστης

Κατά την παροδική διαμόλυνση (*transient transfection*) τα πλασμίδια (*plasmids*) εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου χωρίς μόνιμη ενσωμάτωση στο γονιδίωμα. Η διαδικασία που λαμβάνει χώρα έχει ως εξής:

- Σε αποστειρωμένα τρυβλία (διαμέτρου 35 mm) επιστρώνονται κύτταρα καρκίνου ουροδόχου κύστης (T24) σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X τελικού όγκου 2 ml χωρίς αντιβιοτικά, σε συγκέντρωση τέτοια ώστε να επιτευχθεί κάλυψη του ταπητίου σε ποσοστό ~80-90% και ακολουθεί επώαση σε κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.
- Την ερχόμενη ημέρα, σε δύο σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml) για κάθε δείγμα και πειραματική συνθήκη προστίθενται 250 µl Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Berlin, Germany). Στο πρώτο σωληνάριο εισάγονται 10 µl Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 (Invitrogen, Berlin, Germany), ενώ στο δεύτερο προστίθενται 4 µg ανασυνδυασμένου DNA πλασμιδίου έκφρασης [CMV -κενός- φορέας αναφοράς ή CMV-p53 (φορέας ο οποίος υπερ-εκφράζει τη φυσικού τύπου ανθρώπινη πρωτεΐνη p53)], που ευγενώς χορηγήθηκαν από τον Dr. J. C. Marine (VIB-K.U.Leuven, Leuven, Belgium).
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση στα δύο σωληνάρια και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα, το περιεχόμενο των δύο σωληναρίων αναμειγνύεται, αναδεύεται ήπια και προσεκτικά, και επώάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κατά τη διάρκεια αυτή, αφαιρείται το υπερκείμενο από τα τρυβλία που είχαν επιστρωθεί με κύτταρα την προηγούμενη ημέρα, αυτά εκπλένονται δύο φορές με το θρεπτικό μέσο Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Berlin, Germany) και μετά το πέρας των 30 λεπτών προστίθεται σε καθένα από τα τρυβλία το περιεχόμενο των σωληναρίων που περιλαμβάνει το

σύμπλεγμα με τη λιποφεκταμίνη και το πλασμιδιακό DNA (τελικός όγκος 500  $\mu$ l). Έπεται προσεκτική ανακίνηση του κάθε τρυβλίου με κυκλικές κινήσεις και επώαση για 6-8 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.

- Κατόπιν, αφαιρείται από τα τρυβλία το υλικό αυτό και εισάγεται νέο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM 1X, με 10% FBS και όλα τα επιπλέον πρόσθετα υλικά, πλην των αντιβιοτικών.
- Τα τρυβλία τοποθετούνται για 36 περίπου ώρες στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%) και ακολουθούν επώσεις παρουσία ή απουσία φαρμάκων και περαιτέρω διαδικασίες MTT και ανοσο-στυπώματος Western σύμφωνα με τα ως άνω περιγραφόμενα πρωτόκολλα (βλέπε 2.2 και 2.5).

➤ Για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) της εταιρείας QIAGEN (Plasmid Plus Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), ενώ η αποδοτικότητα της παροδικής διαμόλυνσης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τον φορέα αναφοράς pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., California, USA) σε πειράματα παροδικής συν-διαμόλυνσης (*co-transfection*) αποτίμησης και ποσοτικής αξιολόγησης των διαμολυσμένων κυττάρων μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας laser (*Confocal Scanning Laser Microscopy*).

## **2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός βιομορίων ενέργειας και προϊόντων γλυκολυτικού μεταβολισμού**

### **2.7.1 Δοκιμασία ποσοτικοποίησης ενεργειακής αναλογίας ADP/ATP**

Οι μεταβολές στην ποσοτική αναλογία ADP/ATP χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση του κυτταρικού θανάτου και της κυτταρικής επιβίωσης. Αυξημένα επίπεδα ATP και μειωμένα επίπεδα ADP εντοπίζονται σε κύτταρα τα οποία ευρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού (*proliferation*), ενώ το αντίστροφο λαμβάνει χώρα σε κύτταρα τα οποία διέρχονται από τη φάση απόπτωσης (*apoptosis*) και κυρίως νέκρωσης (*necrosis*). Η τυποποιημένη συσκευασία ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit (BioVision Research Products, California, USA) που χρησιμοποιήθηκε εκμεταλλεύεται τη βιο-φωταύγεια για την ανίχνευση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP και ADP. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί το ένζυμο



λουσιφεράση (*luciferase*) για την εκπομπή φωτονίων από το ATP και τη λουσιφερίνη, με το παραγόμενο αυτό φως να δύναται να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός λουμινομέτρου. Τα επίπεδα του ADP υπολογίζονται μέσω της μετατροπής του σε ATP. Η ακριβής διαδικασία που ακολουθείται είναι η κάτωθι:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (T24) επιστρώνονται σε τρυβλία 96 μικρο-βοθρίων, τα οποία είναι λευκά και μη-διαπερατά (*white-walled 96-well luminometer plates*), σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X και τελικό όγκο 200 μl.
- Την επόμενη ημέρα, όπου σε κάθε μικρο-βοθρίο (πηγάδι) υπάρχουν περίπου  $10^4$  κύτταρα, αφαιρείται το μέσο καλλιέργειας και εισάγεται νέο υλικό μέσα στο οποίο περιέχονται, ή όχι [δείγματα μάρτυρες (*controls*)], οι ανάλογες ποσότητες χημειοθεραπευτικού παράγοντα, και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο CO<sub>2</sub> για 30 λεπτά και για 2 ώρες, αντίστοιχα.
- Μετά το πέρας του εκάστοτε χρόνου επώασης στο φάρμακο, τα τρυβλία εξέρχονται του επωαστικού κλιβάνου, τους αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε βοθρίο 100 μl διαλύματος Nucleotide Releasing Buffer. Αναδεύονται ήπια και αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα, για να υπολογιστούν τα επίπεδα του ATP, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 10 μl αραιωμένου ενζύμου ATP Monitoring Enzyme και μετά το πέρας 1 λεπτού πραγματοποιείται η πρώτη μέτρηση (Αποτέλεσμα A) στο λουμινόμετρο TECAN Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).
- Για τη μέτρηση των επιπέδων του ADP, τα δείγματα του προηγούμενου βήματος μετρώνται στο ίδιο λουμινόμετρο 10 λεπτά μετά την εισαγωγή του πρώτου ενζύμου (Αποτέλεσμα B), ενώ κατόπιν προστίθενται 10 μl αραιωμένου ενζύμου ADP Converting Enzyme και σε 1 λεπτό γίνεται και η τρίτη μέτρηση (Αποτέλεσμα Γ).
- Η αναλογία ADP/ATP υπολογίζεται ως εξής: [Αποτέλεσμα Γ – Αποτέλεσμα B] / Αποτέλεσμα A.

### 2.7.2 Μέθοδος ποσοτικοποίησης λακτικού οξέος

Στην συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιείται η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) Lactate Assay «Colorimetric» Kit (BioVision Research Products, California, USA), όπου το λακτικό οξύ αντιδρά ειδικά με ένα ένζυμο και οδηγεί στη δημιουργία

ενός προϊόντος το οποίο αλληλεπιδρά με τον ανιχνευτή (*probe*) λακτικού και παράγει χρώμα μετρήσιμο φασματο-φωτομετρικά σε μήκος κύματος 570 nm. Η διαδικασία που ακολουθείται παρατίθεται παρακάτω:

- Σε διαφανή, διαπερατά τρυβλία 96 μικρο-βοθρίων (*96-well plates*) μεταφέρονται κύτταρα καρκίνου ουροδόχου κύστης (T24) σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X, σε τελικό όγκο 200  $\mu$ l.
- Την ερχόμενη ημέρα, αφαιρείται το υλικό, προστίθεται στα επιστρωμένα κύτταρα (περίπου  $10^4$  κύτταρα ανά μικρο-βοθρίο), σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.
- Μετά το πέρας 30 λεπτών και 2 ωρών, για κάθε πειραματική συνθήκη αντίστοιχα, τα τρυβλία τοποθετούνται στον πάγο, αφαιρείται το υπερκείμενο, πραγματοποιείται έκπλυση με παγωμένο PBS 1X και σε κάθε μικρο-βοθρίο εισάγονται 50  $\mu$ l διαλύματος Lactate Assay Buffer.
- Αφού επωαστούν για 10 λεπτά στο συγκεκριμένο διάλυμα υπό συχνές ήπιες αναδεύσεις, το υλικό με τα διαλυμένα σε αυτό κύτταρα μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml) τα οποία βρίσκονται συνεχώς στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 2 λεπτά, στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), στους 4°C.
- Κατόπιν τούτου, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια (*erpendorf*) τα οποία φυλάσσονται στους -80°C, με σκοπό να αποφευχθεί ο κατακερματισμός του λακτικού οξέος από το ένζυμο λακτική αφυδρογονάση (*LDH*) που ενδεχομένως εμπεριέχεται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.
- Έπειτα από τουλάχιστον 24 ώρες τοποθετούνται τα σωληνάρια με τα κυτταρικά εκχυλίσματα στον πάγο.
- Σε ένα νέο τρυβλίο 96 μικρο-βοθρίων (*96-well plate*) σε κάθε ένα εξ αυτών (μικρο-βοθρίο) τοποθετούνται 35  $\mu$ l από τα παραπάνω κυτταρικά εκχυλίσματα, ενώ προστίθενται και 15  $\mu$ l διαλύματος Lactate Assay Buffer, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος κάθε μικρο-βοθρίου να ανέρχεται στα 50  $\mu$ l. Χρησιμοποιούνται και ως δείγματα αναφοράς μικρο-βοθρία τα οποία δεν περιέχουν καθόλου κυτταρικό εκχύλισμα, παρά μόνο 50  $\mu$ l του διαλύματος Lactate Assay Buffer.

- Στα ίδια μικρο-βοθρία εισάγονται 50 µl από το μείγμα αντίδρασης (*Reaction mix*), στο οποίο εμπεριέχεται το κατάλληλο ένζυμο και ο ανιχνευτής (*probe*), με ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων, και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά, απουσία φωτός, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κατόπιν, το τρυβλίο μεταφέρεται στο μηχάνημα που θα μετρήσει φασματοφωτομετρικά την απορρόφηση σε μήκος κύματος 570 nm [TECAN Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)].
- Τέλος, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης, η οποία δημιουργείται με ειδικό διάλυμα Lactate Standard, υπολογίζεται η συγκέντρωση του λακτικού οξέος των δειγμάτων ως εξής:  $C = La/Sv$  (nmol/µl), όπου La είναι η ποσότητα του λακτικού οξέος του δείγματος σε nmol σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη και Sv ο όγκος του δείγματος σε µl που τοποθετείται σε κάθε μικρο-βοθρίο.

## 2.8 Ανάλυση αλληλουχίας DNA προϊόντων PCR

Το γονιδιωματικό (γενωμικό) DNA απομονώνεται από κάθε καρκινική σειρά ουροδόχου κύστης και επερχόμενη αντίδραση PCR με κατάλληλους ολιγο-εκκινητές ενισχύει τα επιθυμητά γονιδιακά τμήματα. Εναλλακτικά, το ολικό RNA απομονώνεται μετά την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων και με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (*RT*) (βλέπε 2.4.2) και εν συνεχεία με την αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR*) (βλέπε 2.4.3) λαμβάνεται ενισχυμένο και σε επαρκή ποσότητα το υπό μελέτη γονιδιακό προϊόν. Κατόπιν, ακολουθεί ο καθαρισμός των γονιδιακών τμημάτων και η αντίδραση ανάλυσης της αλληλουχίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω.

### 2.8.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης έχει ως εξής:

- ❖ Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης επιστρώνονται σε τρυβλία (διαμέτρου 10 mm) σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM 1X, σε τελικό όγκο 8 ml.
- ❖ Την επόμενη ημέρα, τα τρυβλία τοποθετούνται στον πάγο και με τη βοήθεια ειδικών μηχανικών αποξεστήρων (*scrappers*, Sarstedt, Germany), τα κύτταρα

- αποκολλώνται από το ταπήτιο, και μαζί με το θρεπτικό υλικό μέσα στο οποίο αιωρούνται, συλλέγονται σε ειδικά σωληνάρια τύπου falcon (15 ml).
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά, στους 4°C.
  - ❖ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με PBS 1X.
  - ❖ Έπεται φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά, στους 4°C.
  - ❖ Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 2 ml διαλύματος SE 1X. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 10 μl πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) και 200 μl SDS (10%). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους 55°C για τη διάρκεια της νύχτας.
  - ❖ Την επόμενη ημέρα, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται επιπλέον 2 ml διαλύματος SE 1X, 1,32 ml προ-θερμασμένου NaCl (6M) και αναδεύονται προσεκτικά.
  - ❖ Εισάγεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  - ❖ Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται στις 2500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 10 λεπτά, στους 4°C.
  - ❖ Η ανώτερη φάση που περιέχει το γονιδιωματικό DNA μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια και σε αυτά τοποθετείται ίσος όγκος ισοπροπανόλης (100%). Ακολουθεί ήπια ανακίνηση και το DNA αποκτά νηματοειδή μορφή και είναι πλέον εμφανές μέσα στο διάλυμα.
  - ❖ Με ειδική αποστειρωμένη και λυγισμένη στην οξύλυγχη άκρη της πιπέτα Pasteur «ψαρεύουμε» (συλλέγουμε) το DNA, ενώ ακολουθούν δύο ξεπλύματα σε 100% και 70% αιθανόλη, αντίστοιχα.
  - ❖ Μεταφέρουμε το ίζημα του DNA σε νέο σωληνάριο και προσθέτουμε 100 μl αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το DNA αφήνεται να διαλυθεί για αρκετή ώρα, ενώ φυλάσσεται αρχικά για τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C και τελικά στους -20°C.

- ❖ Η χημική σύνθεση του διαλύματος SE 10X είναι η εξής:

NaCl 6M	6,25 ml
EDTA (di-sodium, di-hydrate) 0,5M pH=8	25,00 ml
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	18,75 ml
Τελικός όγκος	50 ml

### 2.8.2 Ηλεκτροφόρηση του γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση ολικού RNA και περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (βλέπε 2.4.4).

### 2.8.3 Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης (*PCR: Polymerase Chain Reaction*)

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθείται αναλύεται παραπάνω (βλέπε 2.4.3).

### 2.8.4 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (βλέπε 2.4.4).

### 2.8.5 Καθαρισμός των προϊόντων της αλυσ(ιδ)ωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*PCR*)

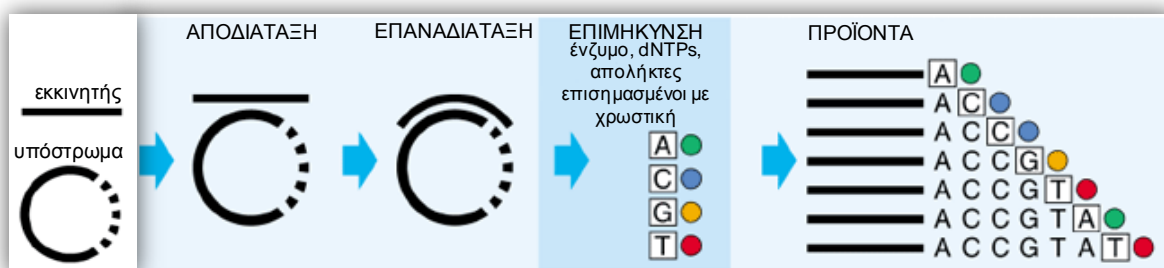
Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR από τα πλεονάζοντα dNTPs, τους ολιγο-εκκινητές και τα παραπροϊόντα της αντίδρασης, χρησιμοποιείται η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) της Invitrogen (Berlin, Germany). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 5 όγκοι από το διάλυμα πρόσδεσης Binding Buffer, το οποίο βοηθάει την πρόσδεση του DNA στην στήλη, ενώ ακολουθεί καλή ανάδευση και το μείγμα που προκύπτει «φορτώνεται» στις ειδικές κολώνες διαφορικής μοριακής συγγένειας (*affinity columns*).

- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υγρό που διέρχεται από τη στήλη απορρίπτεται, ενώ προστίθενται εκ νέου 650 µl διαλύματος Wash Buffer που περιέχει αιθανόλη και χρησιμεύει στον καθαρισμό του DNA που βρίσκεται προσδεμένο στη στήλη.
- Έπεται φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υγρό που διατρέχει την κολώνα αποβάλλεται, ενώ ακολουθεί «κενή» φυγοκέντρωση στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης αποστράγγιση του DNA PCR προϊόντος.
- Η κολώνα τοποθετείται σε νέο σωληνάριο τύπου eppendorf (1,5 ml) και προστίθενται 20 µl διαλύματος Elution Buffer για την εκχύλιση του DNA.
- Τα δείγματα επωάζονται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος φυγοκεντρώνται στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 1 λεπτό, στην ίδια θερμοκρασία και τελικά φυλάσσονται στους -20°C.

### 2.8.6 Κυκλική αντίδραση αλληλούχισης DNA (*Cycle DNA Sequencing*)

Η αντίδραση αυτή έχει ως σκοπό την ακριβή ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Sanger (Frederick Sanger, Νομπέλ Χημείας 1980). Αποτελεί μία απλή μέθοδο κατά την οποία διαδοχικοί κύκλοι αποδιάταξης, επαναδιάταξης και επιμήκυνσης σε θερμικό κυκλοποιητή οδηγούν σε γραμμική ενίσχυση των επιμηκυσμένων προϊόντων (**Εικόνα 2.9**). Στηρίζεται στη χρήση τριφωσφορικών διδεοξυ-νουκλεοτιδίων (*ddNTPs*) τα οποία φέρουν χρωστικές ανιχνεύσιμες από τη συσκευή του Αυτόματου Γενετικού Αναλυτή.



**Εικόνα 2.9** Διαγραμματική απεικόνιση μίας περιόδου κυκλικής αλληλούχισης [[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)].

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.5**, ενώ η συγκεκριμένη αντίδραση έλαβε χώρα σε ειδικά σωληνάρια τύπου erppendorf (0,2 ml) στον θερμικό κυκλοποιητή Biometra T3000 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany). Οι ολιγο-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen (Berlin, Germany), ενώ για την αντίδραση αλληλούχισης επιλέχθηκε η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems-Life Technologies Corporation, California, USA).

**Πίνακας 2.5** Τυπικό πρωτόκολλο αντίδρασης αλληλούχισης (*sequencing*) που επιλέχθηκε να εφαρμοστεί.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Sequencing Buffer 5X	2 $\mu$ l	1X
Πρόσθιος ( <i>F</i> ) ή Ανάστροφος ( <i>R</i> ) ολιγο-εκκινητής, 10 pmole	1 $\mu$ l	1 pmole
Sequencing Reaction Mix	1,3 $\mu$ l	-
DNA	x $\mu$ l	0,1 – 1 $\mu$ g
Υπερκάθαρο νερό ( <i>ddH<sub>2</sub>O</i> )	(5,7-x) $\mu$ l	-
Τελικός όγκος	10 $\mu$ l	-

Ένα τυπικό πρωτόκολλο για την αντίδραση ανάλυσης αλληλουχιών τμημάτων DNA καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, καθώς και οι επιμέρους θερμοκρασίες και το χρονικό διάστημα εφαρμογής της κάθε θερμοκρασίας παρατίθενται στον **Πίνακα 2.6**.

**Πίνακας 2.6** Τυπικό θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στις αντιδράσεις PCR που προηγούνται της εφαρμογής τεχνικής διαδικασίας κυκλικής αλληλούχισης DNA.

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο	
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 3 λεπτά
Θερμική αποδιάταξη PCR προϊόντος ( <i>denaturation</i> )	95°C για 30 δευτερόλεπτα
Επαναδιάταξη ολιγο-εκκινητών ( <i>annealing</i> )	50°C για 15 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση εκκινητών ( <i>extension</i> )	60°C για 4 λεπτά

} Αριθμός κύκλων  
30

Συνεπώς, σε κάθε σωληνάριο εμπεριέχεται το PCR προϊόν, μη-επισημασμένος ολιγο-εκκινητής (πρόσθιος ή ανάστροφος), το ρυθμιστικό διάλυμα και το μείγμα της αντίδρασης αλληλούχισης, το οποίο περιέχει τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυ-νουκλεοτίδια (*dNTPs*), τα τέσσερα επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική τριφωσφορικά διδεοξυ-νουκλεοτίδια (*ddNTPs*) και την DNA πολυμεράση (*AmpliTag® DNA Polymerase*). Κάθε διδεοξυ-νουκλεοτίδιο (*ddATP*, *ddCTP*, *ddGTP* και *ddTTP*) φέρει χρωστική η οποία απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος και συνεπώς εκπέμπει διαφορεικά και εμφανίζει διακριτό χρώμα η μία από την άλλη. Επίσης, ενώ τα *ddNTPs* δύνανται να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα, η απουσία ενός υδροξυλίου (*OH*) στο 3' άτομο άνθρακα εμποδίζει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού προκαλώντας τον πρώιμο τερματισμό της σύνθεσης του DNA. Συνεπώς, το αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης των *ddNTPs* είναι η παραγωγή φθορίζοντων τμημάτων τα οποία στο 3' άκρο τους φέρουν την εκάστοτε φθορίζουσα χρωστική (Εικόνα 2.9).

### 2.8.7 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης κυκλικής αλληλούχισης DNA

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιείται η τυποποιημένη συσκευασία (*kit*) Qiagen Dye Ex 2.0 Spin (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) και η ρητίνη Sephadex® G-50 (Sigma-Aldrich, USA). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Η G-50 διαλύεται σε αποσταγμένο νερό και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετές ώρες, έτσι ώστε να ενυδατωθούν και να διογκωθούν τα σφαιρίδια της ρητίνης.



- Σε ειδικές κολώνες τοποθετείται η απαραίτητη ποσότητα G-50 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υγρό απορρίπτεται, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία μίας στήλης από διογκωμένα σφαιρίδια.
- Σε κάθε προϊόν της τελικής αντίδρασης (με τελικό όγκο 10  $\mu$ l) προστίθενται 10  $\mu$ l αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, τα οποία αναδεύονται και εισάγονται με προσοχή στη στήλη των ενυδατωμένων σφαιριδίων G-50.
- Οι στήλες τοποθετούνται σε καθαρά, νέα σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml) και φυγοκεντρώνονται στις 3000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Η στήλη απορρίπτεται και το καθαρισμένο προϊόν φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.8.8 Προετοιμασία των καθαρισμένων προϊόντων και φόρτωση αυτών στον Αυτόματο Γενετικό Αναλυτή**

Η περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων ακολουθεί την εξής διαδικασία:

- Τα δείγματα που έχουν διέλθει της στήλης καθαρισμού τοποθετούνται για περίπου 30 λεπτά σε ειδική συσκευή παραγωγής κενού που έχει ως αποτέλεσμα την εξάτμιση του νερού στα δείγματα και τελικά τη λυοφιλοποίηση αυτών.
- Σε κάθε λυοφιλοποιημένο δείγμα προστίθενται 25  $\mu$ l φορμαμίδιο (Highly Deionized Formamide, Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems-Life Technologies Corporation, California, USA) και ακολουθεί καλή αναδιάλυση.
- Τα δείγματα μεταφέρονται στους  $94^{\circ}\text{C}$  για 2 λεπτά και αμέσως τοποθετούνται στον πάγο, έτσι ώστε να επιτευχθεί και να διατηρηθεί η αποδιάταξη των προς αλληλούχιση τμημάτων DNA.
- Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στον Αυτόματο Γενετικό Αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems-Life Technologies Corporation, California, USA) (**Εικόνα 2.10**), όπου πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση αυτών σε τριχοειδή σωληνάρια.

- Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται περαιτέρω σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή με τη βοήθεια του προγράμματος Chromas, το οποίο έχει τη δυνατότητα να «ανοίγει» αρχεία χρωματογραφίας του ως άνω Αναλυτή.



**Εικόνα 2.10** Αυτόματος Γενετικός Αναλυτής ABI Prism 310  
[[www.advancedbiolabservice.com](http://www.advancedbiolabservice.com)].

## 2.9 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας πρωτεασώματος

Η ενζυμ(α)τική ενεργότητα του πρωτεασώματος (*proteasome*), όμοια με αυτή της χυμοθρυψίνης (*chymotrypsin-like*), η οποία αναστέλλεται αναστρέψιμα από τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα Bortezomib (Velcade, Janssen-Cilag, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts, USA), προσδιορίζεται υπολογίζοντας την υδρόλυση του φθορίζοντος συνθετικού πεπτιδίου Suc-LLVY-AMC (10 mM διαλυμένο σε N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο) [359, 422]. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρατίθεται παρακάτω:

- Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης επιστρώνονται σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm, σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X και επωάζονται στον κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία > 95%.
- Την επόμενη ημέρα, στα κύτταρα τα οποία έχουν καλύψει το ταπήτιο σε ποσοστό 70% περίπου, χορηγείται ο αναστολέας του πρωτεασώματος Bortezomib σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται τρυβλίο που περιέχει μόνο το θρεπτικό μέσο DMEM 1X.

- 24 ώρες αργότερα, με τη βοήθεια ειδικών μηχανικών αποξεστήρων (*scrappers*), προκαλείται αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο, το οποίο προηγουμένως έχει τοποθετηθεί σε πάγο, και μαζί με το θεραπευτικό υλικό συλλέγονται σε ειδικά σωληνάρια τύπου falcon (15 ml).
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 5 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και σε κάθε σωληνάριο εισάγεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X. Ακολουθεί προσεκτική ανάδευση, ενώ τα δείγματα μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου erpendorf (1,5 ml) και φυγοκεντρώνται για μία ακόμη φορά στις 1500 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 5 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και σε κάθε δείγμα προστίθενται 200 µl Lysis Buffer.
- Έπεται φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό (*rpm*), για 15 λεπτά, στους 4°C.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται, τοποθετείται σε νέο σωληνάριο και ακολουθεί κανονικοποίηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad, California, USA) (βλέπε 2.5.2).
- Κατόπιν, σε νέα σωληνάρια τύπου erpendorf εισάγονται 15 µg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM HEPES pH=7,3, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 50 µl. Χρησιμοποιείται και αρνητικό δείγμα μάρτυρας (*control*), στον οποίο προστίθεται ο ίδιος αναστολέας πρωτεασώματος (Bortezomib) σε πολύ υψηλή συγκέντρωση, ενώ ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα 100 mM HEPES pH=7,3.
- Για κάθε δείγμα, στο ίδιο σωληνάριο προστίθενται 150 µl ενδιάμεσο διάλυμα (*Intermediate Solution*) και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 25°C.
- Η αντίδραση σε κάθε σωληνάριο τερματίζεται με την προσθήκη 300 µl διαλύματος τερματισμού (*Stop Solution*).
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε φθορισμόμετρο (Perkin Elmer LS 55, Massachusetts, USA) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μήκος κύματος διέγερσης (*Excitation Wavelength*) 360 nm και μήκος κύματος εκπομπής (*Emission Wavelength*) 440 nm.

- Από την τιμή κάθε δείγματος αφαιρείται η τιμή του δείγματος μάρτυρα (*control*).
- ❖ Η χημική σύνθεση των αντιδραστηρίων του διαλύματος Lysis Buffer και οι τελικές συγκεντρώσεις (ή όγκοι) αυτών παρατίθενται παρακάτω:

Tris-HCl (1 M, pH=7,6)	20 mM
NaCl (5 M)	250 mM
EDTA (0,5 M, pH=8,0 )	3 mM
Triton-X (100%)	0,5%
Aprotinin	1,15 µg/ml

- ❖ Η χημική σύνθεση του ενδιάμεσου διαλύματος (*Intermediate Solution*) είναι η εξής:

Suc-LLVY-AMC (10 mM διαλυμένο σε N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο)	2 µl
HEPES (100 mM, pH=7,3)	1500 µl

- ❖ Η χημική σύνθεση των αντιδραστηρίων του διαλύματος τερματισμού (*Stop Solution*) και οι τελικές συγκεντρώσεις αυτών παρατίθενται παρακάτω:

CH <sub>3</sub> COONa	30 mM
CH <sub>3</sub> COOH	70 mM
ClCH <sub>2</sub> COONa (pH=4,0)	100 mM

## **2.10 Αλλομοσχεύματα (“Xenografts”) καρκίνου ουροδόχου κύστης σε ανοσο-ανεπαρκείς (SCID) ποντικούς**

### **2.10.1 Δημιουργία της κυτταρικής σειράς T24-X (T24-Xenograft)**

Χρησιμοποιήθηκαν οι NOD.CB17-Prkdcscid/J ανοσοκατασταλμένοι ποντικοί για την εγκαθίδρυση των αλλομοσχευμάτων (“Xenografts”). Οι ποντικοί ενέθηκαν (εμβολιάστηκαν) υποδόρια (*subcutaneously*) με  $\sim 2 \times 10^6$  T24 κύτταρα για κάθε ζώο ( $\sim 10^6$  σε κάθε μηρό) και ακολούθησε στενή παρακολούθηση μέχρι την εμφάνιση των πειραματικών όγκων. Κάθε όγκος αποκόπηκε με ιδιαίτερη προσοχή για αποθήκευση, ανακαλλιέργεια και διαδοχική (σειριακή) ένεση σε νέους SCID (*severe combined immunodeficiency*) ποντικούς. Για τον σκοπό αυτόν, παρήχθη εναιώρημα μονοκυττάρων (*single-cells*) από κάθε κακοήγη ιστό που παραλήφθηκε και εκτεμαχίστηκε. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε για τέσσερις διαδοχικές *in vivo* γενεές (με σειριακές ανακαλλιέργειες) SCID ποντικών. Τελικά, τα κύτταρα που αποσπάστηκαν από τον έναν όγκο της τέταρτης γενεάς T24 αλλομοσχευμάτων εγκαθίδρυσαν μία νέα κυτταρική σειρά, ονόματι T24-X. Όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη μεταχειρίστηκαν με απόλυτη συμφωνία με τους Ελληνικούς νόμους (2015/92), τις κατευθυντήριες γραμμές που έχουν δοθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση και το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο (86/609 και ETS123, αντίστοιχα) και με πλήρη τήρηση του ανθρώπινου ενδιαφέροντος και των κανόνων που διέπουν την εργαστηριακή χρήση ζώων, σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH: National Institute of Health), στις Η.Π.Α. (Ασφάλεια Νο. A5736-01).

### **2.10.2 Χορήγηση χημειοθεραπευτικού παράγοντα και αξιολόγηση της κυτταροτοξικής (θεραπευτικής) του δράσης σε πειραματικούς όγκους**

Χρησιμοποιήθηκαν, και στην περίπτωση αυτή, NOD.CB17-Prkdcscid/J ανοσοκατασταλμένοι ποντικοί για την εγκαθίδρυση των T24 κακοήθων αλλομοσχευμάτων (*tumor “Xenografts”*). Με τον ίδιο τρόπο, οι ποντικοί ενέθηκαν (εμβολιάστηκαν) υποδόρια με  $\sim 2 \times 10^6$  T24 κύτταρα για κάθε ζώο ( $\sim 10^6$  σε κάθε

μηρό). Την ίδια ημέρα εμβολιασμού των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, στη μία ομάδα ποντικών πραγματοποιήθηκε και ενδοφλέβια χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα Bortezomib (αναστολέας λειτουργίας πρωτεασώματος) (20 µg/ποντικό), ο οποίος ήταν διαλυμένος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X, ενώ στη δεύτερη ομάδα (ομάδα αναφοράς, *control*) χορηγήθηκε με τον ίδιο τρόπο η ίδια ακριβώς ποσότητα σκέτου ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X. Η διαδικασία χορήγησης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα και του PBS 1X περιγράφεται εν συντομία ως εξής: αφού ακινητοποιήθηκαν τα ζωϊκά πρότυπα (ποντικοί), ακολούθησε διαστολή των αγγείων της ουράς, η οποία επιτεύχθηκε μέσω θέρμανσης από ειδικό λαμπτήρα και, κατόπιν τοπικής αποστείρωσης/απολύμανσης της ουράς με αιθανόλη, χορηγήθηκε ενδοφλέβια (*tail-vein*) το φάρμακο ή το PBS 1X με τη χρήση ειδικής σύριγγας 27G. Οι ενέσεις πραγματοποιούνται τρεις φορές την εβδομάδα, ανά 2 ημέρες, επί μέγιστο χρονικό διάστημα 43 ημερών.

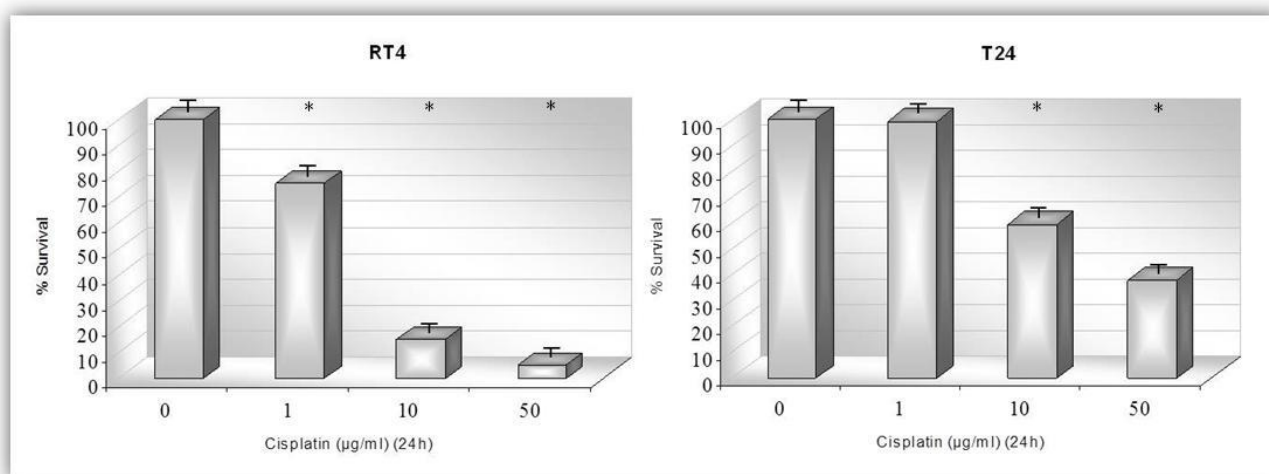
*Αποτελέσματα*

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Cisplatin (Σισπλατίνη)

##### 3.1.1 Κυτταροτοξικές επιδράσεις της Cisplatin ενάντια στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Η κυτταροτοξική (*cytotoxic*) δράση της Cisplatin στο προφίλ επιβίωσης των καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης RT4 και T24 προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου MTT [417]. Χορήγηση Cisplatin για 24 ώρες προκάλεσε αισθητή μείωση της βιωσιμότητας των RT4 και T24 καρκινικών κυττάρων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα ποσοστά επιβίωσης των RT4 κυττάρων παρουσία 1, 10 και 50  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin μετρήθηκαν κατά ακριβή μέσο όρο 75.4%, 15.23% και 5.41%, αντίστοιχα. Αντιθέτως, τα T24 καρκινικά κύτταρα επέδειξαν σημαντική ανθεκτικότητα στη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, όπως τεκμηριώθηκε από τα 99.4%, 59.47% και 37.9% αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης (Εικόνα 3.1). Η βαθμο-ειδική (*grade-specific*) αυτή απόκριση στη Cisplatin πιθανώς αντανακλά το διακριτό γενετικό υπόβαθρο των ως άνω κυττάρων (για παράδειγμα τη φύση του *p53* γονιδιακού τύπου), καθώς και την ικανότητα αυτών να ρυθμίζουν διαφορετικά τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου (*cell death*).



**Εικόνα 3.1** Βαθμο-ειδική και δόσο-εξαρτώμενη (*dose-dependent*) κυτταροτοξικότητα, η οποία επάγεται μετά από έκθεση των RT4 (*grade I*) και T24 (*grade III*)

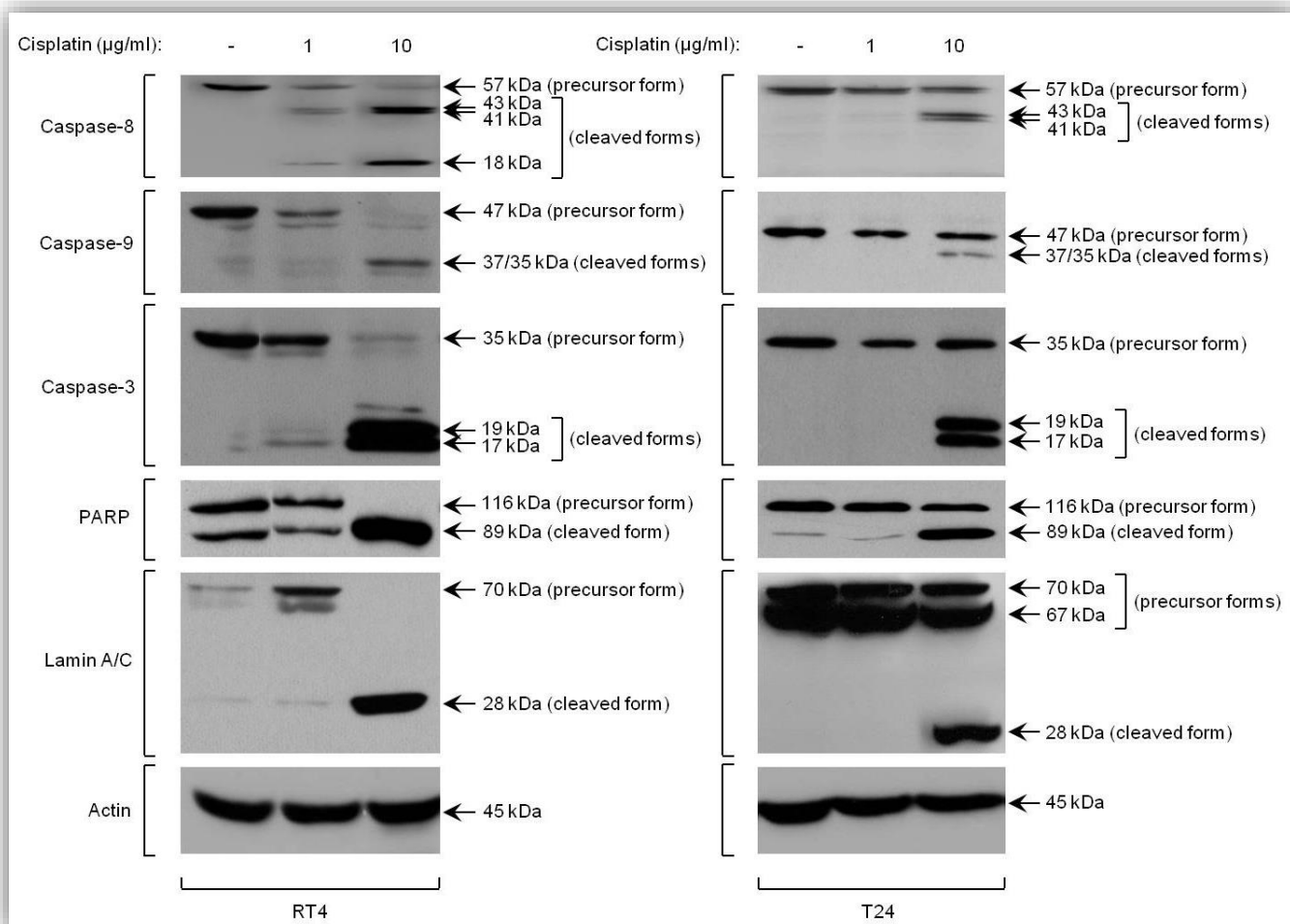


ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στη Cisplatin για 24 ώρες, όπως αποδεικνύεται από την τεχνική MTT. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *grade*: βαθμός κακοήθειας, *h*: ώρες και *μg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

### 3.1.2 Βαθμο-εξαρτώμενη απόπτωση επαγόμενη από τη Cisplatin

Εξαιτίας της ισχυρής κυτταροτοξικότητας των 50 μg/ml Cisplatin, όταν αυτή χορηγείται στα κύτταρα RT4 (Εικόνα 3.1), επηρεάζοντας ως εκ τούτου την αξιοπιστία των κυτταρικών εκχυλισμάτων πρωτεΐνης και RNA, και σε μία προσπάθεια να υιοθετηθούν κλινικά αντίστοιχες δόσεις του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, όλες οι επακόλουθες θεραπευτικές δοκιμασίες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις Cisplatin 1 και 10 μg/ml. Κατόπιν χορηγήσεως του φαρμάκου και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι τρεις σημαντικότερες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες της αποπτωτικής διαδικασίας, και ειδικότερα οι εναρκτήριες (*initiator*) Κασπάση-8 και Κασπάση-9 και η τελεστής (*effector*) Κασπάση-3, πρωτεολύθηκαν εκλεκτικά οδηγώντας στον σχηματισμό των αντίστοιχων ενεργών πρωτεασών, όπως αποκαλύπτεται ξεκάθαρα από το ανοσοστύπωμα Western. Παρόμοιο πρωτεολυτικό πρότυπο ανιχνεύεται και στις πυρηνικές πρωτεΐνες PARP [*Poly(ADP-ribose) polymerase*] και Lamin A/C, οι οποίες συνιστούν χαρακτηριστικά υποστρώματα του ρεπερτορίου των ενεργών Κασπασών (Εικόνα 3.2). Ο βαθμός της αποπτωτικής απόκρισης (*apoptotic response*) των δύο κυτταρικών τύπων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου θα μπορούσε αξιόπιστα να προσδιοριστεί μέσω της ποσοτικοποιημένης αναλογίας των θραυσμάτων πρωτεόλυσης [*cleaved, C* (για παράδειγμα 17 και 19 kDa για την Κασπάση-3)] προς τις πρόδρομες μορφές [*precursor, P* (για παράδειγμα 35 kDa για την Κασπάση-3)] των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό, συγκρίνοντας τους σχετικούς λόγους C/P των RT4 και T24 κυττάρων, για όλους τους υπό εξέταση

αποπτωτικούς διαμεσολαβητές, αναμφίβολα συνάγεται το συμπέρασμα ότι τα T24 είναι εντοπωσιακά πιο ανθεκτικά στην δια της Cisplatin επαγόμενη απόπτωση σε σύγκριση με τα RT4 κύτταρα.



**Εικόνα 3.2** Ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης, έπειτα από χορήγηση Cisplatin για 24 ώρες στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24, όπως αποκαλύπτεται από το ανοσο-στύπωμα Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της εκάστοτε πρόδρομης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) μορφής, αν και όπου υπάρχει. *Caspase*: Κασπάση, *precursor form*: πρόδρομη μορφή, *cleaved form*: πρωτεολυμένη μορφή, *Lamin*: Λαμίνη, *Actin*: Ακτίνη και *µg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

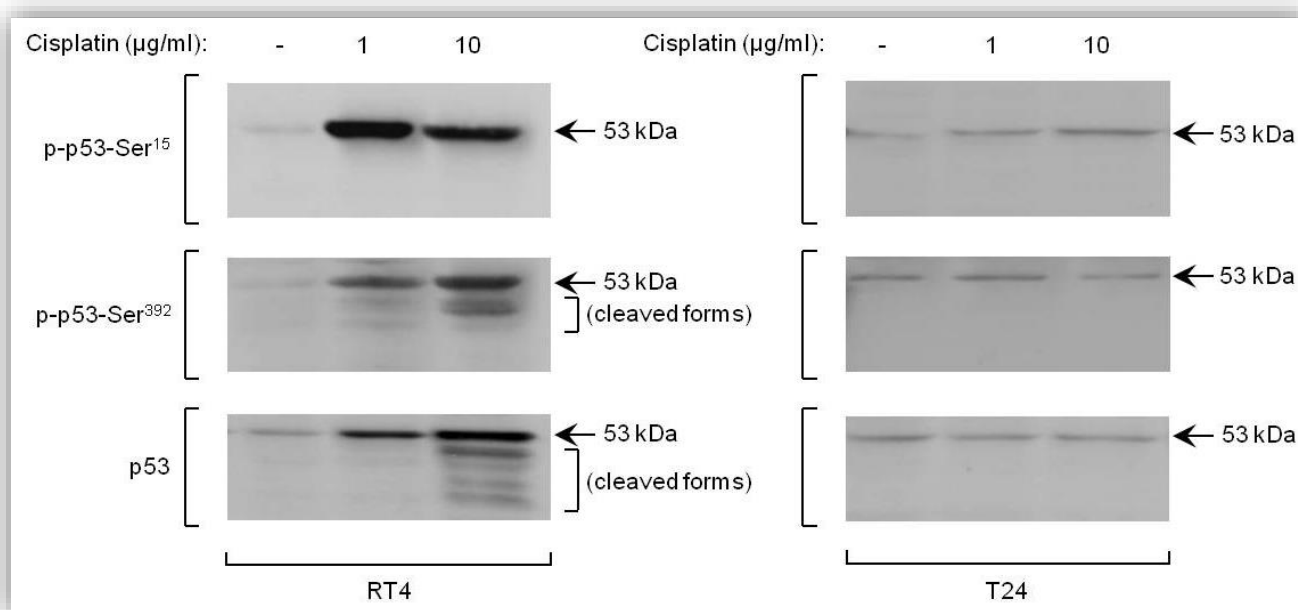
Αν και η πλέον αποτελεσματική δόση της Cisplatin όσον αφορά στην πρωτεολυτική επεξεργασία όλων των υπό μελέτη πρωτεϊνών είναι αυτή των 10

μg/ml, η Κασπάση-8 συνιστά την μοναδική πρωτεΐνη η οποία διασπάται και στην χαμηλότερη δόση του φαρμάκου (1 μg/ml) αποκλειστικά στα RT4 κύτταρα, επιβεβαιώνοντας έτσι την ενισχυμένη ευαισθησία των εν λόγω κυττάρων στον συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Επιπλέον, η απουσία του μικρότερου θραύσματος των 18 kDa στα T24, αλλά όχι στα RT4, καρκινικά κύτταρα έπειτα από τη δράση των 10 μg/ml Cisplatin πιθανόν αντανακλά μία T24-ειδική παρεμπόδιση σχηματισμού της ώριμης και κατά συνέπεια της πλήρως λειτουργικής πρωτεάσης, καθώς και μία συγκριτική εξασθένηση της ενεργοποίησης του συναφούς «εξωγενούς» μονοπατιού της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου (για παράδειγμα Fas) [224, 423]. Για τον έλεγχο, την αξιοπιστία και την εγκυρότητα των ως άνω αποτελεσμάτων εξετάστηκαν τα επίπεδα της άφθονης στα κύτταρα πρωτεΐνης Ακτίνης, η οποία σε όλες τις συγκεντρώσεις Cisplatin ανιχνεύτηκε ποσοτικά συγκρίσιμη και ισόποση χωρίς καμία διακύμανση επιπέδων έκφρασης (**Εικόνα 3.2**).

### 3.1.3 Μεσολαβούμενη από τη Cisplatin επαγωγή και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p53

Καθώς ο μεταγραφικός παράγοντας (*transcription factor*) p53 συνιστά έναν από τους πλέον ισχυρούς και εξέχοντες ρυθμιστές της προκαλούμενης από τον κατακερματισμό του DNA επαγόμενης απόπτωσης, και συχνά συσχετίζεται με την ανάπτυξη χημειο-ανθεκτικότητας στους ανθρώπινους καρκίνους [309, 424-427], εξετάστηκε ο ρόλος της στην από τη Cisplatin μεσολαβούμενη απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT4 και T24 κυττάρων, έπειτα από τη χορήγηση ή μη Cisplatin, υποβλήθηκαν στη διαδικασία του ανοσο-στυπώματος Western, χρησιμοποιώντας ειδικά πρωτογενή αντισώματα έναντι τόσο της ολικής όσο και της φωσφορυλιωμένης p53 πρωτεΐνης. Όπως διαφαίνεται από την **Εικόνα 3.3**, χορήγηση 1 και 10 μg/ml Cisplatin στα RT4 οδηγεί σε ισχυρή αυξορρύθμιση (*upregulation*) τόσο των ολικών όσο και των φωσφορυλιωμένων επιπέδων της p53 πρωτεΐνης. Τα κρίσιμα κατάλοιπα σερίνης στις θέσεις 15 (*Ser<sup>15</sup>*) και 392 (*Ser<sup>392</sup>*) φωσφορυλιώνονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά με έναν RT4-ειδικό τρόπο, υποστηρίζοντας έτσι σθεναρά τον ρόλο της φυσικού τύπου πρωτεΐνης p53 στην κυτταροτοξικότητα της Cisplatin έναντι του καρκίνου της

ουροδόχου κύστης. Επιπροσθέτως, η υψηλότερη δόση του φαρμάκου (10  $\mu\text{g/ml}$ ) φαίνεται να ενισχύει την αστάθεια της εν λόγω πρωτεΐνης, όπως τεκμηριώνεται από τον φαρμακο-επαγόμενο σχηματισμό των χαμηλού μοριακού βάρους p53 πρωτεϊνικών θραυσμάτων (*cleaved forms*). Σε αντίθεση, τα T24 κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σχεδόν καθόλου στη δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα, όπως αποκαλύπτεται από την υπερβολικά ασθενή αυξορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης p53 πρωτεΐνης στη θέση σερίνη 15 (*Ser*<sup>15</sup>) και το μη-ανιχνεύσιμο, από το φάρμακο επαγόμενο, προφίλ έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη θέση σερίνη 392 (*Ser*<sup>392</sup>) καθώς και της ολικής μορφής της p53 πρωτεΐνης (**Εικόνα 3.3**).



**Εικόνα 3.3** Επαγόμενη από τη Cisplatin συσσώρευση και φωσφορυλίωση στις θέσεις σερίνη 15 και 392 της φυσικού τύπου (*wt: wild-type*) πρωτεΐνης p53, αλλά όχι της ομόλογης μεταλλαγμένης (*mt: mutant*) μορφής αυτής, στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24, όπως διαφαίνεται από το ανοσοστύπωμα Western, έπειτα από 24 ώρες δράσης του εν λόγω φαρμάκου. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. Οι αγκύλες υποδεικνύουν τις πρωτεολυμένες μορφές της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης (ολικής και φωσφορυλιωμένης), όπως αυτές σχηματίζονται σε απόκριση στη δράση της Cisplatin. *p-*: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *cleaved forms*: πρωτεολυμένες μορφές και  *$\mu\text{g/ml}$* : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

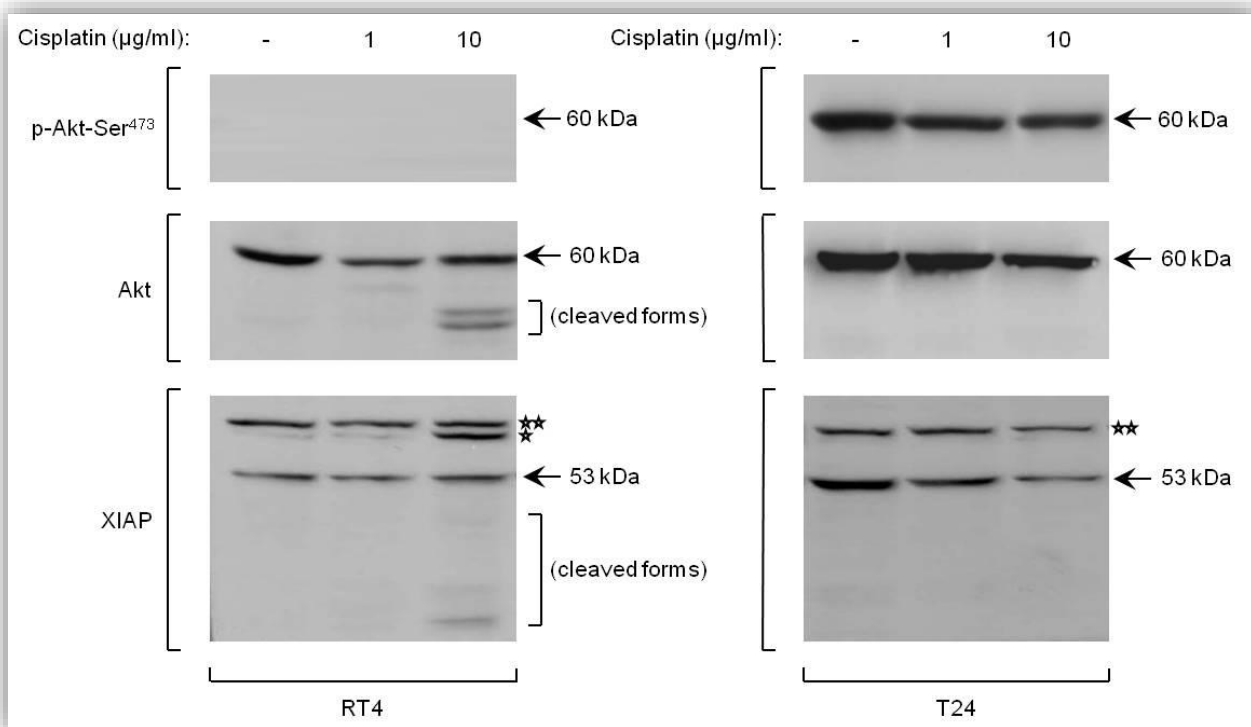
Συνολικά, τα παρατηρούμενα διακριτά πρότυπα των RT4 και T24 καρκινικών κυττάρων υποδεικνύουν έντονα τον κρίσιμο ρόλο της τυροσίνης 126 ( $Y^{126}$ ) στην p53 πρωτεΐνη (το εν λόγω κατάλοιπο απουσιάζει από τα T24 κύτταρα), όσον αφορά στην ενεργότητα και λειτουργία αυτής σε συνθήκες στρες και καταστροφής του γονιδιωματικού DNA [428, 429].

### **3.1.4 Απορρύθμιση της σηματοδοτικής ακεραιότητας της Akt κινάσης και του XIAP αποπτωτικού αναστολέα σε απόκριση στη δράση της Cisplatin**

Έχειδειχθεί ότι αλλαγές στην p53-εξαρτώμενη απόπτωση εμπλέκονται καθοριστικά στην Akt-διαμεσολαβούμενη χημειο-ανθεκτικότητα [309, 424, 425]. Ως εκ τούτου, ο ρόλος της Akt κινάσης σερίνης/θρεονίνης καθώς και του αντι-αποπτωτικού υποστρώματος αυτής XIAP [309, 430] σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, τα οποία υπόκεινται στην αποπτωτική διαδικασία έπειτα από χορήγηση Cisplatin, εξετάστηκαν δια μέσου της προσέγγισης του ανοσο-στυπώματος Western (**Εικόνα 3.4**). Σε αντιδιαστολή με τα RT4 κύτταρα, τα T24 χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτα ενισχυμένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης Akt στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 473 ( $Ser^{473}$ ), γεγονός το οποίο θα μπορούσε να συσχετισθεί ισχυρά με τον διαφορικό βαθμό κακοήθειας των δύο υπό μελέτη κυτταρικών σειρών. Η απουσία συστατικής (*constitutive*) ενεργής μορφής Akt στα RT4 κύτταρα, σε συνδυασμό με τη δημιουργία δύο πρωτεϊνικών θραυσμάτων χαμηλότερου μοριακού βάρους (περίπου 35 και 40 kDa), έπειτα από χορήγηση 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin, στην εν λόγω κυτταρική σειρά, και όχι στα T24 κύτταρα, τα οποία (θραύσματα) ενδεχομένως λειτουργούν ως «αρνητικά επικρατείς» (*dominant negative*) ισομορφές, θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την αυξημένη χημειο-ανθεκτικότητα της T24 καρκινικής σειράς στην κυτταροτοξική δράση του εν λόγω φαρμάκου (**Εικόνες 3.1, 3.2 και 3.4**).

Σε συμφωνία με το παρατηρούμενο χημειο-ευαίσθητο προφίλ, ο αντι-αποπτωτικός μεσολαβητής XIAP πρωτεολύεται σε τμήματα χαμηλότερου μοριακού βάρους, με χαρακτηριστικότερο αυτό των 20 kDa, το οποίο ανιχνεύεται ειδικά στα RT4 κύτταρα έπειτα από την επίδραση 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin. Η πρωτεϊνική ζώνη των περίπου 90 kDa, η οποία διακρίνεται αποκλειστικά στα κυτταρικά αυτά εκχυλίσματα,

πιθανώς αντιπροσωπεύει μία συμπικουϊτινωμένη μορφή του XIAP, υποδεικνύοντας έτσι την βαθμο-ειδική ενεργοποίηση ενός γενικού μηχανισμού συμπικουϊτινώσεως, ο οποίος στοχεύει τις προς αποικοδόμηση πρωτεΐνες στο πρωτεάσωμα (ένα αστέρι, **Εικόνα 3.4**) [430, 431].



**Εικόνα 3.4** Βαθμο-εξαρτώμενη δομική πρωτεόλυση ή αποικοδόμηση των Akt (συνολικά και φωσφορυλιωμένα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης) και XIAP αντι-αποπτωτικών διαμεσολαβητών μετά από 24ωρη έκθεση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (RT4 και T24) στη Cisplatin, όπως διαφαίνεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε- δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. Ένα αστέρι (★): μία ενδεχομένως συμπικουϊτινωμένη μορφή του XIAP αποπτωτικού αναστολέα, Δύο αστέρια (★★): μία υψηλού μοριακού βάρους (MW) XIAP-προσομοιάζουσα πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, Αγκύλες: πρωτεολυμένες μορφές των Akt και XIAP πρωτεϊνών με ενδεχόμενο «αρνητικά επικρατή» ρόλο στην λειτουργική τους δυναμική, *p*-: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *cleaved forms*: πρωτεολυμένες μορφές και *µg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

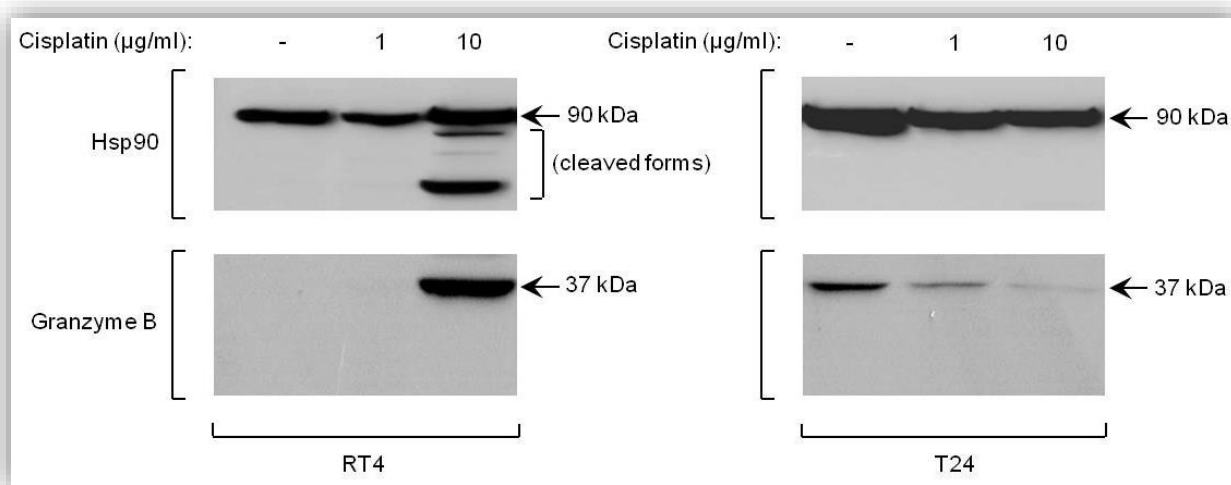
Η υψηλότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη θα μπορούσε να συνιστά ένα XIAP-προσομοιάζον (*XIAP-like*) ομόλογο του οποίου η λειτουργική σημασία παραμένει προς το παρόν αδιευκρίνιστη. Εντούτοις, στα T24, παρατηρείται μία φαρμακο-δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του XIAP αναστολέα, η οποία κυρίως χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία πρωτεϊνικής κατάτμησης και ενδεχόμενης ουμπικουϊτίνιωσης (**Εικόνα 3.4**).

### **3.1.5 Επαγόμενη δια μέσου της Cisplatin πρωτεόλυση της Hsp90 από την πρωτεάση σερίνης Granzyme B**

Η πρωτεΐνη Hsp90 (*Heat shock protein 90*) ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό την δομική/χωροταξική ωρίμανση και σταθερότητα των πρωτεϊνών p53 και Akt και έχει προσφάτως ανακύψει ως ένας καθοριστικός στόχος για τη θεραπεία του ανθρώπινου καρκίνου [432, 433]. Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια να εξετασθεί ο ρόλος της στην από τη Cisplatin διαμεσολαβούμενη απόπτωση των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, μέσω της τεχνικής ανοσο-στυπώματος Western. Όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 3.5**, η έκθεση σε 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin έχει ως επακόλουθο τον RT4-ειδικό σχηματισμό ενός έντονου (και κάποιων ασθενέστερων) θραύσματος με κατά προσέγγιση υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 65 kDa. Το πρωτεολυτικό αυτό παράγωγο ενδεχομένως δρα με τρόπο «αρνητικά επικρατή» (*dominant negative*) έναντι της ολικής/φυσικής (*native*) Hsp90 πρωτεΐνης, επάγοντας έτσι δομικούς «ακρωτηριασμούς» κρίσιμων μορίων διαμεσολαβητών της απόπτωσης (για παράδειγμα την p53, Akt και XIAP, **Εικόνες 3.3** και **3.4**), απορρυθμίζοντας τη λειτουργία τους και/ή στοχεύοντάς τους στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση [432].

Προσφάτως, αναφέρθηκε ότι η πρωτεΐνη Hsp90 αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό υπόστρωμα για την πρωτεάση σερίνης Granzyme B *in vitro* [434]. Προς μεγάλο ενδιαφέρον, η ισχυρή επαγωγή των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης Granzyme B έπειτα από χορήγηση 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin στα RT4 κύτταρα, υποδηλώνει ισχυρά τον καθοριστικό *in vivo* ρόλο της στην φαρμακο-διαμεσολαβούμενη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Hsp90. Εξεναντίας, τα T24 κύτταρα χαρακτηρίζονται από μία φαρμακο-δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση (*downregulation*) των συνολικών επιπέδων έκφρασης της πρωτεάσης Granzyme B, αιτιολογώντας με αυτόν τον τρόπο

ξεκάθαρα την ανθεκτικότητά τους στην δια μέσου της Cisplatin επαγόμενη πρωτεολυτική επεξεργασία της Hsp90 (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5** Granzyme B-μεσολαβούμενη πρωτεολυτική θραύση της Hsp90, μετά από 24ωρη χορήγηση Cisplatin σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (RT4), όπως αποκαλύπτεται μέσω του ανοσο-στυπώματος Western: μία βαθμο-ειδική διαδικασία. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. Η αγκύλη υποδεικνύει τις Hsp90 πρωτεολυμένες μορφές, με εμφανή τον φαρμακο-επαγόμενο σχηματισμό ενός κύριου θραύσματος ~65 kDa, όπως αυτές σχηματίζονται σε απόκριση στη δράση της Cisplatin. *cleaved forms*: πρωτεολυμένες μορφές και *µg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.1.6 Οι δια μέσου της Cisplatin επαγόμενες μεταγραφικές αποκρίσεις που εμπλέκονται στα αποπτωτικά μονοπάτια μέσω των μιτοχονδρίων («ενδογενές» μονοπάτι) και των υποδοχέων θανάτου της κυτταρικής μεμβράνης («εξωγενές» μονοπάτι)

Μεταξύ της πληθώρας των γονιδίων που εξετάστηκαν με την ημι-ποσοτική αντίδραση RT-PCR, απεικονίζονται μόνο όσα παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές στην μεταγραφική τους ενεργότητα (Πίνακας 3.1).

**Πίνακας 3.1** Παραθέτονται τα ονόματα των γονιδίων, οι αλληλουχίες των ολιγονεκκινητών *Forward (F)* (Πρόσθιος) και *Reverse (R)* (Ανάστροφος), τα

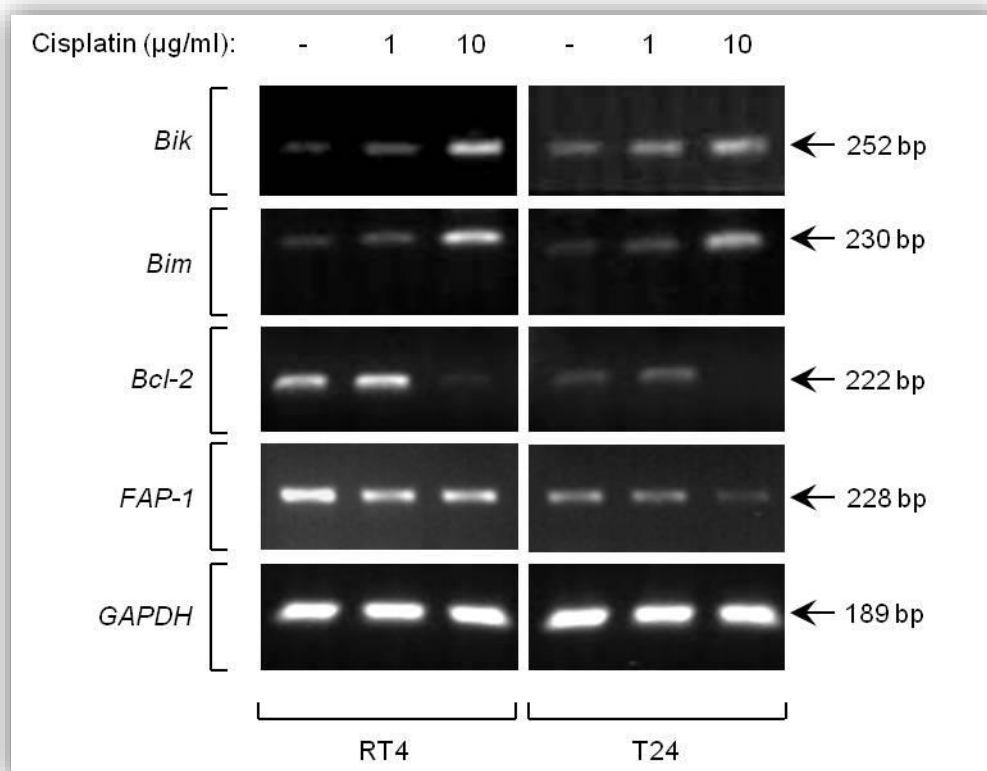


μοριακά μεγέθη (*bp*) (*base pairs*) των προϊόντων της PCR και οι συνθήκες (*Ta* και ο αριθμός των κύκλων) της PCR για τα γονίδια που εξετάστηκαν. *Gene Name*: Όνομα Γονιδίου, *Primer Sequence*: Αλληλουχία Ολιγο-Εκκινητή, *Length of PCR Product*: Μήκος PCR Προϊόντος, *Ta*: Θερμοκρασία Επαναδιάταξης και *Number of Cycles*: Αριθμός Κύκλων.

	Gene Name	Primer Sequence	Length of PCR Product	Ta	Number of Cycles
1.	<i>Bik</i>	F: 5'-CTG TAT GAG CAG CTC CTG G- 3' R: 5'-GAT GTC CTC AGT CTG GTC G- 3'	252 bp	55°C	30
2.	<i>Bim</i>	F: 5'-TGT GAC AAA TCA ACA CAA ACC C- 3' R: 5'-AGT CGT AAG ATA ACC ATT CGT G- 3'	230 bp	57°C	30
3.	<i>Bcl-2</i>	F: 5'-TGT GGC CTT CTT TGA GTT CG- 3' R: 5'-AGC AGA GTC TTC AGA GAC AG- 3'	222 bp	55°C	30
4.	<i>FAP-1</i>	F: 5'-CAG ATG GAA GTA TAG CCT TG- 3' R: 5'-TAG ATG GAC TTT CAC TGG AG- 3'	228 bp	53°C	30
5.	<i>GAPDH</i>	F: 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC- 3' R: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC- 3'	189 bp	55°C	28
6.	<i>Fas</i>	F: 5'-GGA TGA ACC AGA CTG CGT G- 3' R: 5'-CTG CAT GTT TTC TGT ACT TCC- 3'	371 bp	55°C	30
7.	<i>FasL</i>	F: 5'-CTC TGG AAT GGG AAG ACA CC- 3' R: 5'-ACC AGA GAG AGC TCA GAT ACG- 3'	325 bp	57°C	40
8.	<i>TRAIL</i>	F: 5'-TGG CTA TGA TGG AGG TCC AG- 3' R: 5'-GTT GCC ACT TGA CTT GCC AG- 3'	249 bp	57°C	30
9.	<i>Puma</i>	F: 5'-CAG ACT GTG AAT CCT GTG CT- 3' R: 5'-ACA GTA TCT TAC AGG CTG GG- 3'	251 bp	55°C	35
10.	<i>Caspase-10</i>	F: 5'-CAT AGG ATT GGT CCC CAA CA- 3' R: 5'-CTT GAT ACG ACT CGG CTT CC- 3'	500 bp	55°C	32
11.	<i>ATP7A</i>	F: 5'-GCC TCT GAC ACA AGA AAC TG- 3' R: 5'-GCT ATT ACT ACC AAC GGC TC- 3'	246 bp	55°C	30
12.	<i>ATP7B</i>	F: 5'-GCT GAT TGG AAA CCG TGA GT- 3' R: 5'-ATT GCG ATC ATC CCA CAG AG- 3'	144 bp	55°C	30
13.	<i>MRP1</i>	F: 5'-ACC TGG AAA CGG ACG ACC T- 3' R: 5'-TAC TCC TGG ATT TCT CCT TTG- 3'	142 bp	55°C	32
14.	<i>CTR1</i>	F: 5'-CCT TCT CAC CAT CAC CCA AC- 3' R: 5'-CTT GTG ACT TAC GCA GCA GG- 3'	238 bp	57°C	30

Βασιζόμενοι στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση της έκθεσης στη Cisplatin, μπορούν να διακριθούν τρεις κατηγορίες γονιδίων: α) γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την απόπτωση με p53-ανεξάρτητο τρόπο (**Εικόνα 3.6**), β) p53-εξαρτώμενα γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση (**Εικόνα 3.7**) και γ) γονίδια τα οποία ελέγχουν την εισροή και εκροή της Cisplatin, ανεξάρτητα από το γενετικό υπόβαθρο της p53 πρωτεΐνης (**Εικόνα 3.8**).

Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.6**, και χρησιμοποιώντας το *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς, στα γονίδια *Bik* και *Bim* παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής τους έκφρασης στη συγκέντρωση 10 μg/ml Cisplatin και στους δύο υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους. Σε αντιδιαστολή, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Bcl-2* εξασθένησαν σημαντικά στην υψηλότερη μόνο δόση, στις κυτταρικές σειρές RT4 και T24, ενώ η γονιδιακή ενεργότητα των *Bcl-X<sub>L</sub>* και *Mcl-1* μελών της οικογένειας παρέμεινε ανεπηρέαστη και στις δύο δόσεις του φαρμάκου (αποτελέσματα τα οποία δεν παρουσιάζονται). Βάσει του προ-αποπτωτικού ρόλου των πρωτεϊνών *Bik* και *Bim* και της αντι-αποπτωτικής ενεργότητας του γονιδιακού προϊόντος *Bcl-2* (μέλη με καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογία των μιτοχονδρίων), τα αποκτώμενα προφίλ μεταγραφικής έκφρασης προτείνουν έντονα ένα σενάριο φαρμακο-επαγόμενης απόπτωσης μέσω της απορρύθμισης και διατάραξης της μιτοχονδριακής λειτουργίας [224, 435].



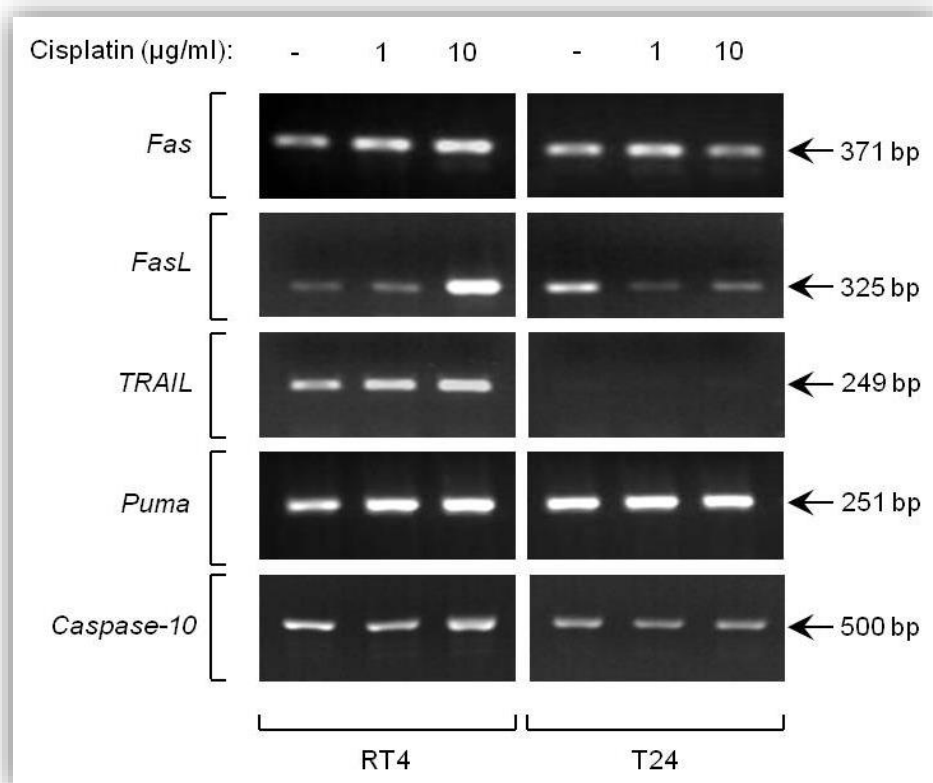
**Εικόνα 3.6** Ανάλυση μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (RT4 και T24), στις οποίες έχει χορηγηθεί για 24 ώρες Cisplatin, με εμφανή την p53-ανεξάρτητη λειτουργική τους απόκριση, όπως φαίνεται από την εφαρμογή της ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας, χρησιμοποιώντας το *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση γονιδίων, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους μεγέθη σε ζεύγη βάσεων. *bp*: ζεύγος βάσεων και *μg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Η ομάδα των p53-ανεξάρτητων αποπτωτικών γονιδίων περιλαμβάνει, επίσης, το γονίδιο *FAP-1* (*PTPL1*), το οποίο κωδικοποιεί για έναν αναστολέα της Fas-διαμεσολαβούμενης απόπτωσης και το οποίο καταστέλλεται αισθητά έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin, με τρόπο ανεξάρτητο από τον κυτταρικό τύπο και τον βαθμό κακοήθειας αυτού (**Εικόνα 3.6**).

Τουναντίον, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου φαίνεται να ακολουθούν ένα βαθμο-ειδικό προφίλ γονιδιακής ενεργοποίησης σε απόκριση στο γενετοξικό (*genotoxic*) στρες. Έπειτα από επίδραση 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin, τα προ-αποπτωτικά γονίδια *Fas* (*APO-1/CD95*), *FasL* (*CD95L*), *TRAIL* (*APO-2L*) και *Κασπάση-10* (*Caspase-10*) σημείωσαν σημαντική αυξορρύθμιση (*upregulation*) της μεταγραφικής τους έκφρασης στα RT4 κύτταρα, ενώ τα T24, με εξαίρεση τα *FasL* και *TRAIL*, παρέμειναν σχεδόν ανεπηρέαστα (μία ισχνή μόνο μειορρύθμιση παρατηρήθηκε στο *Fas* και στην *Κασπάση-10*). Η αξιοπρόσεκτη φαρμακο-διαμεσολαβούμενη μείωση της έκφρασης του *FasL* και η απουσία μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου *TRAIL* στα T24 καρκινικά κύτταρα (ενδεχομένως λόγω μηχανισμών υπερ-μεθυλίωσης ή/και υπο-ακετυλίωσης) υποδεικνύουν (σε συνδυασμό με το προφίλ έκφρασης των δύο άλλων γονιδίων) μία σθεναρή βαθμο-ειδική και δοσο-εξαρτώμενη λειτουργική αποδυνάμωση (από τη Cisplatin) του συστήματος σηματοδότησης των διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτων που συντονίζουν την απόπτωση (**Εικόνα 3.7**).

Τα γονίδια *Fas*, *FasL*, *Puma* και *Κασπάση-10* φαίνεται πως ενεργοποιούνται με p53-εξαρτώμενο τρόπο, σε συμφωνία και με προηγούμενες αναφορές σε διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα [436-439], ενώ το *TRAIL* ακολουθεί διαφορετικούς και πιθανώς p53-ανεξάρτητους μηχανισμούς ελέγχου της γονιδιακής

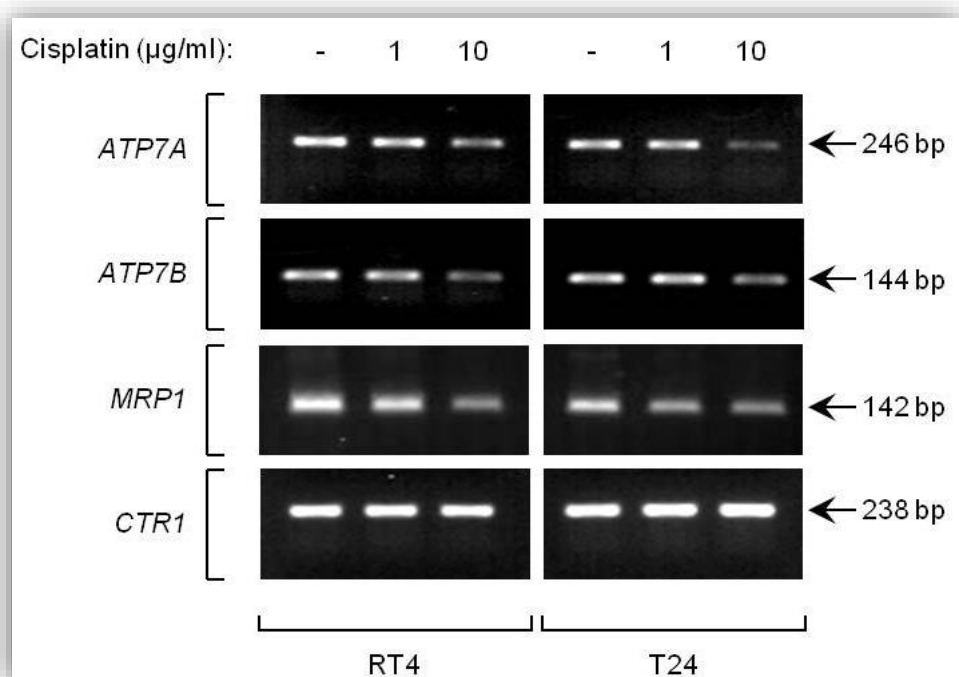
του ενεργότητας [440, 441]. Επιπλέον, η επαγωγή του *Puma* στα RT4 κύτταρα μετά από την έκθεση αυτών στο φάρμακο εισηγείται μία σημαντική και απαραίτητη συμμετοχή των p53 γονιδίων στόχων που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή λειτουργία στη χημειο-ανθεκτικότητα και φαρμακολογική αντοχή του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Εικόνα 3.7) [224, 438].



**Εικόνα 3.7** Προφίλ μεταγραφικής έκφρασης και απόκρισης των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης στα RT4 και T24 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, στα οποία έχει χορηγηθεί Cisplatin σε δύο διαφορετικές δόσεις, για 24 ώρες, με εμφανή την απόκτηση μίας p53-εξαρτώμενης λειτουργικής αντίδρασης στο φάρμακο, όπως αποκαλύπτεται από την εφαρμογή της ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση γονιδίων, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους μεγέθη σε ζεύγη βάσεων. *Caspase*: Κασπάση, *bp*: ζεύγος βάσεων και *µg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.1.7 p53-ανεξάρτητες μεταγραφικές δραστηριότητες που σχετίζονται με τη «διακίνηση» (“*trafficking*”) της Cisplatin

Καθοριστικό παράγοντα για την ανθεκτικότητα στη Cisplatin αποτελεί η μειωμένη συσσώρευση του φαρμάκου στο κύτταρο. Η ανθεκτικότητα αυτή δύναται να αποκτηθεί ρυθμίζοντας, μεταξύ άλλων, τις διαδικασίες πρόσληψης (*uptake*) ή/και εκροής (*efflux*) του εν λόγω φαρμάκου [306, 311, 442, 443]. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.8**, τα γονίδια *ATP7A*, *ATP7B* και *MRP1*, τα οποία κωδικοποιούν για μεμβρανικούς μεταφορείς (*transporters*) και εμπλέκονται καθοριστικά στην έξοδο του φαρμάκου από το κύτταρο [306, 311, 444-448], παρουσιάζουν αισθητή μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας και στους δύο κυτταρικούς τύπους στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του *CTR1* (*SLC31A1*) γονιδίου, του οποίου η ομοειδής πρωτεΐνη ενέχεται στο συντονισμό της εισόδου της Cisplatin εντός του κυττάρου [306, 311, 444, 446, 448], διατηρούνται ανέπαφα έπειτα από έκθεση στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές RT4 και T24 (**Εικόνα 3.8**). Ως εκ τούτου, η φαρμακο-επαγόμενη τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης θα μπορούσε να συσχετίζεται άμεσα με την p53-ανεξάρτητη εξασθένηση των συστημάτων εκροής της Cisplatin, οδηγώντας τελικά σε αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση αυτής και ισχυρό γονιδιωματικό στρες των προσβεβλημένων κυττάρων.



**Εικόνα 3.8** Μελέτη της γονιδιακής δράσης που εμπλέκεται στη «διακίνηση» της Cisplatin, μετά από 24ωρη έκθεση στο φάρμακο των ανθρώπινων καρκινικών σειρών ουροδόχου κύστης RT4 και T24, με εμφανή την p53-ανεξάρτητη απόκριση αυτών στη Cisplatin, όπως αποδεικνύεται από την εφαρμογή της ημι-ποσοτικής αντίδρασης (sq)RT-PCR. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση γονιδίων, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους μεγέθη σε ζεύγη βάσεων. *bp*: ζεύγος βάσεων και *μg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.1.8 Συγκριτική ανάλυση της κυτταροτοξικής δράσης των Cisplatin, Carboplatin και Oxaliplatin σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

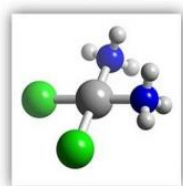
Δεδομένης της παράπλευρης και συστημικής τοξικότητας (*systemic toxicity*) [π.χ. ωτοτοξικότητα (*ototoxicity*)] που συνήθως εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της βασιζόμενης στη Cisplatin χημειοθεραπευτικής αντιμετώπισης διαφορετικών ανθρώπινων κακοηθειών, δομικά τροποποιημένα, και με νέες θεραπευτικές ιδιότητες, παράγωγα αυτής έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί στην κλινική πράξη, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις Carboplatin (*Καρβοπλατίνη*) και Oxaliplatin (*Οξαλιπλατίνη*). Συγκριτικά, η Carboplatin αποδεικνύεται να είναι χημικά πιο σταθερή, να συνδέεται σε λιγότερο ποσοστό με πρωτεΐνες στόχους, να επιτρέπει υψηλότερα επίπεδα ανοχής (*tolerance*), να προκαλεί μειωμένη νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα, αλλά συγχρόνως να εμφανίζει και μειωμένη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την εξάλειψη διακριτών μορφών ανθρώπινου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και αυτού της ουροδόχου κύστης. Αντίθετα, η Oxaliplatin, ένα 2<sup>ης</sup> γενεάς εξελιγμένο σκεύασμα βασισμένο στην πλατίνα (*Pt*), χαρακτηρίζεται από απουσία νεφροτοξικότητας, καθυστέρηση εκδήλωσης και αναστρέψιμη νευροτοξικότητα, ενώ η εν γένει μέτρια θεραπευτική της δραστηριότητα ενισχύεται εμφανώς όταν συνδυάζεται με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η 5'-Fluorouracil (*5-FU*, 5'-Φθοροουρακίλη) [306, 449, 450].

Ως εκ τούτου, και στην κατεύθυνση της συγκριτικής ανάλυσης των κυτταροτοξικών αποκρίσεων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στην, ενδεχομένως, διαφορετική δράση των Cisplatin, Carboplatin και Oxaliplatin, T24 κύτταρα (*grade III*) επώασθησαν για 24, 48, 72 και 96 h με διαφορετικές

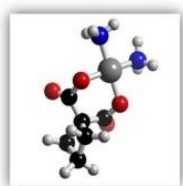
συγκεντρώσεις (0, 1, 10 και 50  $\mu\text{g/ml}$ ) του εκάστοτε φαρμάκου, στη μορφή μονοσχήματος (μιμούμενο την μονο-θεραπεία), και τα κύτταρα ανά πειραματική συνθήκη επεξεργάστηκαν περαιτέρω δια μέσου της τεχνικής MTT, με σκοπό τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση του βαθμού επιβίωσης (*survival*) αυτών στο κατά περίπτωση στρεσογόνο περιβάλλον του κάθε σκευάσματος πλατίνας. Όπως εμφανώς αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.9**, η Cisplatin αποδεικνύεται ότι μπορεί να δρα συγκριτικά ταχύτερα και περισσότερο αποτελεσματικά από τις Carboplatin και Oxaliplatin, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία σημαντική καθυστέρηση στον «χρονισμό» δράσης και εκδήλωσης της κυτταροτοξικής τους ενεργότητας, με την Carboplatin να αποτελεί το πλέον αργό και λιγότερο δραστικό εκ των τριών μέλος της οικογένειας των ενώσεων πλατίνας. Τα εν λόγω δεδομένα επιβεβαιώνουν σθεναρά ότι παρ' όλη την όποια -κατά περίπτωση αναφερθείσα- παράπλευρη τοξική δράση της Cisplatin, αυτή παραμένει ένα ισχυρό (αν όχι από τα ισχυρότερα) θεραπευτικό εργαλείο επιτυχούς αντιμετώπισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης όχι μόνο νέου τύπου χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων, αλλά και νέων τρόπων χορήγησης και στόχευσης των δραστικών ουσιών αυτών, με σκοπό την εκρίζωση του κακοήθους όγκου, χωρίς εμφάνιση ανθεκτικότητας, και τη -σύγχρονη- προστασία του υγιούς ιστού.



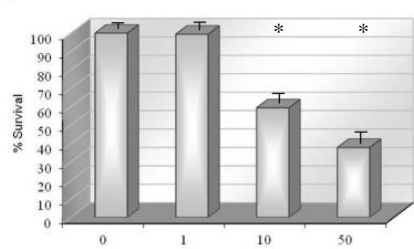
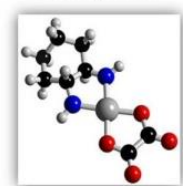
**Cisplatin**



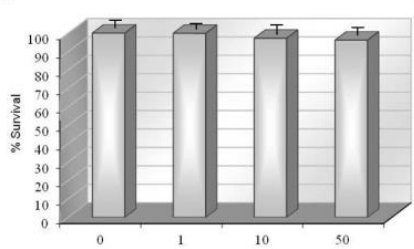
**Carboplatin**



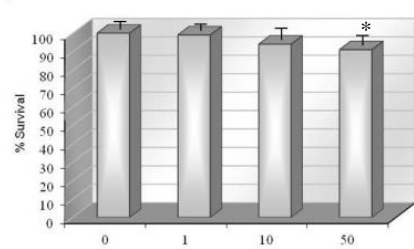
**Oxaliplatin**



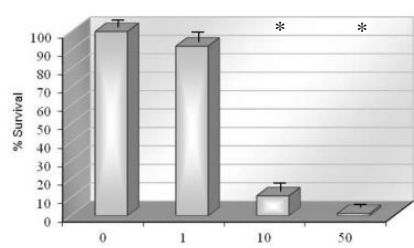
Cisplatin (µg/ml) (24h)



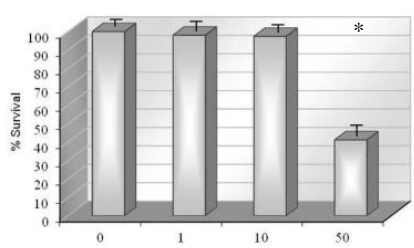
Carboplatin (µg/ml) (24h)



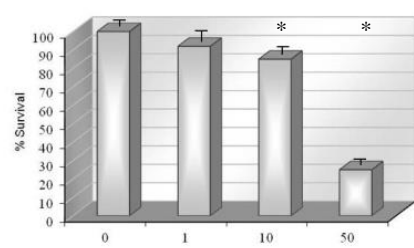
Oxaliplatin (µg/ml) (24h)



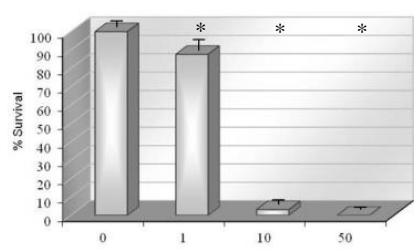
Cisplatin (µg/ml) (48h)



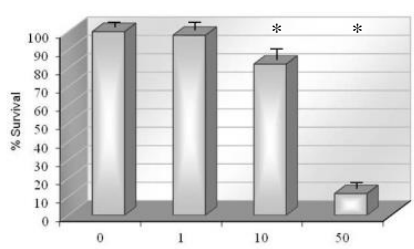
Carboplatin (µg/ml) (48h)



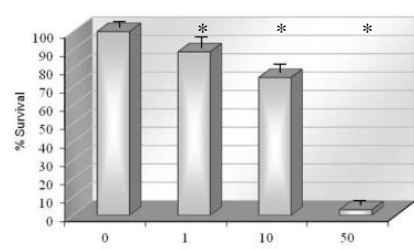
Oxaliplatin (µg/ml) (48h)



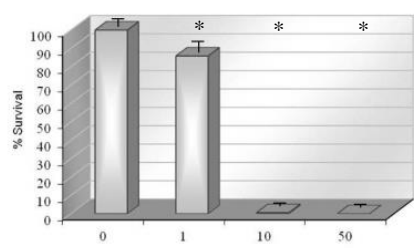
Cisplatin (µg/ml) (72h)



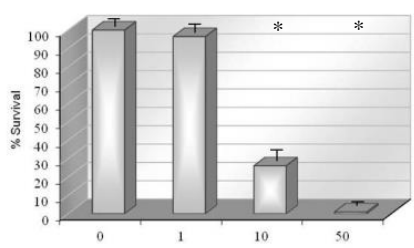
Carboplatin (µg/ml) (72h)



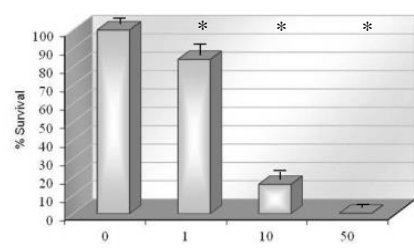
Oxaliplatin (µg/ml) (72h)



Cisplatin (µg/ml) (96h)



Carboplatin (µg/ml) (96h)



Oxaliplatin (µg/ml) (96h)

T24



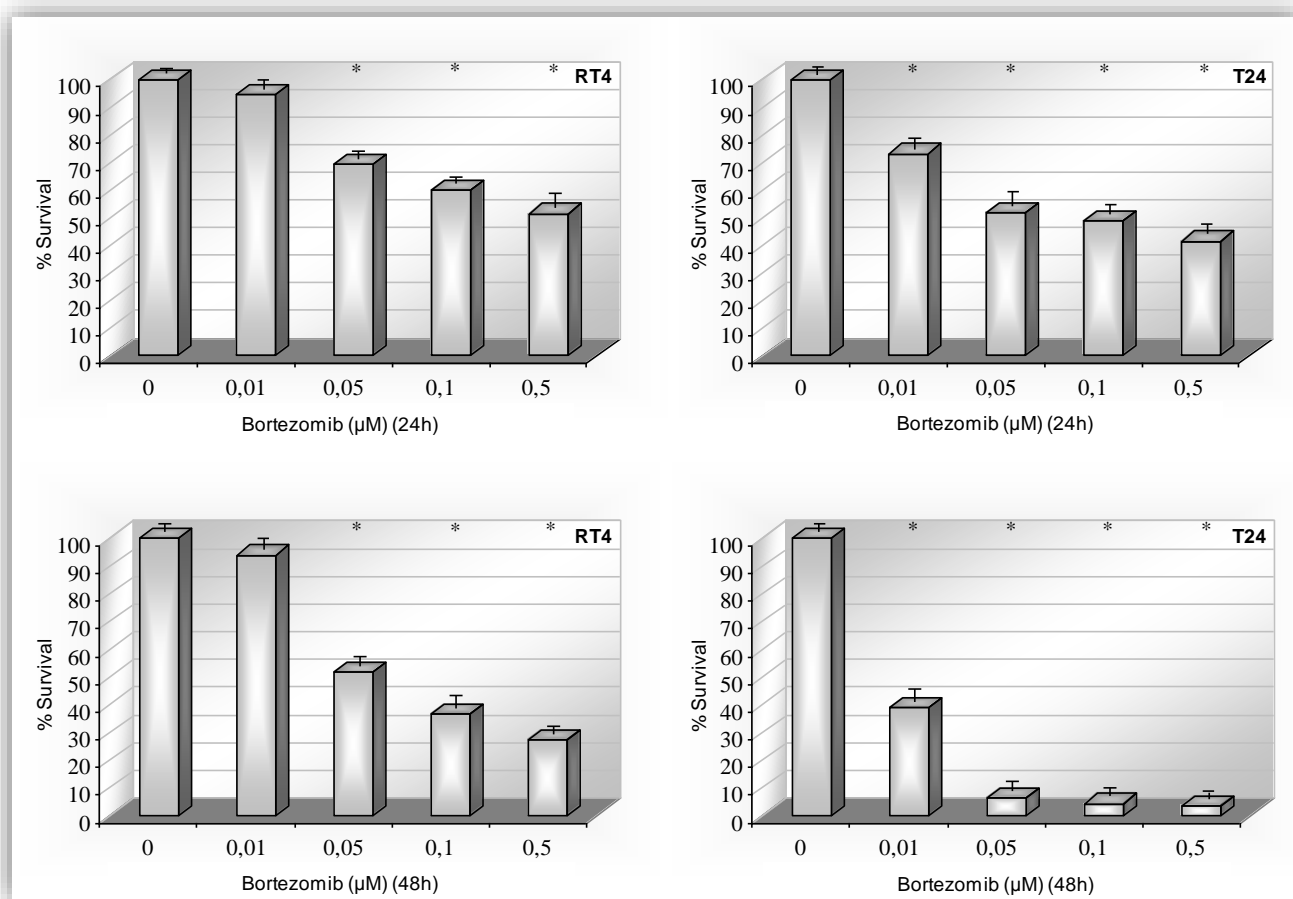
**Εικόνα 3.9** Φαρμακο-ειδική (*drug-specific*) κυτταροτοξικότητα, με εμφανή την διαφορική δράση των τριών υπό μελέτη σκευασμάτων πλατίνας (*Pt*) (Cisplatin, Carboplatin και Oxaliplatin) στα T24 (*grade III*) ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, όπως αποκαλύπτεται από την τεχνική MTT. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *grade*: βαθμός κακοήθειας, *h*: ώρες και *μg/ml*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (*2D*) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*) της εκάστοτε πειραματικής μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας, ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

## 3.2 Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη)

### 3.2.1 Επαγωγή κυτταροτοξικότητας μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στον αναστολέα του πρωτεασώματος Bortezomib: μία κυτταρο-ειδική απόκριση

Το ποσοστό βιωσιμότητας (% *Survival*) των υπό μελέτη ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης υπολογίστηκε με βάση την τεχνική προσέγγιση MTT, η οποία ανιχνεύει τους μεταβολικά ενεργούς κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως αυτοί αποκαλύπτονται από την ακεραιότητα ή μη της μιτοχονδριακής λειτουργίας (βλέπε *Υλικά και Μέθοδοι, Κεφάλαιο 2.2*). Ως εκ τούτου, RT4 και T24 κυτταρικά μονο-ταπήτια επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) και το ποσοστό κυτταρικής τοξικότητας (όπως αυτό προσδιορίστηκε με τον αντίστροφο δείκτη «% επιβίωση») υπολογίστηκε με βάση την προ-αναφερόμενη τεχνική MTT και την επακόλουθη στατιστική επεξεργασία των ληφθέντων αποτελεσμάτων. Όπως αποκαλύπτει η **Εικόνα 3.10**, το Bortezomib φαίνεται να επιδεικνύει μία δόσο-εξαρτώμενη (*dose-dependent*) κυτταροτοξική δράση, η οποία μεγιστοποιείται στις 48 ώρες επώασης και για τους δύο κυτταρικούς τύπους. Με ιδιαίτερο ενδιαφέρον

παρατηρείται ότι και στους δύο χρόνους λήψης των πειραματικών αποτελεσμάτων (24 και 48 ώρες), τα T24 κύτταρα εμφανίζονται πιο ευάλωτα στο κυτταροτοξικό δυναμικό του Bortezomib. Ειδικότερα, η φαρμακο-επαγόμενη (*drug-induced*) ευαισθησία τους φαίνεται να φτάνει στα μέγιστα επίπεδα στις 48 ώρες έκθεσης στο φάρμακο, συγκριτικά με την αντίστοιχη των RT4 κυττάρων, όπως για παράδειγμα υποδεικνύεται από τα ~0,5% και ~27,5% «μέσα» (*averaged*) ποσοστά επιβίωσης των T24 και RT4 κυττάρων που έχουν εκτεθεί στα 0,5  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται η ενδιάμεσου «χρονισμού» και κυτταρο-ειδικού τύπου ισχυρή τοξική ενεργότητα του Bortezomib σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης *in vitro*.



**Εικόνα 3.10** Κυτταροτοξική δράση του Bortezomib στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης RT4 και T24, όπως αποκαλύπτεται μέσω της MTT δοκιμασίας. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *h*: ώρες έκθεσης στο φάρμακο και  *$\mu\text{M}$* : συγκέντρωση

χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

### **3.2.2 Επαγωγή ενός Κασπασο-εξαρτώμενου προγράμματος αποπτωτικού θανάτου μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στο Bortezomib**

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των πρόδρομων (ανενεργών) μορφών και οι αντίστοιχες πρωτεολυτικά επεξεργασμένες (ενεργές) μορφές των κύριων Κασπασών, καθώς και των ομοειδών υποστρωμάτων αυτών, αναλύθηκαν σε συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης υπό την παρουσία του Bortezomib και διαδοχικά επεξεργάστηκαν μέσω της τεχνολογίας του ανοσο-στυπώματος Western. Πιο συγκεκριμένα, RT4 και T24 κυτταρικά μονοταπήτια επώαστηκαν για 24 ώρες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) και τα παρασκευασθέντα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, αφού διαχωρίστηκαν δια μέσου SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης, ηλεκτρο-μεταφέρθηκαν σε νιτροκυτταρίνη και επώαστηκαν με τα αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα (*primary antibodies*) που διαφαίνονται στην **Εικόνα 3.11**. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.11A**, το Bortezomib μπορεί και επάγει την δόσο-εξαρτώμενη πρωτεολυτική θραύση (*proteolytic cleavage*) των Κασπάση-8 (*Caspase-8*), Κασπάση-9 (*Caspase-9*), Κασπάση-3 (*Caspase-3*) και Κασπάση-7 (*Caspase-7*), αποτέλεσμα της οποίας είναι ο σχηματισμός των αντίστοιχων πρωτεϊνικών μορφών 43/41/18 kDa, 37/35/20 kDa, 19/17 kDa και 20 kDa, η παρουσία των οποίων αναμφισβήτητα καταδεικνύει την φαρμακο-επαγόμενη εμπλοκή ενός εξαρτώμενου από το ρεπερτόριο των Κασπασών (*Caspase repertoire*) προγράμματος κυτταρικού θανάτου τύπου απόπτωσης. Η ανάλυση των αποκτώμενων προφίλ πρωτεόλυσης υποδεικνύει την, εν γένει, μεγαλύτερη ευαισθησία των T24 συγκριτικά με τα RT4 κύτταρα στη δράση του φαρμάκου, όπως κυρίως τεκμηριώνεται από την ευπάθεια των πρώτων και την ανθεκτικότητα των δεύτερων στην αποπτωτική δραστηριότητα της χαμηλότερης εφαρμοζόμενης δόσης των 0,01  $\mu\text{M}$  του Bortezomib.

Η δοσο-εξαρτώμενη και κυτταρο-ειδική ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών επιβεβαιώνεται αδιαμφισβήτητα από την πρωτεολυτική επεξεργασία των ομοειδών τους υποστρωμάτων PARP και Lamin A/C, όπως αυτή αποκαλύπτεται από τον σχηματισμό των αντίστοιχων θραυσμάτων με κύρια μοριακά βάρη της τάξης των 89/53 kDa και 28 kDa. Τα αποκτώμενα πρωτεολυτικά πρότυπα αποδεικνύουν και πάλι την συγκριτικά υψηλότερη ευαισθησία των T24 κυττάρων στο αποπτωτικό δυναμικό του Bortezomib, δεδομένου ότι η χαμηλότερη δόση των 0,01  $\mu$ M δύναται να επάγει εκλεκτικά την φαρμακο-εξαρτώμενη πρωτεολυτική σχάση των PARP και Lamin A/C πυρηνικών αντιγόνων μόνο στα T24 αλλά όχι στα RT4 κύτταρα (**Εικόνα 3.11B**). Είναι λοιπόν σαφές ότι ο ειδικός αναστολέας του πρωτεασώματος Bortezomib μπορεί και προκαλεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης ενεργοποίηση τόσο του «εξωγενούς» [εξαρτώμενου από τους μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου (*membrane death receptors*)] όσο και του «ενδογενούς» (εξαρτώμενου από τη μιτοχονδριακή λειτουργία) μονοπατιού αποπτωτικού θανάτου, γεγονός που ελέγχεται καθοριστικά από τη φαρμακο-επαγόμενη πρωτεόλυση των Κασπάση-8 και Κασπάση-9, αντίστοιχα.

Αν και ο ICAD/DFP-45 αναστολέας της πυρηνικής DNάσης CAD/DFP-40 [*Inhibitor of CAD (Caspase-activated deoxyribonuclease)*] συνιστά ένα από τα κύρια υποστρώματα της ενεργού Κασπάσης-3, και χαρακτηριστικό στοιχείο ενός κλασικού προγράμματος απόπτωσης, στην περίπτωση της έκθεσης των RT4 και T24 κυττάρων στο Bortezomib δεν παρατηρήθηκε πρωτεόλυση της ενδογενούς άθικτης μορφής των 45/35 kDa, αλλά μία δοσο-εξαρτώμενη ισχυρή μειορρύθμιση (*downregulation*) των επιπέδων έκφρασης αυτής και στους δύο κυτταρικούς τύπους, ενδεχόμενο αποτέλεσμα της οποίας θα ήταν η απελευθέρωση και επακόλουθη ενεργοποίηση του υδρολυτικού δυναμικού της νουκλεάσης CAD. Αντίθετα, είναι εντυπωσιακό ότι η χορήγηση του Bortezomib στα RT4 και T24 κύτταρα προάγει τον πρωτεολυτικό σχηματισμό ενός θραύσματος της CAD DNάσης μοριακού βάρους της τάξης των ~35 kDa με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία. Το εν λόγω θραύσμα ενδέχεται είτε να κατέχει μία «αρνητικά κυρίαρχου» τύπου (*dominant negative*) ενεργότητα εις βάρος της δομικά ακέραιης CAD νουκλεάσης είτε μία συστατική (*constitutive*), μη-ελεγχόμενη και ιδιαίτερα υψηλή νουκλεολυτική δράση (συγκρινόμενη με αυτή της ανεπεξέργαστης CAD), με την δεύτερη πιθανότητα να θεωρείται συγκριτικά επικρατέστερη, δεδομένου του έντονου αποπτωτικού χαρακτήρα των εκτεθειμένων

στο φάρμακο κυττάρων. Το σενάριο αυτό συνάδει με την διαφορετική ευαισθησία των T24 (υψηλότερη) σε σχέση με τα RT4 κύτταρα, όπως αυτή εκρέει από την εμφάνιση του CAD πρωτεολυτικού θραύσματος των ~35 kDa στη δόση φαρμάκου των 0,05  $\mu$ M (**Εικόνα 3.11B**).

Δεδομένου ότι η εκτέλεση ενός επιτυχούς προγράμματος αποπτωτικού θανάτου εξαρτάται άμεσα από την συνισταμένη δράση των μεταξύ τους αντίρροπων προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μηχανισμών, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης κρίσιμων αντι-αποπτωτικών καθοριστών, των οποίων η ενδεχόμενη δυσλειτουργία δύναται να προάγει καθοριστικά τον αποπτωτικό φαινότυπο. Ως εκ τούτου, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT4 και T24 κυττάρων έπειτα από 24ωρη έκθεση αυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu$ M) υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης πρωτογενών αντισωμάτων με ειδική ικανότητα αναγνώρισης έναντι επιλεγμένων αντι-αποπτωτικών μορίων. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.11Γ**, οι κύριοι αποπτωτικοί αναστολείς και προστάτες της μιτοχονδριακής λειτουργίας Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub> παρουσιάζονται να μειορρυθμίζονται σθεναρά με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στα T24 αλλά όχι στα RT4 κύτταρα. Ειδικότερα, στα RT4 ανιχνεύεται μία ήπια μειορρύθμιση του Bcl-2 και μία αξιοπρόσεκτη επαγωγή, ειδικά στις ενδιάμεσες δόσεις φαρμάκου, του Bcl-X<sub>L</sub> πρωτεϊνικού μορίου με εν δυνάμει αντισταθμιστική (*counterbalanced*) δράση.

Στη συνέχεια, αναλύοντας το πρωτεϊνικό προφίλ έκφρασης και μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των τεσσάρων κύριων αναστολέων των Κασπασών XIAP, cIAP-1, Survivin και Livin, αποκαλύφθηκε η κατά περίπτωση διαφορετική απόκριση αυτών στη δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Συγκεκριμένα, η (24ωρη) έκθεση στο Bortezomib φάνηκε ικανή να προκαλεί έντονη μειορρύθμιση των XIAP συνολικών επιπέδων έκφρασης, συνοδευόμενη από ισχυρό και δοσο-εξαρτώμενο σχηματισμό ενός XIAP-προσομοιάζοντος (*XIAP-like*) πρωτεϊνικού μορίου με μοριακό βάρος της τάξης των ~65 kDa, και για τους δύο κυτταρικούς τύπους. Η εν λόγω πρωτεΐνη πιθανώς αντιπροσωπεύει μία μονο- ή δι-ουμπικουϊτινιωμένη μορφή, η οποία ενδεχομένως χαρακτηρίζεται από διαφορετική ενδοκυτταρική τοπολογία ή/και αποδυναμωμένη ικανότητα παρεμπόδισης της δράσης του ρεπερτορίου των Κασπασών. Εναλλακτικά, δεν θα μπορούσαν να αποκλειστούν και σενάρια είτε διακριτών μορφών μετα-μεταφραστικής τροποποίησης είτε

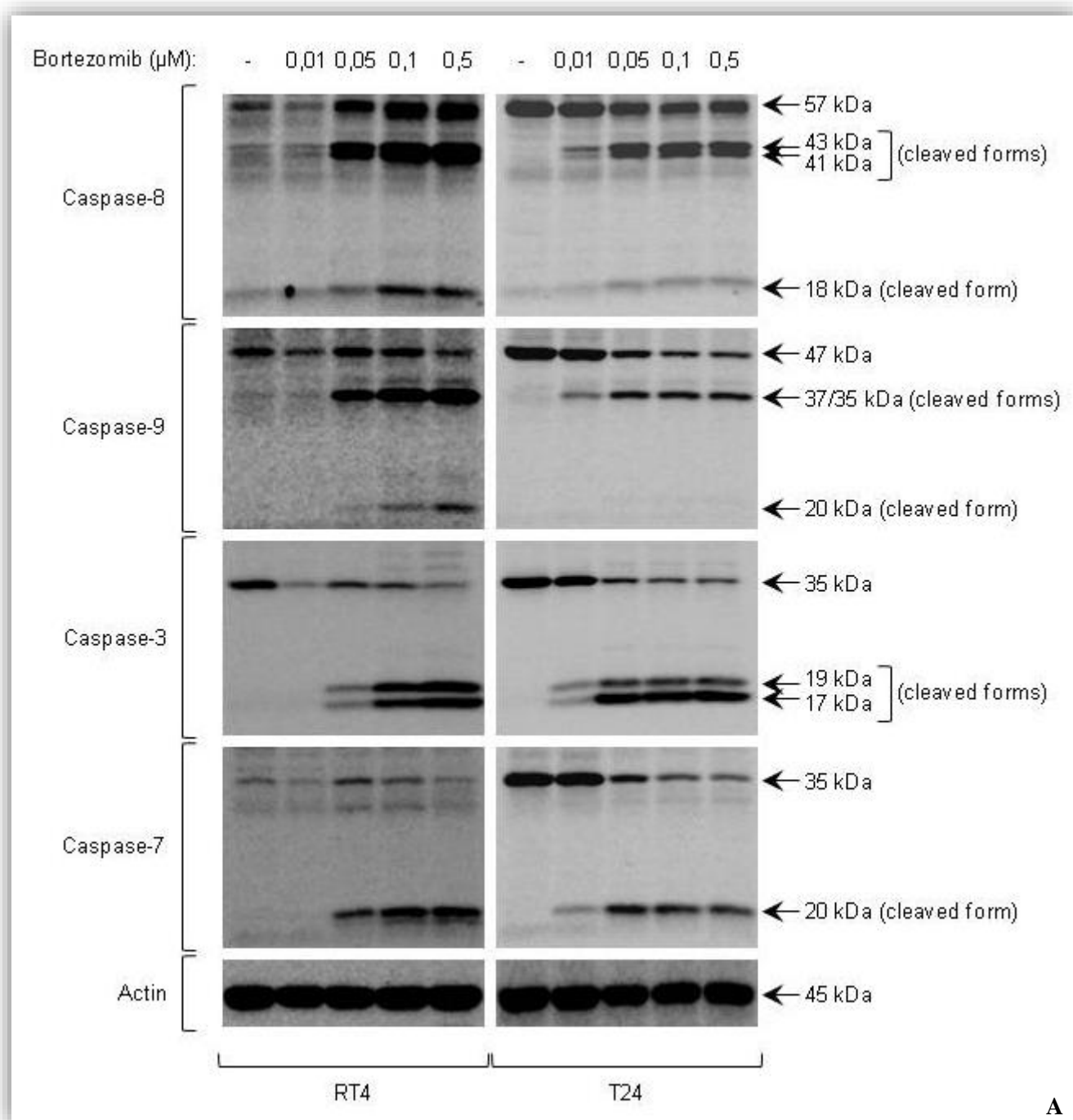
διαφορικού ματίσματος [*differential (alternative) splicing*], και τα δύο φαινόμενα ειδικά επαγόμενα από την τοξική δράση του φαρμάκου. Η εμφάνιση του ~65 kDa XIAP-like μορίου στα T24, αλλά όχι στα RT4 κύτταρα, μετά από επώαση αυτών με 0,01 μM φαρμάκου, ενδεικνύει την συγκριτικά μεγαλύτερη ευαισθησία των T24 και την ισχυρότερη δυναμική του αποπτωτικού τους μηχανισμού σε απόκριση στο Bortezomib (**Εικόνα 3.11Γ**).

Αντίθετα, ο cIAP-1 αναστολέας φαίνεται να επάγεται στα RT4, αλλά να μειώνεται στα T24 κύτταρα, με αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώνει την διαφορική δυναμική του φαρμάκου στα δύο υπό μελέτη κυτταρικά περιβάλλοντα. Παρ' όλα αυτά, στα RT4 ανιχνεύθηκε ένα φαρμακο-επαγόμενο πρωτεολυτικό θραύσμα μοριακού βάρους ~45 kDa άγνωστης λειτουργικής σημασίας. Το επεξεργασμένο αυτό προϊόν θα μπορούσε να κατέχει είτε μία συστατικώς (*constitutively*) υψηλή δραστικότητα αναστολής Κασπάσης είτε μία «αρνητικά επικρατή» (*dominant negative*) ενεργότητα (ή ακόμα και απώλεια λειτουργίας), με το πρώτο σενάριο να θεωρείται πιθανότερο λόγω του, εν γένει, ανθεκτικότερου χαρακτήρα των RT4 κυττάρων (**Εικόνα 3.11Γ**).

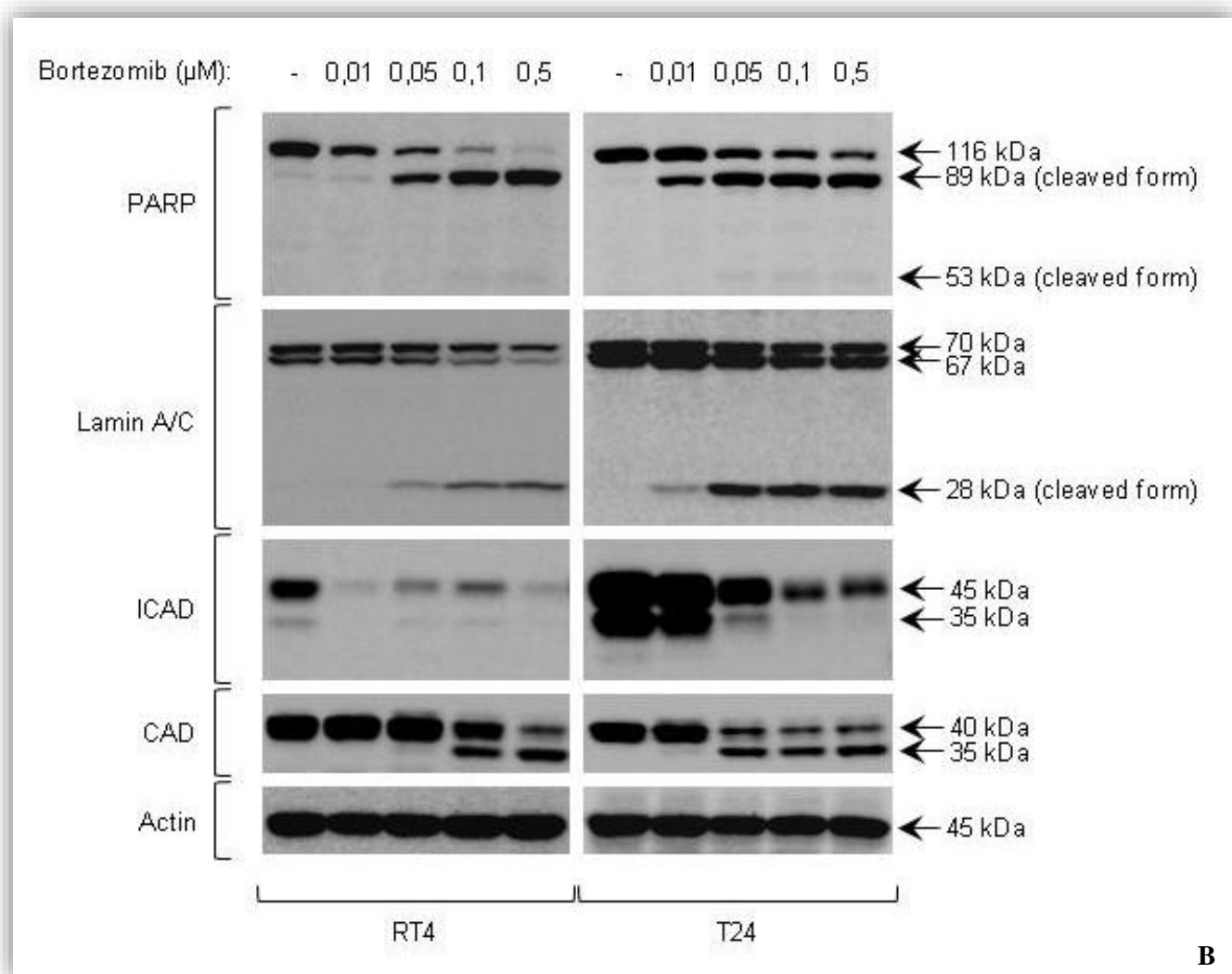
Η μελέτη του ειδικού αναστολέα της Κασπάσης-3, Survivin, αποκάλυψε την ικανότητα του Bortezomib να μειώνει δραστικά και με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τα επίπεδα έκφρασης αυτού στα RT4 κύτταρα μετά από έκθεση στο φάρμακο. Αντίθετα, τα T24 φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από μία ισχυρή αυξορρύθμιση της Survivin από την μικρότερη ήδη δόση των 0,01 μM. Είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος παρατήρηση η ισχυρή φαρμακο-εξαρτώμενη επαγωγή στα RT4 κύτταρα μίας Survivin-προσομοιάζουσας (*Survivin-like*) ζώνης μοριακού βάρους της τάξης των ~70 kDa, η οποία θα μπορούσε να προέρχεται είτε από μηχανισμούς πολυ-ουμπικουϊτίνωσης (~6 μόρια ουμπικουϊτίνης/Survivin) της πρωτεΐνης είτε από διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος του ομοειδούς γονιδιακού μεταγράφου. Σε αντιδιαστολή, το Survivin-like προϊόν στο T24 κυτταρικό περιβάλλον υπόκειται σε μία δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση, με ακριβώς αντίθετο από το αντίστοιχο των RT4 προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης (**Εικόνα 3.11Γ**). Είναι σαφές ότι για την αξιόπιστη συσχέτιση της εμπλοκής της Survivin στην διαφορική ευαισθησία των RT4 και T24 στο Bortezomib πρέπει να συνεκτιμηθούν και τα δύο πρωτεϊνικά πρότυπα έκφρασης που αφορούν στα Survivin και Survivin-like μόρια. Ως εκ τούτου, και χωρίς να αποκλείονται μηχανισμοί αντισταθμιστικής άμυνας (*counterbalanced*

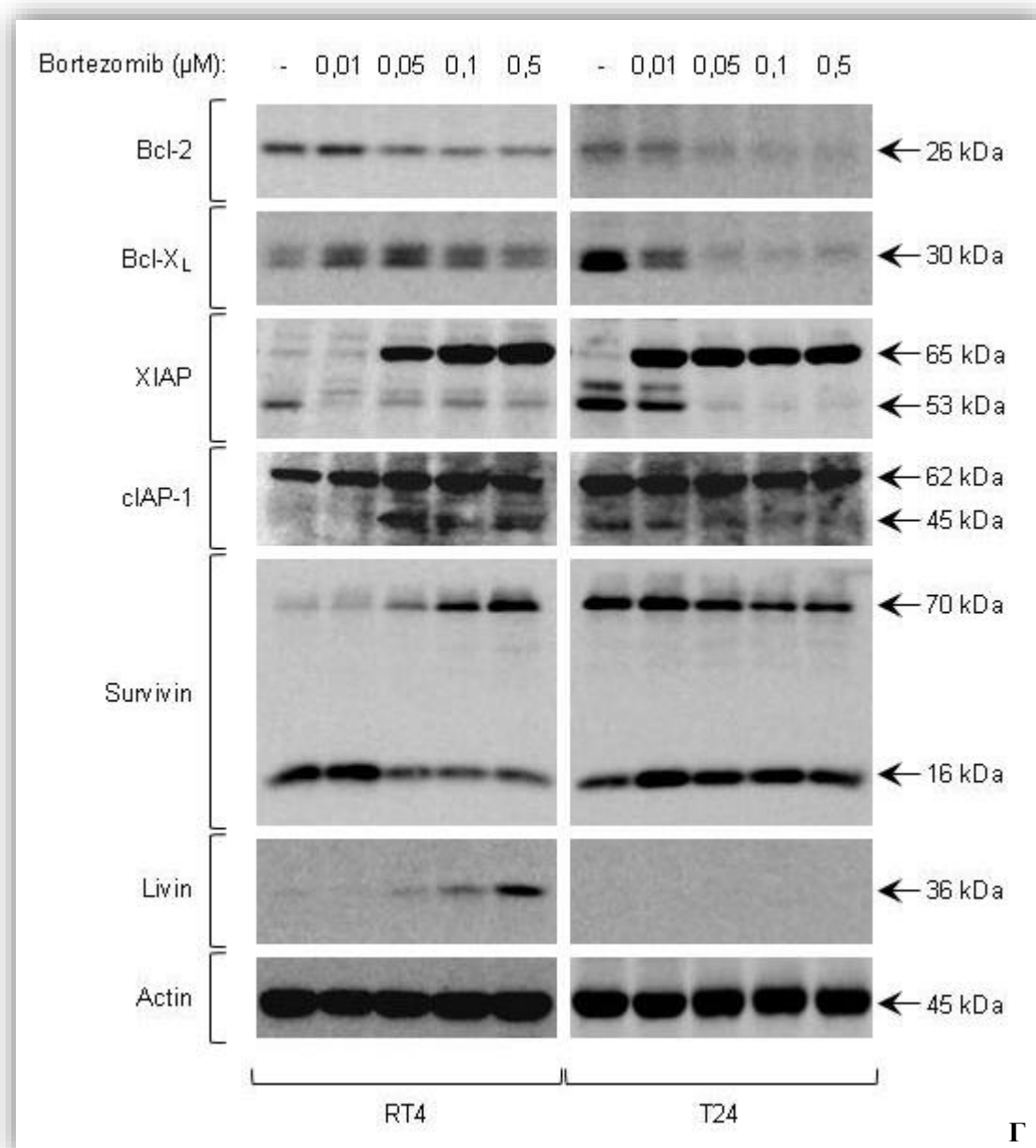
*defense*) των T24 στο φάρμακο, όπως θα δικαιολογούσε η αύξηση της Survivin σε αυτά, η Survivin-like πρωτεΐνη θα μπορούσε ενδεχομένως να εξοπλίσει τα RT4 κύτταρα με ένα σύστημα προστασίας που θα στοχεύει στην (έστω μερική) αναστολή της ενεργοποιημένης Κασπάσης-3, προάγοντας ως εκ τούτου την συγκριτικά υψηλότερη ανοχή αυτών στο Bortezomib.

Στην ίδια κατεύθυνση και στο πλαίσιο ενός γενικότερου αμυντικού μηχανισμού αποκαλύφθηκε ότι, σε αντίθεση με τα T24, τα RT4 κύτταρα είναι ικανά να επάγουν με έναν αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την πρωτεΐνη Livin, έναν άλλο ισχυρό αναστολέα των Κασπασών, επιβεβαιώνοντας έτσι το υψηλό συγκριτικό πλεονέκτημα των RT4 ως προς την τοξική δράση του φαρμάκου (**Εικόνα 3.11Γ**). Συμπερασματικά, λοιπόν, καταλήγουμε ότι τα RT4 πράγματι μπορούν και εκδηλώνουν μεγαλύτερη αντοχή στο Bortezomib μέσω μίας διακριτής κατά περίπτωση, αλλά συνολικά συνδυασμένης, εμπλοκής κρίσιμων αντι-αποπτωτικών καθοριστών, όπως οι Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, cIAP-1, Survivin και Livin αναστολείς των Κασπασών.









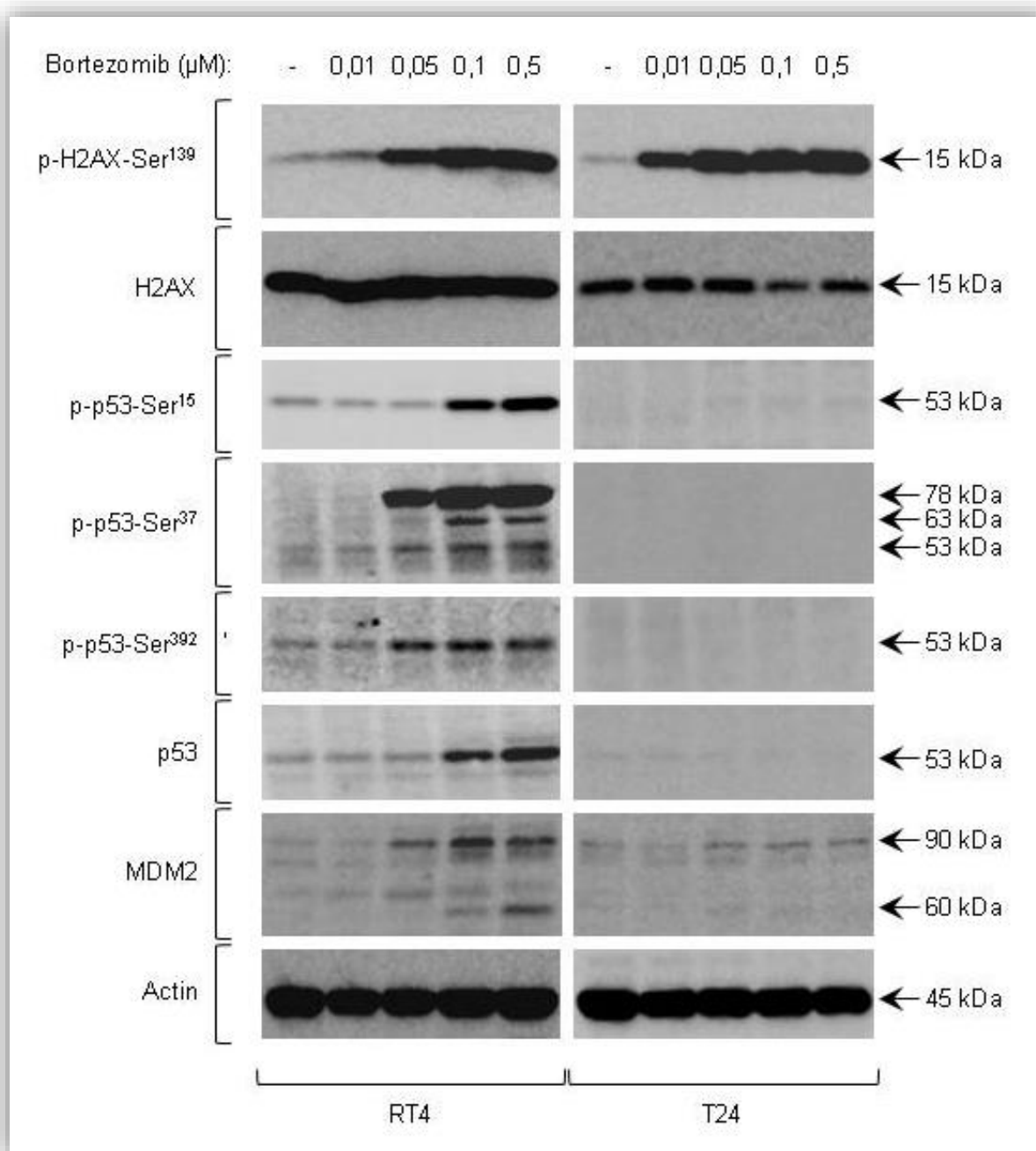
**Εικόνα 3.11** Ενεργοποίηση Κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης και κινητοποίηση προωθητικών και αντισταθμιστικών μηχανισμών έναντι αυτής, μετά από 24ωρη έκθεση των RT4 και T24 ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στο Bortezomib, όπως αποκαλύπτεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της εκάστοτε πρόδρομης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) μορφής, αν και όπου υπάρχει. (Α) Ρεπερτόριο Κασπασών, (Β) Υποστρώματα Κασπασών και (Γ) Αντι-αποπτωτικοί Ρυθμιστές. *Caspase*: Κασπάση, *cleaved form*: πρωτεολυμένη μορφή, *Actin*: Ακτίνη, *Lamin*: Λαμίνη και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.3 Απουσία καθοριστικής εμπλοκής του p53 μεταγραφικού παράγοντα στην προκαλούμενη από το Bortezomib γονιδιωματική τοξικότητα στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24

Με σκοπό την ανίχνευση γεγονότων αλλοίωσης της δομικής ακεραιότητας του γονιδιώματος κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου και την λειτουργική συσχέτιση αυτών με φαινόμενα επαγωγικής ενεργοποίησης της p53 πρωτεΐνης, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από RT4 και T24 κύτταρα, επωασμένα για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) Bortezomib, επεξεργάστηκαν δια μέσου ανοσο-στυπώματος Western, χρησιμοποιώντας ειδικά πρωτογενή αντισώματα που αναγνωρίζουν εκλεκτικά τους γενοτοξικούς δείκτες (*genotoxic markers*) H2AX και p53, καθώς και τις φωσφορυλιωμένες μορφές αυτών. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.12**, η έκθεση στο φάρμακο έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή και δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της H2AX φωσφορυλιωμένης μορφής, p-H2AX-Ser<sup>139</sup>, και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με τα T24 να αποδεικνύονται περισσότερο ευάλωτα από τα RT4, όπως εμφανώς αποκαλύπτεται από τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτης φωσφο-πρωτεΐνης (*phospho-protein*) στις δόσεις φαρμάκου των 0,01 και 0,05  $\mu\text{M}$ . Ως εκ τούτου, και δεδομένου ότι ο βαθμός φωσφορυλίωσης της H2AX ιστόνης (Ser<sup>139</sup>) αντανακλά άμεσα το ποσοστό δημιουργίας δίκλωνων DNA θραυσμάτων, είναι πλέον σαφές ότι η εκ του Bortezomib προκαλούμενη αναστολή δράσης του πρωτεασώματος δύναται να προκαλεί υψηλά επίπεδα γονιδιωματικής καταστροφής και αστάθειας. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώνεται η συγκριτικά υψηλότερη ανθεκτικότητα των RT4 ως προς τα T24 κύτταρα στη δράση του φαρμάκου.

Με βάση τον ευρέως αποδεκτό ρόλο του p53 μεταγραφικού παράγοντα (*transcription factor*) ως «φύλακα-προστάτη» (*guardian*) της δομικής ακεραιότητας του γονιδιώματος και ως βασικού μοριακού αισθητήρα (*molecular sensor*) μίας πληθώρας γονιδιακών αλλοιώσεων (*lesions*), συμπεριλαμβανομένων ακόμα και μικρής εμβέλειας δίκλωνων DNA θραυσμάτων, εξετάστηκαν τόσο τα βασικά όσο και τα αντίστοιχα φωσφορυλιωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 ως απάντηση στο φάρμακο. Σε αντίθεση με τα T24, τα οποία, ενδεχομένως λόγω της μεταλλαγμένης p53 μορφής τους ( $\Delta\text{Y}^{126}$ ), φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από μία παντελή αδυναμία απόκρισης στο Bortezomib, τα RT4 κύτταρα αποδείχθηκαν ικανά να επάγουν ισχυρά

τόσο τα συνολικά επίπεδα έκφρασης της p53 όσο και αυτά της p-p53-Ser<sup>15</sup> φωσφορυλιωμένης ισομορφής. Σε συμφωνία, η p53 αποκαλύφθηκε ότι μπορούσε επίσης να φωσφορυλιωθεί και στις θέσεις των κρίσιμων αμινοξικών καταλοίπων σερίνη 392 (*p-p53-Ser<sup>392</sup>*) και σερίνη 37 (*p-p53-Ser<sup>37</sup>*), πιθανώς προσδίδοντας επιπρόσθετες λειτουργίες στο μόριο. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η παρατήρηση ότι οι δόσεις φαρμάκου των 0,05, 0,1 και 0,5 μM προκαλούν την ισχυρή επαγωγή ενός νέου p-p53-Ser<sup>37</sup>-προσομοιάζοντος (*p-p53-Ser<sup>37</sup>-like*) μορίου με μοριακό βάρος ~78 kDa άγνωστης ενεργότητας. Το εν λόγω προϊόν (όπως πιθανότατα και η διακριτή φαρμακο-επαγόμενη πρωτεΐνη των ~63 kDa) θα μπορούσε να σχηματιστεί μέσω είτε ενός μηχανισμού πολυ-ουμπικουϊτινίωσης (~3 μόρια ουμπικουϊτίνης/p-p53-Ser<sup>37</sup>) είτε μίας διαδικασίας εναλλακτικού ματίσματος και επακόλουθης φωσφορυλίωσης στη θέση σερίνη 37. Η φωσφορυλίωση της p53 προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση της μεταγραφικής της δραστηριότητας, όπως εμφανώς αποκαλύπτεται από την φαρμακο-ειδική και δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή του MDM2 γονιδιακού προϊόντος (ανάδρομου αρνητικού ρυθμιστή) στα RT4 (φυσικού τύπου p53) αλλά όχι στα T24 (μεταλλαγμένου τύπου p53) κύτταρα (**Εικόνα 3.12**). Συμπερασματικά, διαφαίνεται ότι ενώ το Bortezomib έχει την ικανότητα να επάγει ισχυρά φαινόμενα γονιδιωματικού στρες σε κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου ουροδόχου κύστης, δεν απαιτεί ως κρίσιμο καθοριστή την εμπλοκή μηχανισμών που αφορούν στην ενεργοποίηση των p53-εξαρτώμενων μονοπατιών σηματοδότησης.

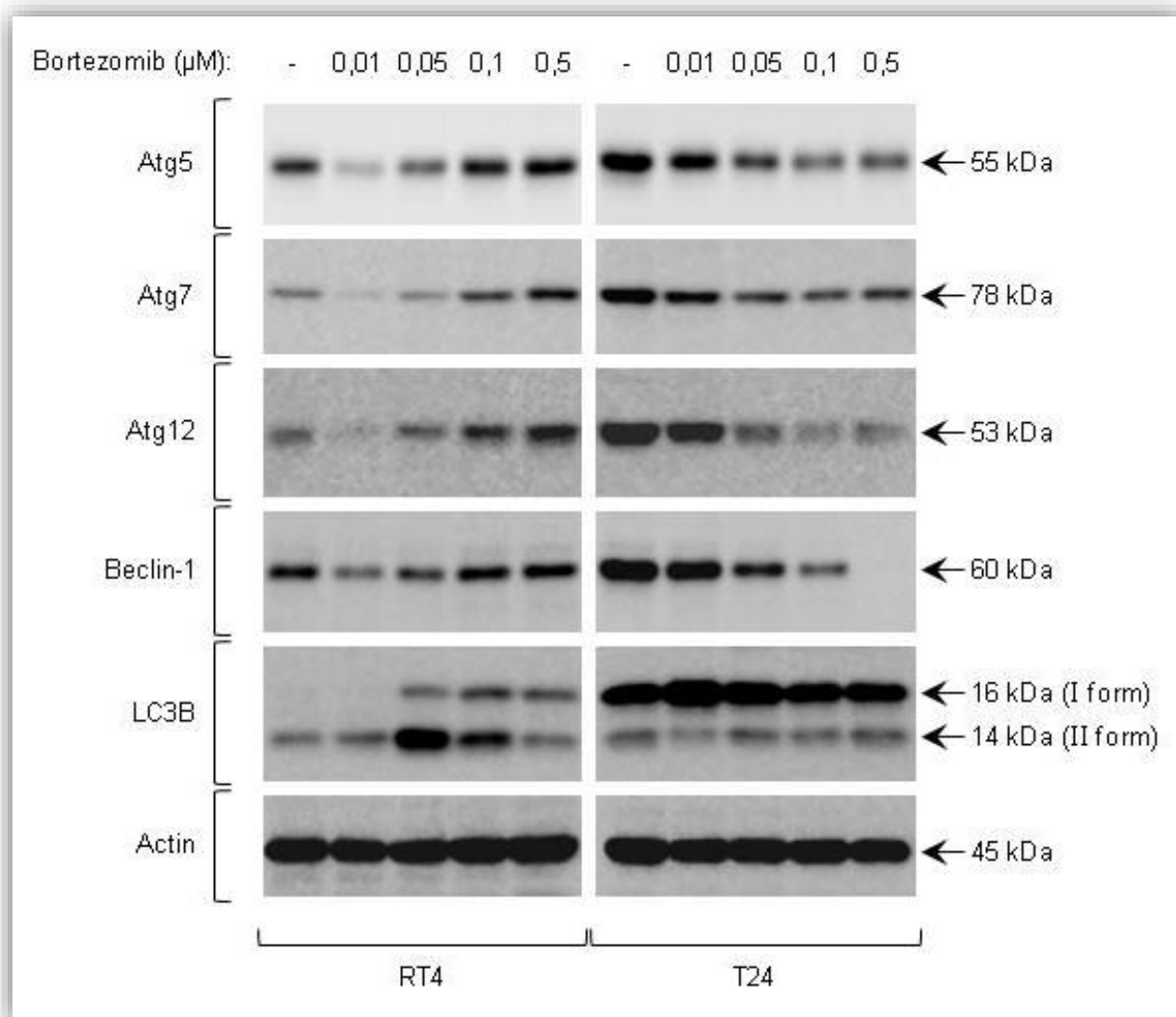


**Εικόνα 3.12** p53-ανεξάρτητη επαγωγή γονιδιωματικής τοξικότητας από το Bortezomib (24 ώρες) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT4 και T24, όπως διαφαίνεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *p*:- φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Actin*: Ακτίνη και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.4 Ο διττός ρόλος της αυτοφαγίας στην κυτταροτοξική δράση του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο των RT4 και T24 κυττάρων

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ακριβής ρόλος του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τύπου αυτοφαγίας (*autophagy*) και δεδομένης της δυνατότητας αυτού να συμμετέχει είτε ως προωθητικός είτε ως ανασταλτικός μηχανισμός στην φαρμακο-επαγόμενη τοξικότητα ενός κυτταρικού συστήματος, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των κρίσιμων καθοριστών της βιογένεσης ενός τυπικού αυτοφαγοσώματος (*autophagosome*) Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1 και LC3B I/II. Ως εκ τούτου, RT4 και T24 κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) Bortezomib και τα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επεξεργάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων έναντι των προ-αναφερόμενων αυτοφαγικών πρωτεϊνών. Όπως αποκαλύπτει η **Εικόνα 3.13**, στα RT4 παρατηρήθηκε μία ισχυρή αυξορρύθμιση (*upregulation*) της LC3B II ισομορφής στη δόση των 0,05  $\mu\text{M}$  (αλλά και σε αυτήν των 0,1  $\mu\text{M}$ ), ενώ παρ' όλη την ήπια μειορρύθμιση των υπόλοιπων τεσσάρων αυτοφαγικών συστατικών στα 0,01  $\mu\text{M}$ , η έκθεση στο φάρμακο οδήγησε σε μία εμφανή δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή των επιπέδων έκφρασης αυτών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις Atg5, Atg7 και Atg12. Αντίθετα, τα T24 κύτταρα παρουσιάστηκαν με πολύ υψηλά επίπεδα συστατικού (*constitutive*) αυτοφαγικού περιεχομένου, τα οποία ακολούθησαν ισχυρά προφίλ μειορρύθμισης (*downregulation*) για όλες τις αυτοφαγικές πρωτεΐνες με εξαίρεση την LC3B (I/II ισομορφές). Αποδεικνύεται, λοιπόν, η διαφορετική λειτουργική σημασία της αυτοφαγίας στην επιβίωση των κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης όσο και σε αυτές επαγώγιμου στρες (*inducible stress*). Ειδικότερα, είναι πιθανόν ότι όταν η σημαντική για την επιβίωση των T24 κυττάρων αυτοφαγική δραστηριότητα, πρόσφατα αποκαλούμενη ως «αυτοφαγικός εθισμός» (*autophagy addiction*), καταστέλλεται [για παράδειγμα, μέσω έκθεσης στο Bortezomib (**Εικόνα 3.13**)], τα κύτταρα υπόκεινται σε διαδικασίες θανάτου, μέσω συσσώρευσης γηρασμένων ή λειτουργικά προβληματικών οργανιδίων (για παράδειγμα, ριβοσωμάτων και μιτοχονδρίων) και πρωτεϊνών. Αντίθετα, στα RT4 κύτταρα, όπου η αυτοφαγία δεν φαίνεται να παίζει ρόλο σε συνθήκες ηρεμίας, αλλά

μόνο σε καταστάσεις υψηλού στρες, όπως αυτού που προκαλείται από την παρουσία του Bortezomib, αυτή δύναται να υπερ-δραστηριοποιείται και να εξοντώνει εσωτερικά (μέσω «υπερ-αυτοφαγίας») ακόμα και υγιή κυτταρικά συστατικά και περιεχόμενα, οδηγώντας τελικά, πάλι, τα κύτταρα στο θάνατο. Είναι, δηλαδή, το ιδιαίτερο κατά περίπτωση κυτταρικό περιβάλλον αυτό που ρυθμίζει καθοριστικά την διακριτή, επαγόμενη (RT4) ή καταστέλλόμενη (T24), δράση της αυτοφαγίας στην φαρμακο-επαγόμενη καταστροφή του ανθρώπινου καρκινικού ουροθηλίου.



**Εικόνα 3.13** Διαφορική έκφραση αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα κυτταρικά περιβάλλοντα των RT4 και T24 ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης υπό την 24ωρη δράση του Bortezomib, μετά από εφαρμογή της τεχνολογίας του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση αυτοφαγικών πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *form*: ισομορφή, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.5 Κυτταρο-ειδική απορρύθμιση της λειτουργικής ακεραιότητας σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου RT4 και T24 ως απόκριση στη δράση του Bortezomib

Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου επιλεγμένων σηματοδοτικών δικτύων (*signaling networks*) του κινώματος (*kinome*) στην φυσιολογική λειτουργία πλήθους κυτταρικών διαδικασιών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την κυτταρική επιβίωση, τον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση ή/και αυτοφαγία), τον κυτταρικό μεταβολισμό, την ενεργειακή ομοιόσταση και την απόκριση στο στρες, μελετήθηκαν τόσο τα συνολικά όσο και τα αντίστοιχα φωσφορυλιωμένα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων κινασών (*kinases*) καρκινικών ουροθηλιακών κυττάρων αναπτυγμένων *in vitro* υπό την επίρεια του Bortezomib. Ως εκ τούτου, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, προερχόμενα από RT4 και T24 κύτταρα μετά από 24ωρη έκθεση αυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) Bortezomib, επεξεργάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια σύνδεσης και ικανότητα αναγνώρισης των Akt, GSK-3 $\beta$ , p44/42 MAPK, p38 MAPK, AMPK $\alpha$  και IKK $\alpha$  κινασών σερίνης/θρεονίνης (*Ser/Thr kinases*), καθώς και των ομοειδών φωσφορυλιωμένων τους μορφών. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.14A**, ενώ τα T24 κύτταρα χαρακτηρίζονται από δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των συνολικών επιπέδων έκφρασης της Akt πρωτεΐνης, τα RT4 ανιχνεύονται με εμφάνιση δύο φαρμακο-επαγόμενων ισχυρών προτεολυτικών θραυσμάτων μοριακού βάρους  $\sim 40$  kDa στις δόσεις των 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ . Τα εν λόγω πρωτεϊνικά προϊόντα, ενδεχομένως προερχόμενα από έναν Κασπασο-εξαρτώμενο προτεολυτικό μηχανισμό, χωρίς να αποκλείεται το εναλλακτικό σενάριο του διαφορικού ματίσματος, δύνανται είτε να φέρουν «αρνητικά επικρατείς» ενεργότητες ως προς την ενδογενή Akt κίνηση, είτε συστατικώς υψηλή δραστηριότητα κίνησης χωρίς ελεγχόμενη ρύθμιση και ειδικότητα αναγνώρισης υποστρώματος. Με ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρατηρείται ότι η συστατικώς ανιχνεύσιμη p-Akt-Ser<sup>473</sup> φωσφορυλιωμένη μορφή στα T24 κύτταρα, η οποία πιθανότατα συσχετίζεται με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και μεταστατικότητας αυτών, μειορρυθμίζεται ισχυρά ακολουθώντας ένα αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο προφίλ, με τρόπο που να ενισχύει το σενάριο εκείνο που θα απαιτούσε



την Akt κινάση ως έναν θεμελιώδη καθοριστή στον προκαλούμενο από το Bortezomib κυτταρικό θάνατο.

Αντίθετα, η GSK-3β κινάση, ένα από τα χαρακτηριστικότερα υποστρώματα της Akt κινάσης, ενώ εμφανίζεται ουσιαστικά ανεπηρέαστη τόσο ως προς τα συνολικά, όσο και ως προς τα φωσφορυλιωμένα στη θέση σερίνη 9 (*Ser*<sup>9</sup>) επίπεδα αυτής στα T24, αποκαλύπτεται να υιοθετεί ένα ισχυρό πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης αυξορρύθμισης των φωσφορυλιωμένων p-GSK-3β-*Ser*<sup>9</sup>, καθώς και των συνολικών πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης στα RT4 κύτταρα. Οι χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες των περίπου 42 kDa και 38 kDa, ενδεχομένως προερχόμενες από μία φαρμακο-επαγόμενη διαδικασία πρωτεολυτικής θραύσης ή εναλλακτικού ματίσματος, ειδικά στα RT4 κύτταρα, είναι πιθανόν να περιέχουν είτε «αρνητικά επικρατούς» τύπου είτε υψηλώς συστατικές και μη-ρυθμιζόμενες ενεργότητες κινάσης σερίνης/θρεονίνης (**Εικόνα 3.14A**).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διακριτές φαρμακο-εξαρτώμενες συμπεριφορές και των δύο p44/42 και p38 μελών της MAPK οικογένειας κινασών στους δύο διαφορετικού βαθμού κακοήθειας και *p53* γενετικού υποβάθρου RT4 και T24 κυτταρικούς τύπους. Η **Εικόνα 3.14B** αποκαλύπτει ότι η 24ωρη δράση του Bortezomib σε RT4 μονο-ταπήτια καρκινικού ουροθηλίου προκαλεί την ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή τόσο των συνολικών όσο και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων (*p-p44/42 MAPK-Thr*<sup>202</sup>/*Tyr*<sup>204</sup> και *p-p38 MAPK-Thr*<sup>180</sup>/*Tyr*<sup>182</sup>) μορφών των p44/42 MAPK και p38 MAPK κινασών σερίνης/θρεονίνης, γεγονός που πιθανότατα συσχετίζεται με το συγκριτικά υψηλότερο πλεονέκτημα επιβίωσης των εν λόγω κυττάρων ως προς τα T24 στην τοξική δράση του φαρμάκου. Αντίθετα, στα T24 κύτταρα, ενώ τα συνολικά επίπεδα έκφρασης των p44/42 MAPK και p38 MAPK πρωτεϊνών ακολουθούν ένα δοσο-ειδικό προφίλ μειορρύθμισης ως απάντηση στο φάρμακο, οι αντίστοιχες φωσφορυλιωμένες τους μορφές για τις p44/42 MAPK εμφανίζονται ανεπηρέαστες, ενώ για την p38 MAPK παρατηρείται φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμιση από την χαμηλότερη (0,01 μM) κιάλας συγκέντρωση Bortezomib. Είναι εντυπωσιακό ότι ενώ στα RT4 κύτταρα οι υπό μελέτη συνολικές και φωσφορυλιωμένες MAPK πρωτεΐνες επάγονται ισχυρά στο προκαλούμενο από το Bortezomib στρες, στα T24 κύτταρα τα συνολικά επίπεδα έκφρασης αυτών αποδεικνύονται ιδιαίτερα ευάλωτα στη δραστηριότητα του φαρμάκου, σε πλήρη αντιδιαστολή με την εντυπωσιακά υψηλή ανθεκτικότητα των ομοειδών

φωσφορυλιωμένων τους μορφών, όπως αυτή ανιχνεύεται στα ανεπαρκή περιβάλλοντα πρωτεασωμικής λειτουργίας που διαμορφώνει το Bortezomib.

Είναι πραγματικά εντυπωσιακό ότι σε συνθήκες απουσίας στρες (0  $\mu$ M φαρμάκου) τα T24 παρουσιάζονται με πολύ υψηλότερα συστατικά επίπεδα έκφρασης των φωσφορυλιωμένων Akt, GSK-3 $\beta$ , p44/42 MAPK και p38 MAPK κινασών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα των RT4 κυττάρων, γεγονός που συνδέεται σθεναρά με τον βαθμό κακοήθειας και μεταστατικότητας αυτών (T24) και αποκαλύπτει την ύπαρξη ενός ισχυρού μηχανισμού «σηματοδοτικού εθισμού» (*signaling addiction*) σε επιλεγμένα δίκτυα κινασών.

Παρόμοιες κυτταρο-ειδικές διαφορές της AMPK $\alpha$  κινάσης σερίνης/θρεονίνης, ενός θεμελιώδους μοριακού αισθητήρα της ενεργειακής επάρκειας σε ATP του κυττάρου, διαφάνηκαν να υπάρχουν ανάμεσα στα RT4 και T24 μετά από 24ωρη έκθεση αυτών στο Bortezomib. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.14B**, τα RT4 κύτταρα μπορούν και αυξορρυθμίζουν σημαντικά τα συνολικά επίπεδα της AMPK $\alpha$ , με σύγχρονη παραγωγή ενός μικρότερου μοριακού βάρους (~58 kDa) πρωτεϊνικού προϊόντος, ακολουθώντας ένα αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο πρότυπο. Η εν λόγω AMPK $\alpha$ -προσομοιάζουσα (AMPK $\alpha$ -like) μορφή θα μπορούσε να προέρχεται από διαδικασίες φαρμακο-επαγόμενης πρωτεόλυσης ή διαφορικού ματίσματος. Η αντίστοιχη p-AMPK $\alpha$ -Thr<sup>172</sup> φωσφορυλιωμένη μορφή, η οποία αντανάκλα και την γενική ενεργότητα του ενζύμου, αν και χαρακτηρίζεται από συγκριτικά αποδυναμωμένα επίπεδα επαγωγής, φαίνεται πάλι να ακολουθεί παρόμοια -με τα συνολικά- προφίλ σχηματισμού του AMPK $\alpha$ -like μορίου, γεγονός που αποδεικνύει ότι η φωσφορυλίωση στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνη 172 (Thr<sup>172</sup>) δεν μπορεί να αποτελέσει μηχανισμό προστασίας έναντι του σχηματισμού του μικρότερου μοριακού μεγέθους μορίου. Το εν λόγω μόριο θα μπορούσε είτε να καταστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της ενδογενούς και άθικτης AMPK $\alpha$  κινάσης μέσω ενός «αρνητικά κυρίαρχου» μηχανισμού είτε να διαθέτει μία υψηλώς συστατική και μη-ρυθμιζόμενη δράση κινάσης. Σε αντιδιαστολή, τα εκτιθέμενα στο Bortezomib T24 κύτταρα φαίνεται πως μειορρυθμίζουν με έναν αξιοσημείωτο τρόπο τόσο τα συνολικά όσο και τα φωσφορυλιωμένα (p-AMPK $\alpha$ -Thr<sup>172</sup>) επίπεδα έκφρασης της AMPK $\alpha$  πρωτεΐνης, γεγονός που εμφανίζεται να της αποδίδει έναν διακριτό ρόλο, ανάλογα με το κυτταρικό περιεχόμενο του κάθε κακοήθους τύπου κυττάρου, στην απόκριση ως προς την τοξική δράση του φαρμάκου. Επιπρόσθετα, είναι σαφές ότι σε

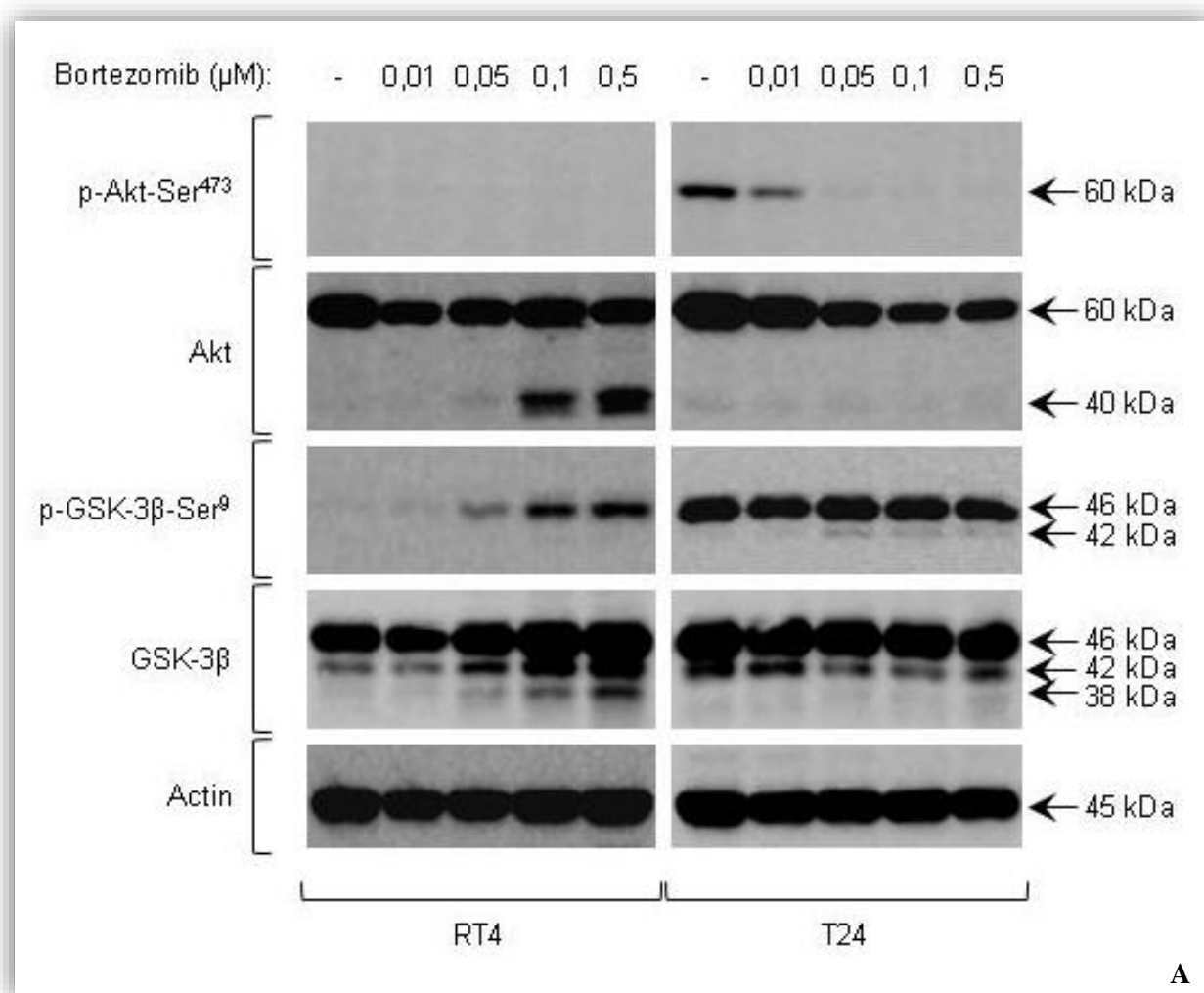
αντιδιαστολή με τις MAPK κινάσες, η φωσφορυλίωση της AMPKα στη θρεονίνη 172 αδυνατεί να της προσφέρει συγκριτικό πλεονέκτημα ανθεκτικότητας εντός του, από το Bortezomib προκαλούμενου, T24 τοξικού περιβάλλοντος.

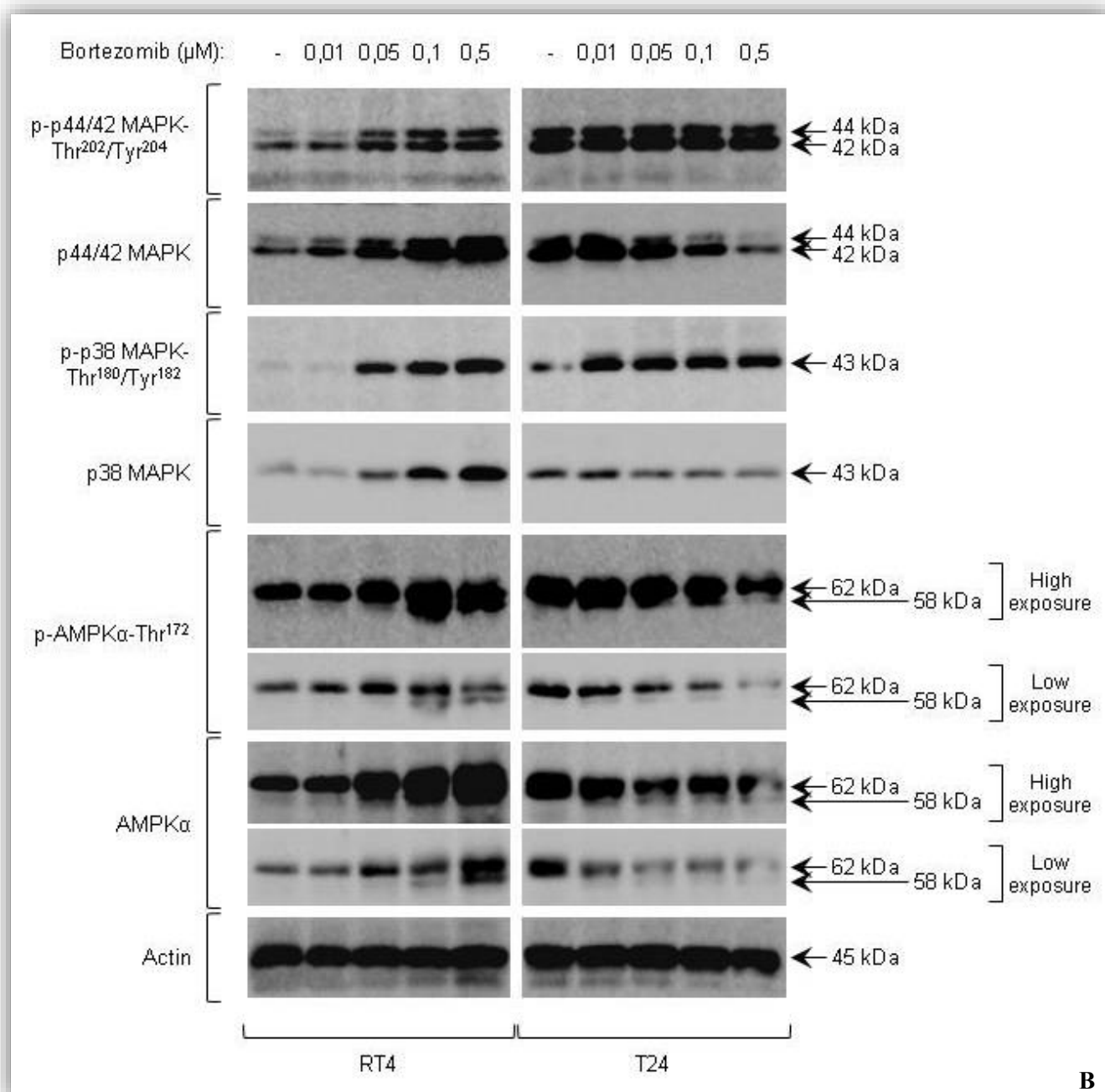
Ένα από τα καλύτερα μελετημένα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχονται από τη λειτουργία του πρωτεασώματος είναι αυτό του NFκB μεταγραφικού παράγοντα. Συνήθως, ο NFκB, στην διμερή του μορφή, εντοπίζεται σε σύμπλεγμα με τον ομοειδή του αναστολέα IκB στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου σε συνθήκες ηρεμίας. Παρουσία στρεσογόνου παράγοντα (TNFα) παρατηρείται απελευθέρωση του NFκB από το NFκB/IκB ανασταλτικό σύμπλεγμα, και ενεργοποίηση του μεταγραφικού δυναμικού αυτού, δια μέσου της επαγόμενης από το στρες φωσφορυλίωσης του IκB, διαδοχικής ουμπικουϊνίωσης και τελικής στόχευσης αυτού προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου των ανωροϊκών (*upstream*) κινασών IKK στη φωσφορυλίωση του IκB, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από RT4 και T24 κύτταρα, έπειτα από 24ωρη έκθεση αυτών σε διαφορετικές δόσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 μM) Bortezomib, υποβλήθηκαν σε ανοσο-στύπωμα Western μέσω της χρήσης ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τους IKKα, IκBa και IκBβ κρίσιμους καθοριστές σηματοδότησης. Η **Εικόνα 3.14Γ** αποκαλύπτει την ισχυρή δόσο-εξαρτώμενη παραγωγή δύο IKKα-προσομοιαζόντων (*IKKα-like*), μικρότερου μοριακού βάρους, πρωτεϊνών ~80 kDa και ~45 kDa αντίστοιχα, στα RT4 κύτταρα, οι οποίες δημιουργούνται από την φαρμακο-επαγόμενη ενεργοποίηση ενός μηχανισμού πρωτεολυτικής υδρόλυσης ή εναλλακτικού ματίσματος. Αντίθετα, η χορήγηση του φαρμάκου στα T24 οδηγεί σε αξιοσημείωτη μειορρύθμιση της πρόδρομης μορφής (85 kDa), συνοδευόμενη από δόσο-εξαρτώμενο σχηματισμό μόνο του IKKα-like των ~45 kDa μοριακού θραύσματος. Τα νέα φαρμακο-επαγόμενα προϊόντα θα μπορούσαν είτε να καταστέλλουν την ενδογενή ενεργότητα της IKKα κινάσης, μέσω ενός «αρνητικά επικρατούς» μηχανισμού, είτε να αποκτούν συστατικώς υψηλή και απορρυθμισμένη δράση κινάσης.

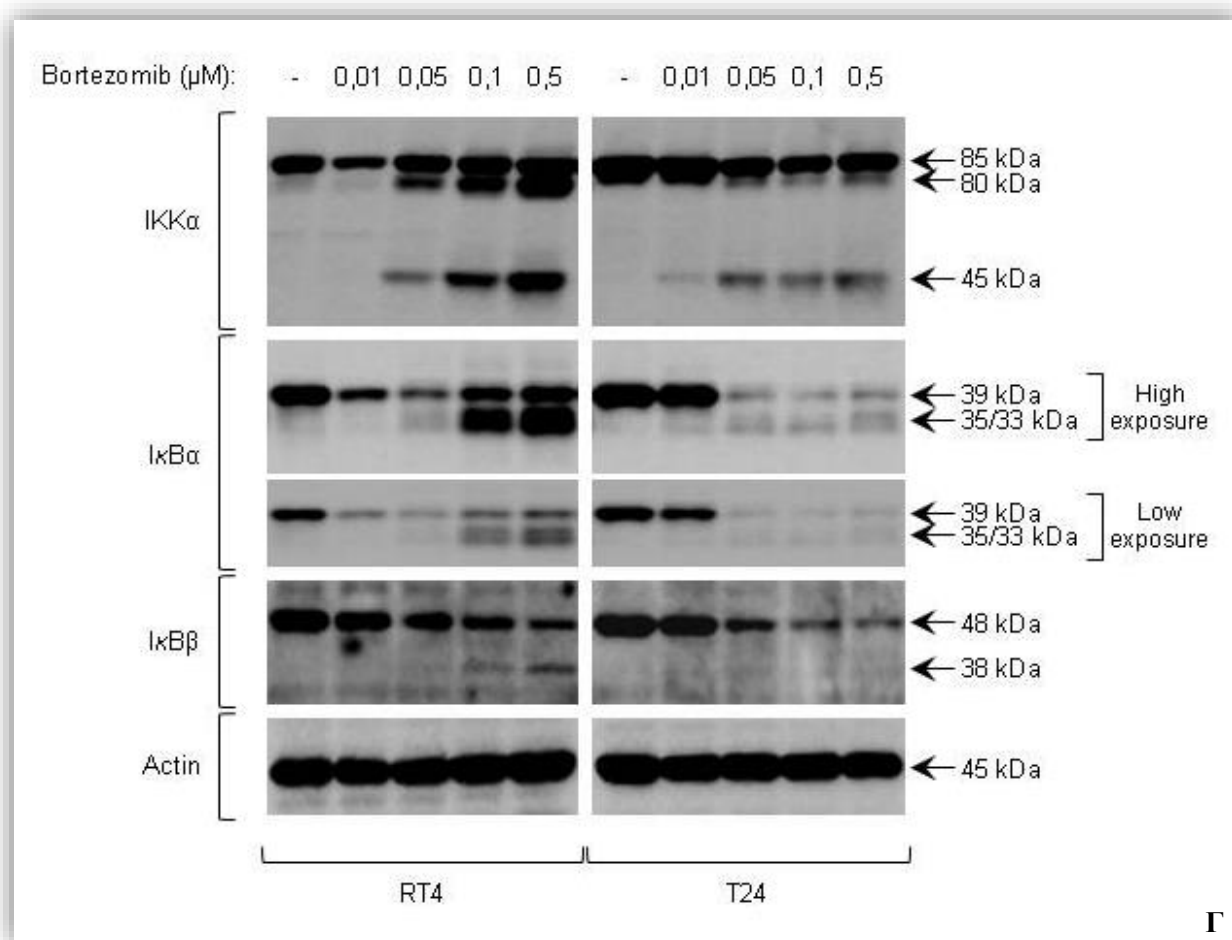
Η περαιτέρω μελέτη του IKK κατωροϊκού (*downstream*) υποστρώματος IκBa απέδειξε την ικανότητα του Bortezomib να μειορρυθμίζει ισχυρά τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης αυτού στα RT4 κύτταρα με έναν εμφανή δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και συγχρόνως να προκαλεί τον σχηματισμό δύο IκBa-like, χαμηλότερου μοριακού βάρους, πρωτεϊνών της τάξης των ~35 kDa και ~33 kDa,

αντίστοιχα. Παρομοίως, τα T24 κύτταρα φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από μία δραματική μείωση της φυσιολογικής IκBa μορφής των 39 kDa στις δόσεις φαρμάκου 0,05, 0,1 και 0,5 μM, με παράλληλη δημιουργία, αν και σε συγκριτικά μικρότερο ποσοστό, των ~35/33 kDa πρωτεϊνικών IκBa-like μορφών (**Εικόνα 3.14Γ**). Τα εν λόγω θραύσματα είναι πιθανόν να σχηματίζονται μέσω ενός μηχανισμού φαρμακο-επαγόμενης πρωτεόλυσης, χωρίς να αποκλείεται το εναλλακτικό σενάριο του διαφορικού ματίσματος.

Παρομοίως, αναλύοντας το ομόλογο μέλος της οικογένειας IκBβ, αποκαλύφθηκε η έντονη δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση αυτού και στους δύο υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους σε απόκριση στο φάρμακο, συνοδευόμενη από μία RT4-ειδική επαγωγή ενός πρωτεολυτικού -πιθανότατα- θραύσματος ~38 kDa στις δόσεις 0,1 και 0,5 μM του Bortezomib (**Εικόνα 3.14Γ**). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η έκθεση στο φάρμακο προκαλεί ισχυρή διάρρηξη της λειτουργικής ακεραιότητας του IKKα/IκBa-IκBβ σηματοδοτικού άξονα (*signaling axis*), μέσω είτε μειορρύθμισης του βαθμού έκφρασης είτε σχηματισμού θραυσμάτων με ισχυρά παρεμβατικό ρόλο στη λειτουργία των αντίστοιχων ενδογενών μορίων. Είναι εντυπωσιακό ότι όπου τα φαρμακο-εξαρτώμενα επίπεδα έκφρασης είναι συγκριτικά υψηλότερα [εντός του ίδιου κυτταρικού τύπου (RT4)], εκεί παρατηρείται και η μεγαλύτερη συσσώρευση των χαμηλότερου μοριακού μεγέθους, και ενδεχομένως αλλοιωμένης ενεργότητας, προϊόντων (για παράδειγμα IKKα και IκBa).







**Εικόνα 3.14** Διαταραχές κρίσιμων σηματοδοτικών αξόνων στα RT4 και T24 ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου ως απόκριση στο Bortezomib (24 ώρες), όπως αποκαλύπτεται από το ανοσο-στύπωμα Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε-δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. (Α) Akt/GSK-3 Σηματοδοτικός Άξονας, (Β) MAPK και AMPK Σηματοδοτικοί Άξονες και (Γ) IKK/I $\kappa$ B Σηματοδοτικός Άξονας. *p*-: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Thr*: Θρεονίνη, *Tyr*: Τυροσίνη, *Actin*: Ακτίνη, *High exposure*: Υψηλή έκθεση, *Low exposure*: Χαμηλή έκθεση και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Η δομική ευστάθεια, η λειτουργική ακεραιότητα και η ομοιόσταση του πρωτεώματος (*proteome*) ως ολότητα καθορίζονται, μεταξύ άλλων, από τα μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών (*molecular chaperons*) Hsp70 και Hsp90, των οποίων τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα υπό την επίδραση στρες επίπεδα

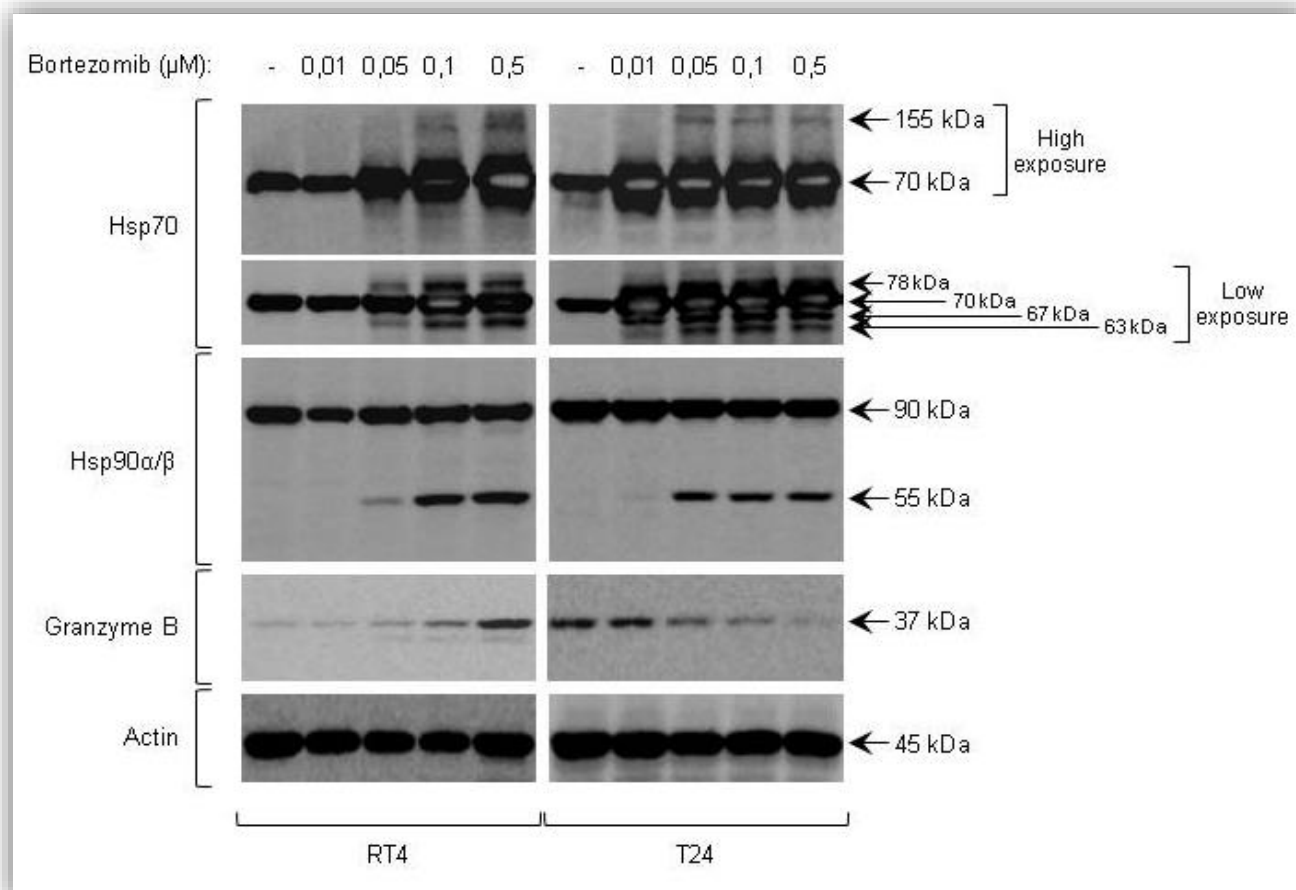
έκφρασης διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην κυτταρική παθοφυσιολογία. Στην κατεύθυνση αυτή, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από RT4 και T24 κύτταρα, αναπτυγμένα σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας Bortezomib, υποβλήθηκαν σε ανοσο-στύπωμα Western δια μέσου της χρήσης ομοειδών πρωτογενών αντισωμάτων. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.15**, το Bortezomib αποδεικνύεται ικανό να επάγει την δόσο-εξαρτώμενη έκφραση τόσο ενός υψηλότερου μοριακού βάρους, πιθανότατα μονο-ουμπικουϊτινωμένου, προϊόντος ~78 kDa όσο και διακριτών για κάθε κυτταρικό τύπο πρωτεολυτικών θραυσμάτων, ~67 kDa για τα RT4 και ~67/63 kDa για τα T24, τα οποία ενδεχομένως μπορούν και παρεμβαίνουν με «αρνητικά επικρατή» τρόπο στην ενδογενή λειτουργία του φυσιολογικού τύπου μορίου Hsp70.

Αντίθετα, η Hsp90 (α/β) αποδείχθηκε να υπόκειται σε μία ισχυρή και δόσο-εξαρτώμενη διαδικασία πρωτεολυτικής υδρόλυσης (χωρίς, εναλλακτικά, να αποκλείεται το διαφορικό μάτισμα), αποτέλεσμα της οποίας ήταν ο φαρμακο-ειδικός σχηματισμός, και για τους δύο κυτταρικούς τύπους, ενός μικρότερου πρωτεϊνικού θραύσματος μοριακού βάρους ~55 kDa, το οποίον ενδεχομένως φέρει νέες ιδιότητες που θα μπορούσαν να οδηγούν σε καταστολή της λειτουργικής ακεραιότητας της ενδογενούς Hsp90. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες είναι οι παρατηρήσεις ότι τα T24 εμφανίζονται πιο ευπαθή στον δομικό ακρωτηριασμό της Hsp90, ενώ και οι δύο κυτταρικοί τύποι παρουσιάζονται ουσιαστικά ανεπηρέαστοι ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς και άθικτης Hsp90. Η μέσω του φαρμάκου διαταραχή λειτουργίας της Hsp90 ως μοριακή συνοδός θα μπορούσε να προκαλέσει την χωροταξική αστάθεια και δομική ευπάθεια διακριτών «πελατών»-στόχων (*client-targets*) αυτής, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την Akt κινάση, όπως εμφανώς παρατηρείται στην **Εικόνα 3.14A**.

Στην προσπάθεια ταυτοποίησης του κρίσιμου εκείνου μοριακού καθοριστή ο οποίος θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για την πρωτεολυτική επεξεργασία της Hsp90 μελετήθηκε το προφίλ συσσώρευσης, ως απόκριση στη δράση του φαρμάκου, της πρωτεάσης τύπου σερίνης Granzyme B. Ο δόσο-εξαρτώμενος βαθμός έκφρασης αποκαλύπτει την ισχυρή φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμισή της στα RT4 και την έντονη μειορρύθμισή της στα T24 κύτταρα, γεγονός που στην ολότητά του δεν συνάδει με τα αποκτώμενα πρότυπα συσσώρευσης του θραύσματος των ~55 kDa, αποκλείοντας, ως εκ τούτου, την καθοριστική συμμετοχή του Granzyme B στον



σηματισμό του Hsp90 πρωτεολυτικού θραύσματος (**Εικόνα 3.15**). Αξίζει να σημειωθεί ο διαφορετικός ρόλος του Granzyme B στην κατά περίπτωση διακριτή δράση στρες, όπως αυτός αποδεικνύεται από το διαφορετικής τάξης μεγέθους μοριακό θραύσμα που σχηματίζεται παρουσία Cisplatin (~65 kDa) ή Bortezomib (~55 kDa), σε σχέση με την παρόμοια «κινητική απόκρισης» αυτού στα εν λόγω χημειοθεραπευτικά φάρμακα και για τους δύο κυτταρικούς τύπους κακοήθους ουροθηλίου.



**Εικόνα 3.15** Granzyme B-ανεξάρτητη πρωτεολυτική σχέση των μοριακών συνοδών Hsp70 και Hsp90 μετά από 24ωρη έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στο Bortezomib, όπως αποδεικνύεται δια μέσου εφαρμογής του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο των δομικά ανεπηρέαστων όσο και των πρωτεολυτικά επεξεργασμένων (ή διαφορετικά ματισμένων) αντίστοιχων μορφών τους. *Actin*: Ακτίνη, *High exposure*: Υψηλή έκθεση, *Low exposure*: Χαμηλή έκθεση και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.6 Γονιδιο-ειδικά πρότυπα μεταγραφικής ενεργότητας του κακοήθους ανθρώπινου ουροθηλίου των RT4 κυττάρων σε περιβάλλον πρωτεασωμικής αδρανοποίησης

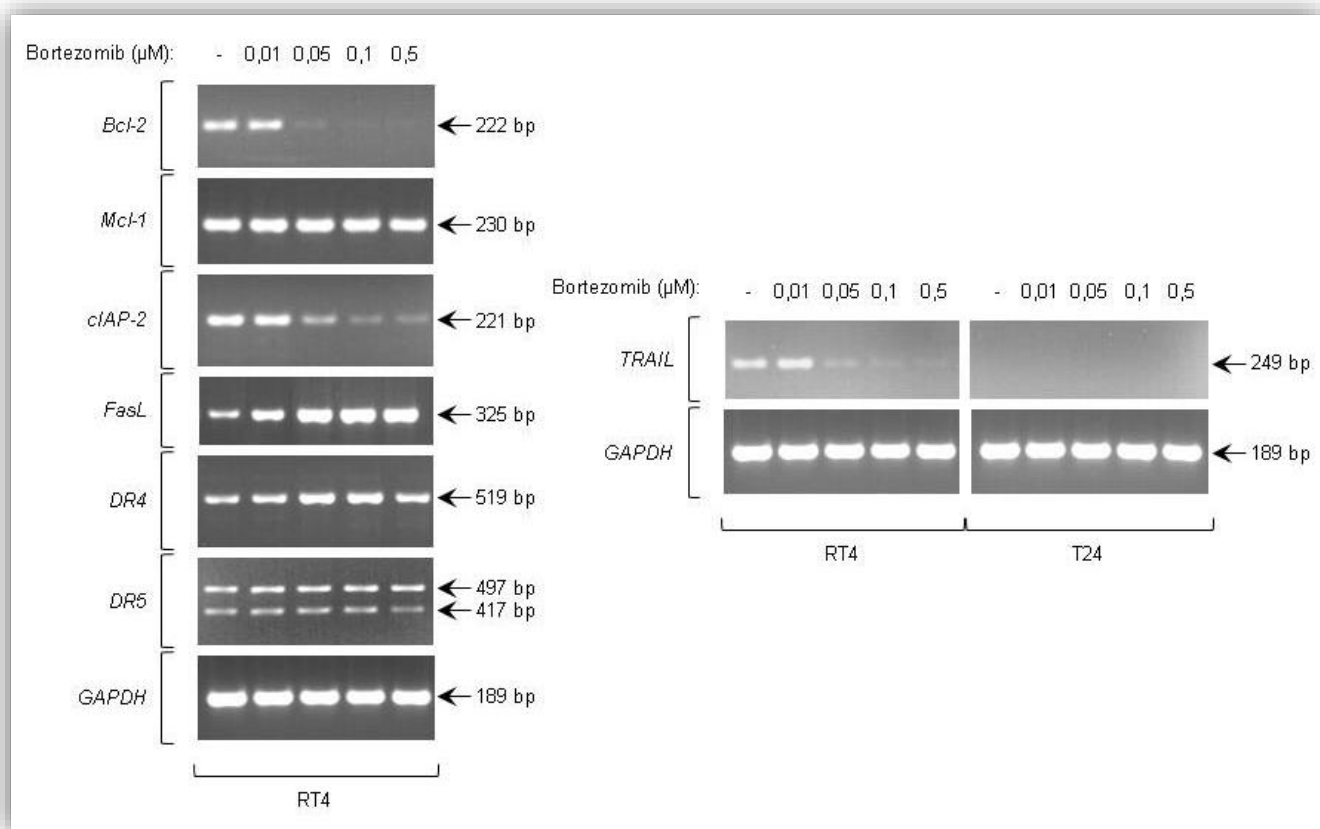
Η ημι-ποσοτική RT-PCR τεχνολογία αποκάλυψε μία σειρά επιλεγμένων γονιδίων κακοήθων ουροθηλιακών κυττάρων (RT4) (Πίνακας 3.2), τα οποία θα μπορούσαν να ταξινομηθούν με βάση την διαφορική τους απόκριση στην 24ωρη επίδραση του Bortezomib σε τρεις διακριτές κατηγορίες: α) γονίδια με αμετάβλητη μεταγραφική δράση, όπως το αντι-αποπτωτικό *Mcl-1* και το γλυκολυτικό *GAPDH* μέλος της αντίστοιχης οικογένειας, β) γονίδια που υπόκεινται σε ισχυρή δόσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση ως απάντηση στο φάρμακο, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα αντι-αποπτωτικά μέλη *Bcl-2* και *cIAP-2* και γ) γονίδια που ακολουθούν ένα φαρμακο-επαγόμενο και δόσο-ειδικό πρότυπο αυξορρύθμισης, όπως τα αποπτωτικά μέλη *DR4*, *DR5* και *FasL*, με το τελευταίο να επιδεικνύει τα ισχυρότερα και εντυπωσιακότερα επίπεδα έκφρασης RNA μεταγράφων (Εικόνα 3.16). Είναι λοιπόν σαφές ότι η μέσω Bortezomib αναστολή του πρωτεασώματος δεν προκαλεί μία συγκεκριμένου τύπου και γενικευμένη διαταραχή στη λειτουργία και αποδοτικότητα της μεταγραφικής μηχανής, αλλά φαίνεται να δημιουργεί ειδικά «μικρο-περιβάλλοντα», τα οποία σε συνδυασμό με επιλεγμένους κατά περίπτωση μοριακούς καθοριστές μπορούν και ελέγχουν τη μεταγραφική συμπεριφορά και έκφραση του εκάστοτε γονιδίου.

Ένα από τα πλέον σύγχρονα και πολλαπλώς υποσχόμενα θεραπευτικά σχήματα για την επιτυχή αντιμετώπιση αρκετών αιματολογικών κακοηθειών, και ειδικότερα του πολλαπλού μυελώματος (*multiple myeloma*), είναι αυτό του συνεργατικού κοκτέιλ Bortezomib – TRAIL, με το Bortezomib συχνά να επιδεικνύει ισχυρή ικανότητα να αποκαθιστά θεραπευτικά και να εκριζώνει TRAIL-ανθεκτικούς όγκους [451]. Αντίθετα, είναι πλέον επιτακτική ανάγκη η επιτυχής αντιμετώπιση ανθρώπινων καρκίνων που αναπτύσσουν πρωτογενή αντοχή στη δράση του Bortezomib. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να προταθεί η ακριβώς αντίστροφη θεραπευτική πλατφόρμα, κατά την οποία το TRAIL θα συνεργαζόταν αποδοτικά με το Bortezomib (κοκτέιλ TRAIL – Bortezomib) και θα υπερνικούσε την όποια παρατηρούμενη αντίσταση των κυττάρων του όγκου σε αυτό (Bortezomib).

Στην κατεύθυνση αυτή, και μέσω της ημι-ποσοτικής RT-PCR τεχνολογίας, μελετήθηκαν τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *TRAIL* και στους δύο κυτταρικούς τύπους (RT2 και T24) σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας Bortezomib. Αποκαλύφθηκε τόσο η αυστηρά κυτταρο-ειδική ενεργότητα του εν λόγω γονιδίου, με πλήρη απώλεια αυτής στα T24, όσο και η δόσο-εξαρτώμενη μειορρύθμισή του στα RT4 κύτταρα, στις συγκεντρώσεις φαρμάκου 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$  (**Εικόνα 3.16**), όπου και παρατηρούνται τα υψηλότερα επίπεδα ενεργοποιημένης Κασπάσης-8 (**Εικόνα 3.11A**). Είναι λοιπόν σαφές ότι η «μοριακή υπογραφή» (*molecular signature*) έκφρασης του γονιδίου *TRAIL* δεν σχετίζεται άμεσα και καθοριστικά με τις αποπτωτικές αποκρίσεις του καρκινικού ουροθηλίου (RT4) στο Bortezomib, ενώ η δυνατότητα του εν λόγω χημειοθεραπευτικού παράγοντα να καταστέλλει λειτουργικά το γονίδιο *TRAIL* (**Εικόνα 3.16**) θα μπορούσε τόσο να δικαιολογεί την χαμηλότερη ευαισθησία των RT4 κυττάρων όσο και να επιτρέπει την ανάπτυξη ενός -αντίστροφου- *TRAIL* – Bortezomib συνδυαστικού πρωτοκόλλου που να υποκαθιστά επιτυχώς την απώλεια έκφρασης του *TRAIL* κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής.

**Πίνακας 3.2** Παραθέτονται τα ονόματα των γονιδίων, οι αλληλουχίες των ολιγοεκκινητών *Forward (F)* (Πρόσθιος) και *Reverse (R)* (Ανάστροφος), τα μοριακά μεγέθη (*bp*) (*base pairs*) των προϊόντων της PCR και οι συνθήκες (*Ta* και ο αριθμός των κύκλων) της PCR για τα γονίδια που εξετάστηκαν. *Gene Name*: Όνομα Γονιδίου, *Primer Sequence*: Αλληλουχία Ολιγοεκκινητή, *Length of PCR Product*: Μήκος PCR Προϊόντος, *Ta*: Θερμοκρασία Επαναδιάταξης και *Number of Cycles*: Αριθμός Κύκλων.

	Gene Name	Primer Sequence	Length of PCR Product	Ta	Number of Cycles
1.	<i>Bcl-2</i>	F: 5' -TGT GGC CTT CTT TGA GTTCG- 3' R: 5' -AGC AGA GTC TTC AGA GAC AG- 3'	222	55°C	30
2.	<i>Mcl-1</i>	F: 5' -TTG GTG CCT TTG TGG CTA AAC- 3' R: 5' -TGC CAA ACC AGC TCC TAC TC- 3'	230	57°C	30
3.	<i>clAP-2</i>	F: 5' -GCA GCC ACT GTA TTC AGA AAC- 3' R: 5' -TTG CAT ACT ACT AGA TGA CCA C- 3'	221	57°C	30
4.	<i>FasL</i>	F: 5' -CTC TGG AAT GGG AAG ACA CC- 3' R: 5' -ACC AGA GAG AGC TCA GAT ACG- 3'	325	57°C	40
5.	<i>DR4</i>	F: 5' -CTT CAA GTT TGT CGT CGT CG- 3' R: 5' -ATG CAA CAA CAG ACA ATC AGC- 3'	519	55°C	30
6.	<i>DR5</i>	F: 5' -CAA CAA GAC CTA GCT CCC CA- 3' R: 5' -ACG GCT GCA ACT GTG ACT C- 3'	497/417	55°C	30
7.	<i>TRAIL</i>	F: 5' -TGG CTA TGA TGG AGG TCC AG- 3' R: 5' -GTT GCC ACT TGA CTT GCC AG- 3'	249	57°C	30
8.	<i>GAPDH</i>	F: 5' -TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC- 3' R: 5' -ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC- 3'	189	55°C	28



**Εικόνα 3.16** Γονιδιο-ειδικές μεταγραφικές αποκρίσεις RT4 (και T24) ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου έπειτα από 24ωρη χορήγηση Bortezomib, όπως διαφαίνονται μέσω της sqRT-PCR τεχνολογίας, χρησιμοποιώντας το *GAPDH* ως γονίδιο αναφοράς. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση γονιδίων, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους μεγέθη σε ζεύγη βάσεων. *sq*: ημι-ποσοτική, *bp*: ζεύγος βάσεων και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

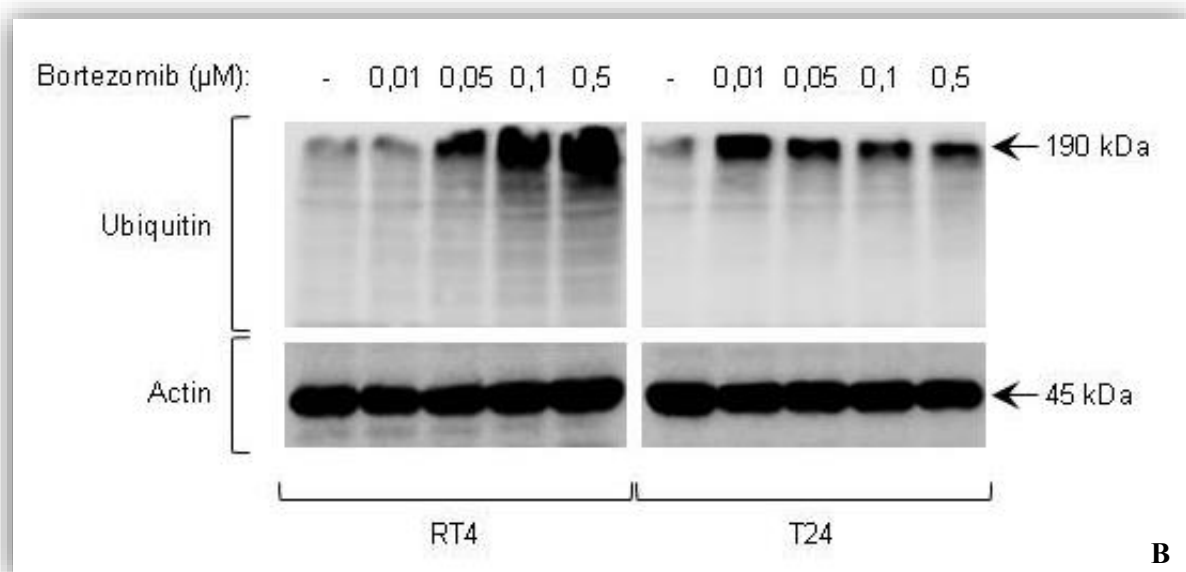
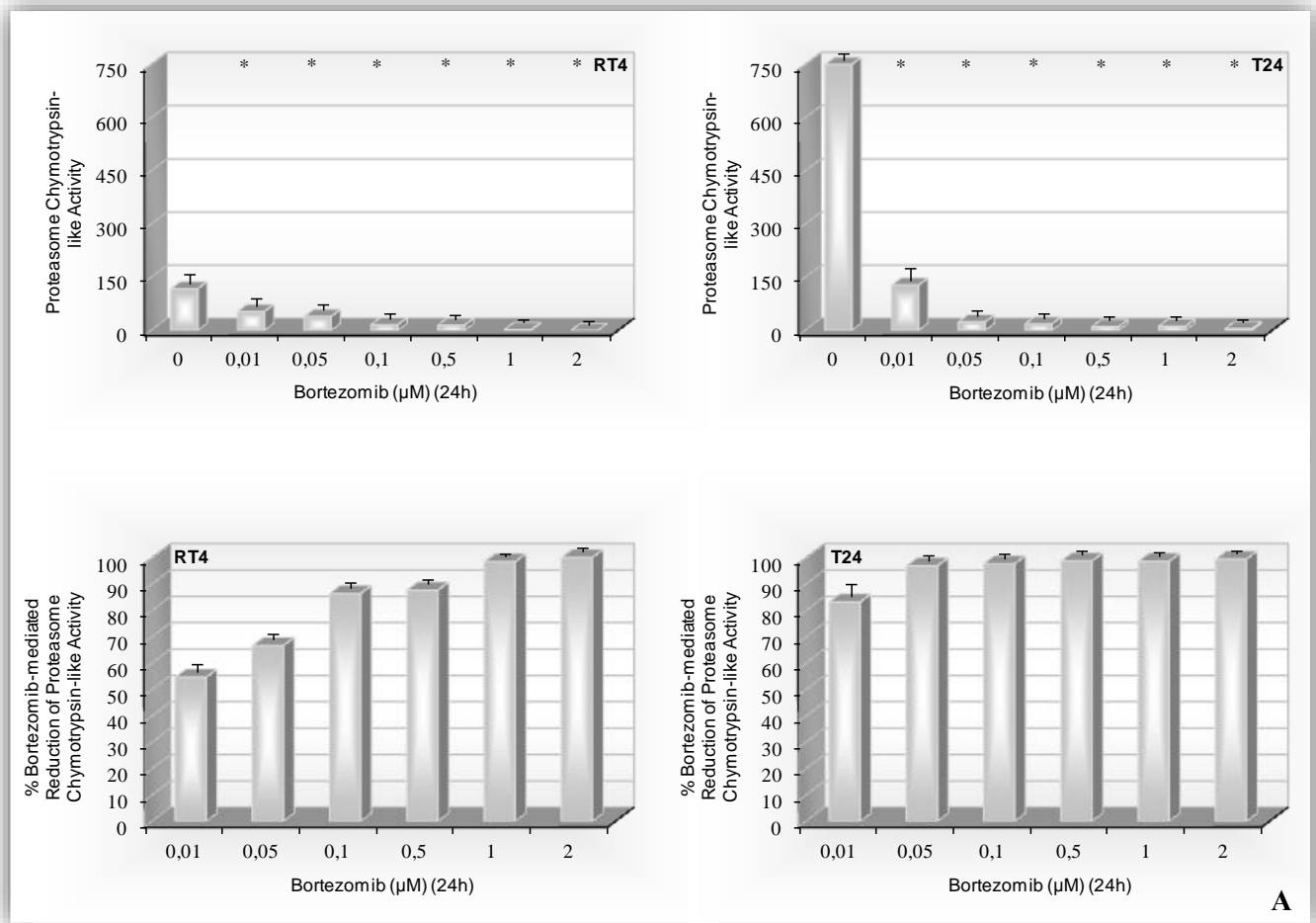
### 3.2.7 Η έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4 και T24 στο Bortezomib οδηγεί σε ισχυρή αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος και συσσώρευση ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών

RT4 και T24 κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 και 2  $\mu\text{M}$ ) Bortezomib και η προσομοιάζουσα της χυμοθρυψίνης (*chymotrypsin-like*) ενεργότητα του πρωτεασώματος προσδιορίστηκε στα αντίστοιχα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δια μέσου της χρήσης του φθορίζοντος συνθετικού πεπτιδίου Suc-LLVY-AMC και

του τελικού υπολογισμού παραγωγής του υδρολυμένου παραγώγου αυτού σε φθορισμόμετρο τύπου Perkin Elmer LS 55. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.17A**, το Bortezomib αποδεικνύεται ικανό να καταστέλλει δραστικά την πρωτεολυτική ενεργότητα του πρωτεασώματος τύπου χυμοθρυψίνης με έναν αυστηρά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και στους δύο κυτταρικούς τύπους, αγγίζοντας το ποσοστό αναστολής της τάξης του 100% στη συγκέντρωση φαρμάκου 1  $\mu\text{M}$ . Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η αναστολή του πρωτεασώματος μπορεί και παρατηρείται ήδη από τη δόση των 0,01  $\mu\text{M}$  Bortezomib, όπου ανιχνεύεται ~55% και ~83% μείωση ενεργότητας στην RT4 και T24 κυτταρική σειρά, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, είναι εντυπωσιακό το εύρημα της συγκριτικά υψηλότερης πρωτεασωμικής ενεργότητας των T24 ως προς τα RT4 κύτταρα σε συνθήκες απουσίας στρες (0  $\mu\text{M}$  φαρμάκου), γεγονός που αντανακλά φαινόμενα «πρωτεασωμικού εθισμού» (*proteasome addiction*), παρόμοια με αυτά που ανιχνεύθηκαν για την αυτοφαγία («αυτοφαγικός εθισμός») (**Εικόνα 3.13**). Είναι πιθανόν ότι τα υψηλά συστατικά -βασικά- επίπεδα δράσης αυτοφαγίας και πρωτεασώματος μπορούν και εξοπλίζουν τα T24 κύτταρα με μηχανισμούς τέτοιους που να δικαιολογούν το αυξημένο μιτωτικό δυναμικό, την προχωρημένη μεταστατική ικανότητα και τον υψηλό βαθμό κακοήθειας (*grade III*) αυτών.

Στην ίδια κατεύθυνση, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT4 και T24 κυττάρων, μετά από έκθεση αυτών στο Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ), επεξεργάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης ειδικού πρωτογενούς αντισώματος που αναγνωρίζει την ουμπικουϊτίνη (*ubiquitin*), και ως εκ τούτου το σύνολο των ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών (*ubiquitinated proteins*). Όπως αποκαλύπτει η **Εικόνα 3.17B**, και οι δύο κυτταρικοί τύποι μετά από έκθεση στο φάρμακο φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από δόσο-εξαρτώμενα προφίλ συσσώρευσης (πολυ-)ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών, η πλειονότητα των οποίων αποκαλύφθηκε να συμμετέχει σε υψηλού μοριακού βάρους (~190 kDa) πολυ-πρωτεϊνικά συσσωματώματα (*protein aggregates*), με ενδεχόμενη ισχυρή τοξική δράση. Τα συγκριτικά ποσοστά των RT4 και T24 κυττάρων μεταξύ τους, που αφορούν τόσο στην φαρμακο-επαγόμενη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στις δόσεις 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$  όσο και στον βαθμό σχηματισμού των (πολυ-)ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στη συγκέντρωση του 0,01  $\mu\text{M}$

Bortezomib, επιβεβαιώνουν την διαφορεικά υψηλότερη ευαισθησία των T24 ως προς τα RT4 κύτταρα στον υπό μελέτη χημειοθεραπευτικό παράγοντα.



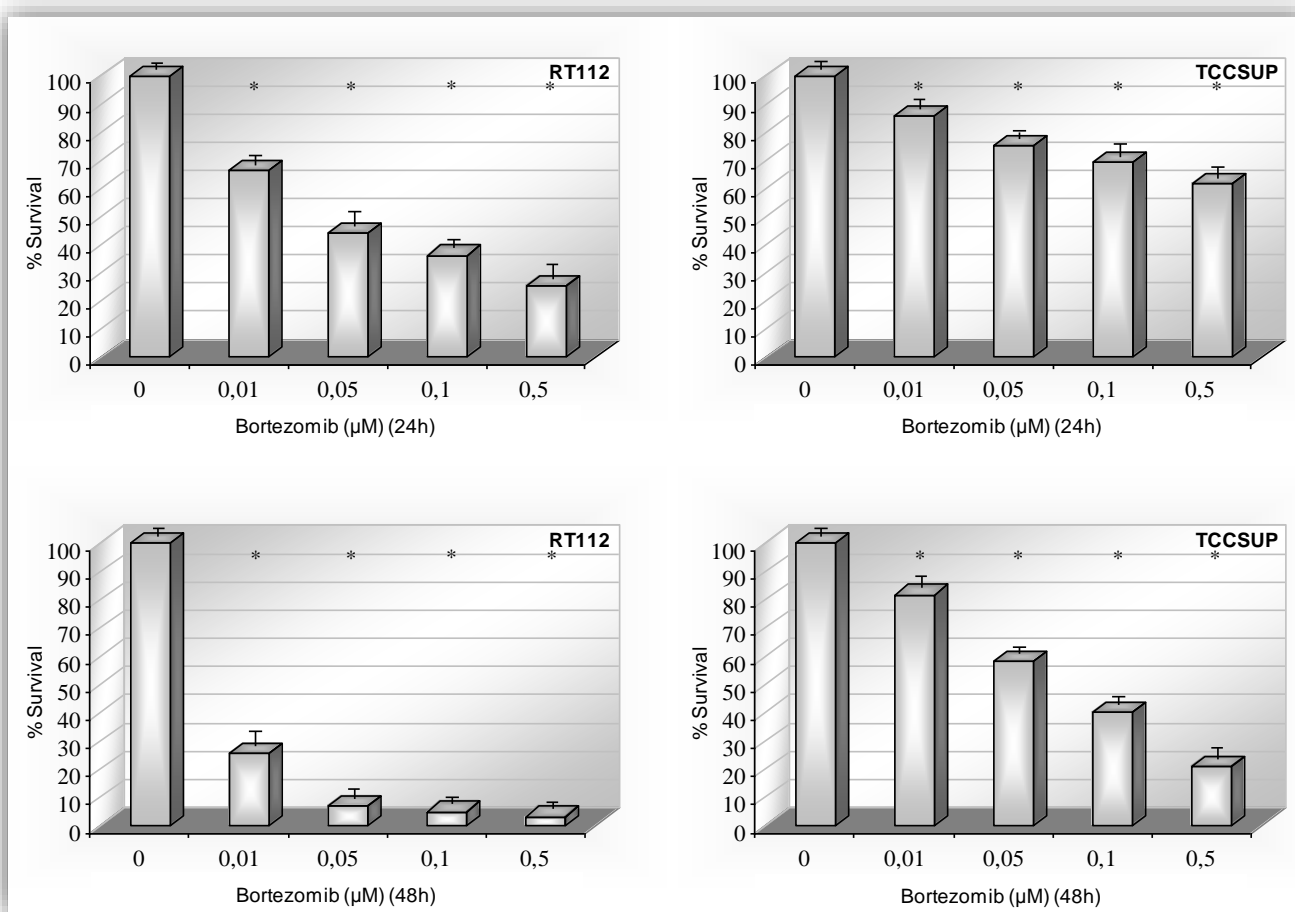
**Εικόνα 3.17** Αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος ως αποτέλεσμα της 24ωρης δράσης του Bortezomib στα RT4 και T24 κύτταρα του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου, όπως αποκαλύπτεται τόσο (A) από τον βαθμό υδρόλυσης του Suc-LLVY-AMC συνθετικού φθορίζοντος πεπτιδίου-υποστρώματος [μέτρηση της ενεργότητας πρωτεασώματος που προσομοιάζει στη χυμοθρυψίνη (*Proteasome Chymotrypsin-like Activity*)], και την φθορισμομετρική ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του αντίστοιχου παραγόμενου προϊόντος, όσο και (B) από το ποσοστό της συσσώρευσης (πολυ-)ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών στη μορφή μεγαλο-μοριακών συμπλόκων σύμφωνα με το ανοσο-στύπωμα Western. (A) Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά της να αδρανοποιεί το πρωτεάσωμα σε τρία ανεξάρτητα πειράματα για κάθε κυτταρικό τύπο. *Bortezomib-mediated Reduction of Proteasome Chymotrypsin-like Activity*: Ελάττωση της Ενεργότητας του Πρωτεασώματος που Προσομοιάζει στη Χυμοθρυψίνη μετά από Διαμεσολάβηση του Bortezomib και *h*: ώρες έκθεσης στο φάρμακο. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των μειωμένων επιπέδων ενεργότητας πρωτεασώματος σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ . (B) Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (ή συμπλόκων), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *Ubiquitin*: Ουμπικουϊτίνη, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.8 Κυτταροτοξική ενεργότητα του Bortezomib στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP

Η ικανότητα του Bortezomib να προκαλεί κυτταροτοξικές αποκρίσεις, όπως αυτές αξιολογούνται και ποσοτικοποιούνται με βάση τον αντίστροφο συσχετισμό τους με τα % ποσοστά επιβίωσης, μελετήθηκε και αναλύθηκε δια μέσου της MTT τεχνολογίας. Ειδικότερα, μετά την 24ωρη και 48ωρη έκθεση RT112 και TCCSUP κυτταρικών μονο-ταπητίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) αποκαλύφθηκε η ενεργότητα του φαρμάκου να μειώνει τη βιωσιμότητα και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με μέγιστο χρόνο δράσης αυτού τις



48 ώρες. Εντυπωσιακά διαφαίνεται η συγκριτικά υψηλότερη ευπάθεια των RT112 (*grade I-II*) ως προς την αντίστοιχη των TCCSUP κυττάρων (*grade IV*), όπως αποδεικνύεται από τα ισχυρότερα προφίλ δόσο-εξαρτώμενης ελάττωσης των ποσοστών επιβίωσης (%) των πρώτων (RT112) ως προς τους δεύτερους κυτταρικούς πληθυσμούς (TCCSUP). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το % ποσοστό που μπορεί και επιβιώνει (με μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια) στην μέση συγκέντρωση φαρμάκου των 0,05  $\mu\text{M}$  (σε 48 ώρες) υπολογίστηκε ~7% και ~58% για τα RT112 και TCCSUP, αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει τον αυστηρά κυτταρο-ειδικό τρόπο δράσης του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο (**Εικόνα 3.18**).



**Εικόνα 3.18** Κυτταροτοξική επίδραση του Bortezomib στα RT112 και TCCSUP ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, όπως διαφαίνεται από την MTT δοκιμασία. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *h*: ώρες έκθεσης στο φάρμακο και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι

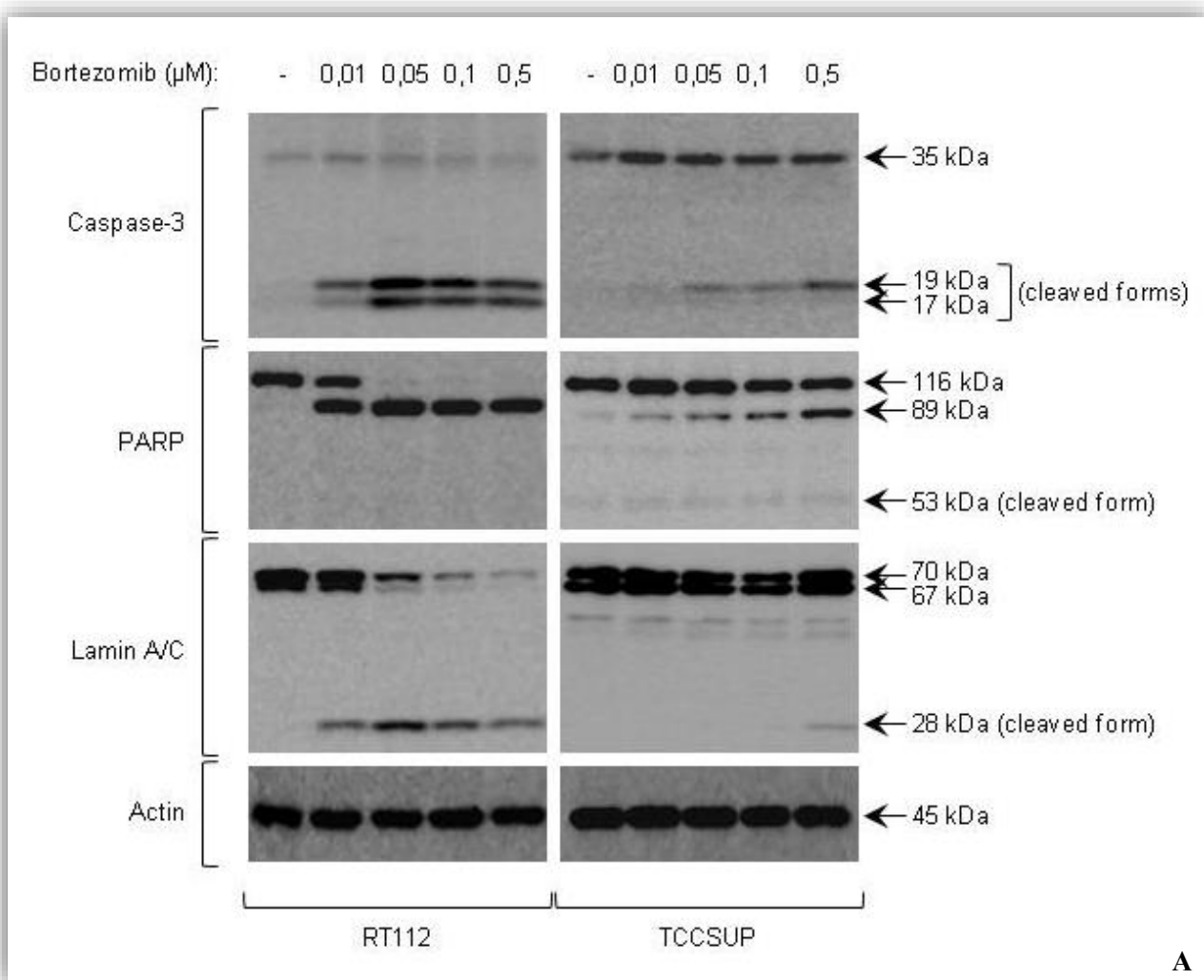
αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

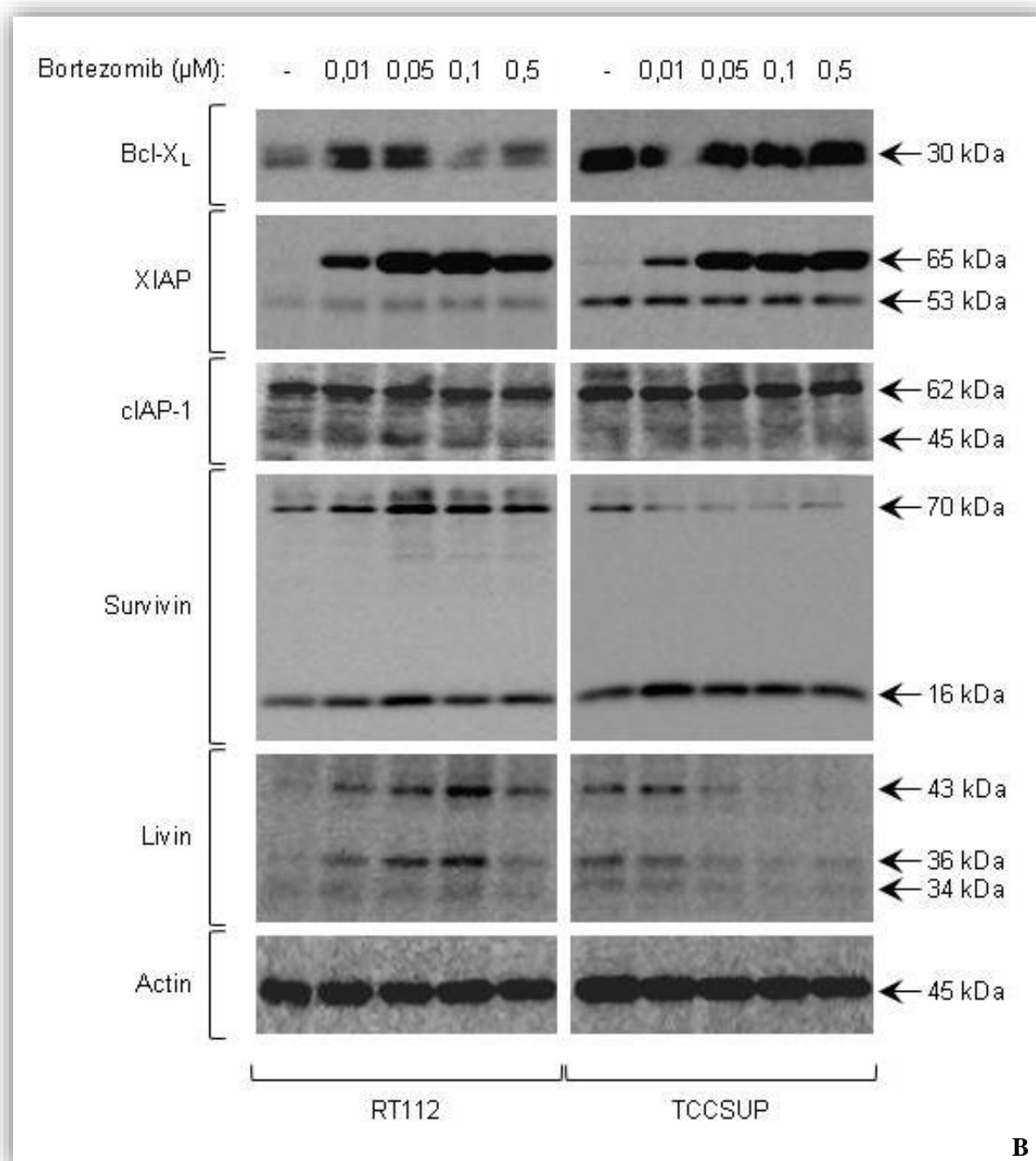
### **3.2.9 Τα RT112 και TCCSUP ανθρώπινα κύτταρα κακόηθους ουροθηλίου υπόκεινται σε ένα Κασπασο-εξαρτώμενο πρόγραμμα αποπτωτικού θανάτου ως απόκριση στην έκθεση στο Bortezomib**

Τα προφίλ έκφρασης της πρωτεολυτικά επεξεργασμένης, και άρα ενεργοποιημένης, Κασπάσης-3 (*Caspase-3*), καθώς και των πρωτεολυμένων υποστρωμάτων αυτής PARP και Lamin A/C, εξετάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western, και χρήσης των αντίστοιχων πρωτογενών αντισωμάτων, σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT112 και TCCSUP κυττάρων που είχαν επωαστεί για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ). Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.19A**, το Bortezomib αποδείχθηκε ικανό να επάγει, και στους δύο κυτταρικούς τύπους, την δόσο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση τόσο της πρόδρομης Κασπάσης-3 -στην ενεργό μορφή αυτής (19/17 kDa)- όσο και των κατωροϊκών της υποστρωμάτων PARP (89 και 53 kDa) και Lamin A/C (28 kDa), γεγονότα που σηματοδοτούν την ενεργοποίηση ενός Κασπασο-ειδικού προγράμματος αποπτωτικού θανάτου. Η ανάλυση των φαρμακο-ελεγχόμενων προτύπων έκφρασης των πρωτεολυτικών θραυσμάτων για τις τρεις υπό μελέτη πρωτεΐνες καταδεικνύει την συγκριτικά υψηλότερη ευαισθησία των RT112 ως προς τα TCCSUP κύτταρα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη δυνατότητα των πρώτων να υποβάλλονται σε ένα ισχυρό πρόγραμμα αποπτωτικής εξόντωσης από την μικρότερη κιάλας δόση (0,01  $\mu\text{M}$ ) χορήγησης του Bortezomib. Είναι λοιπόν προφανές ότι τόσο η γενικότερου τύπου κυτταροτοξική (**Εικόνα 3.18**) όσο και η ειδικότερου τύπου αποπτωτική (**Εικόνα 3.19A**) ενεργότητα του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο επιδεικνύουν αυστηρά κυτταρο-ειδικούς χαρακτήρες δράσης, αντίστοιχα.

Στην ίδια κατεύθυνση και εξετάζοντας τη συμμετοχή κρίσιμων αντι-αποπτωτικών ρυθμιστών στην εμπλοκή της απόπτωσης στο κακόηθες ουροθήλιο, συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα RT112 και TCCSUP κυττάρων, τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες, υποβλήθηκαν σε ανοσο-στύπωμα Western δια μέσου της χρήσης πρωτογενών

αντισωμάτων με ειδική ικανότητα αναγνώρισης των Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, cIAP1, Survivin και Livin αποπτωτικών αναστολέων. Αποδείχθηκε ότι το Bortezomib μπορεί και προκαλεί κατά περίπτωση προωθητικές και αντισταθμιστικές αποκρίσεις, το σύνολο των οποίων διαμορφώνει αθροιστικά την εκάστοτε κυτταρο-ειδική συμπεριφορά του καρκινικού ουροθηλίου. Ειδικότερα, όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.19B**, τόσο το Bcl-X<sub>L</sub> όσο και η Livin φάνηκαν να αυξορρυθμίζονται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στα RT112 κύτταρα (αντισταθμιστικές δράσεις), ενώ το Bcl-X<sub>L</sub> παρέμεινε ανέπαφο και η Livin παρατηρήθηκε ως έντονα μειορρυθμιζόμενη (προωθητική δράση) στα TCCSUP κύτταρα. Αντίθετα, τα βασικά επίπεδα συστατικής έκφρασης των cIAP1 και XIAP πρωτεϊνών παρουσιάστηκαν ουσιαστικά αναλλοίωτα και για τους δύο υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους, με εντυπωσιακή όμως την εμφάνιση ενός φαρμακο-επαγόμενου XIAP-like μορίου με υπολογιζόμενο μέγεθος ~65 kDa, το οποίον ενδεχομένως αντιπροσωπεύει μονο- ή δι-ουμπικουϊτινωμένη μορφή του ενδογενούς XIAP αναστολέα, χωρίς να αποκλείεται και το εναλλακτικό σενάριο του διαφορικού ματίσματος (**Εικόνα 3.19B**). Δεδομένου ότι, όπως επίσης αποκαλύφθηκε για τα RT4 και T24 κύτταρα (**Εικόνα 3.11Γ**), η εμφάνιση της XIAP-like πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τον βαθμό διαφορικής ευαισθησίας της κάθε κυτταρικής σειράς στο Bortezomib (**Εικόνες 3.11Γ και 3.19B**), είναι ιδιαίτερα πιθανόν η ενδεχόμενη μονο- ή δι-ουμπικουϊτινώση, και επακόλουθη λειτουργική αδρανοποίηση (προωθητική δράση), του XIAP να κατέχει καθοριστικό ρόλο στην επαγόμενη από το φάρμακο κυτταρική εξόντωση του κακοήθους ουροθηλίου. Χαρακτηριστικές είναι οι αντισταθμιστικές αυξορρυθμίσεις έκφρασης της Survivin και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με τα TCCSUP να επιδεικνύουν ισχυρότερες αποκρίσεις (**Εικόνα 3.19B**). Η υψηλότερου μοριακού βάρους Survivin-like ζώνη των ~70 kDa, πιθανό προϊόν ενός φαρμακο-ειδικού μηχανισμού πολυ-ουμπικουϊτινώσης της πρωτεΐνης Survivin (~6 ουμπικουϊτίνες/Survivin) (χωρίς αποκλεισμό ενός μηχανισμού εναλλακτικού ματίσματος), ενδεχομένως χαρακτηρίζεται από αποδυναμωμένες λειτουργικές δράσεις αναστολής Κασπάσης, γεγονός που θα μπορούσε εύκολα να συσχετισθεί με την παρατηρούμενη διαφορετική ευαισθησία των RT112 και TCCSUP κυττάρων στο φάρμακο. Η προαγωγική δράση της μειορρυθμίσης της Livin στα TCCSUP θα μπορούσε να εξισορροπείται -μερικώς- από τα υψηλά και ανεπηρέαστα επίπεδα έκφρασης του Bcl-X<sub>L</sub>, διαμορφώνοντας τελικά ένα συγκριτικά ανθεκτικότερο περιβάλλον κυτταρικής απόκρισης στο Bortezomib.





**Εικόνα 3.19** Ενεργοποίηση Κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης και κινητοποίηση προωθητικών και αντισταθμιστικών μηχανισμών έναντι αυτής, μετά από 24ωρη έκθεση των RT112 και TCCSUP ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στο Bortezomib, όπως αποκαλύπτεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της εκάστοτε πρόδρομης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) μορφής, αν και όπου υπάρχει. (A) Κύρια Κασπάση Τελεστής και Ομοειδή Υποστρώματα αυτής, και (B)

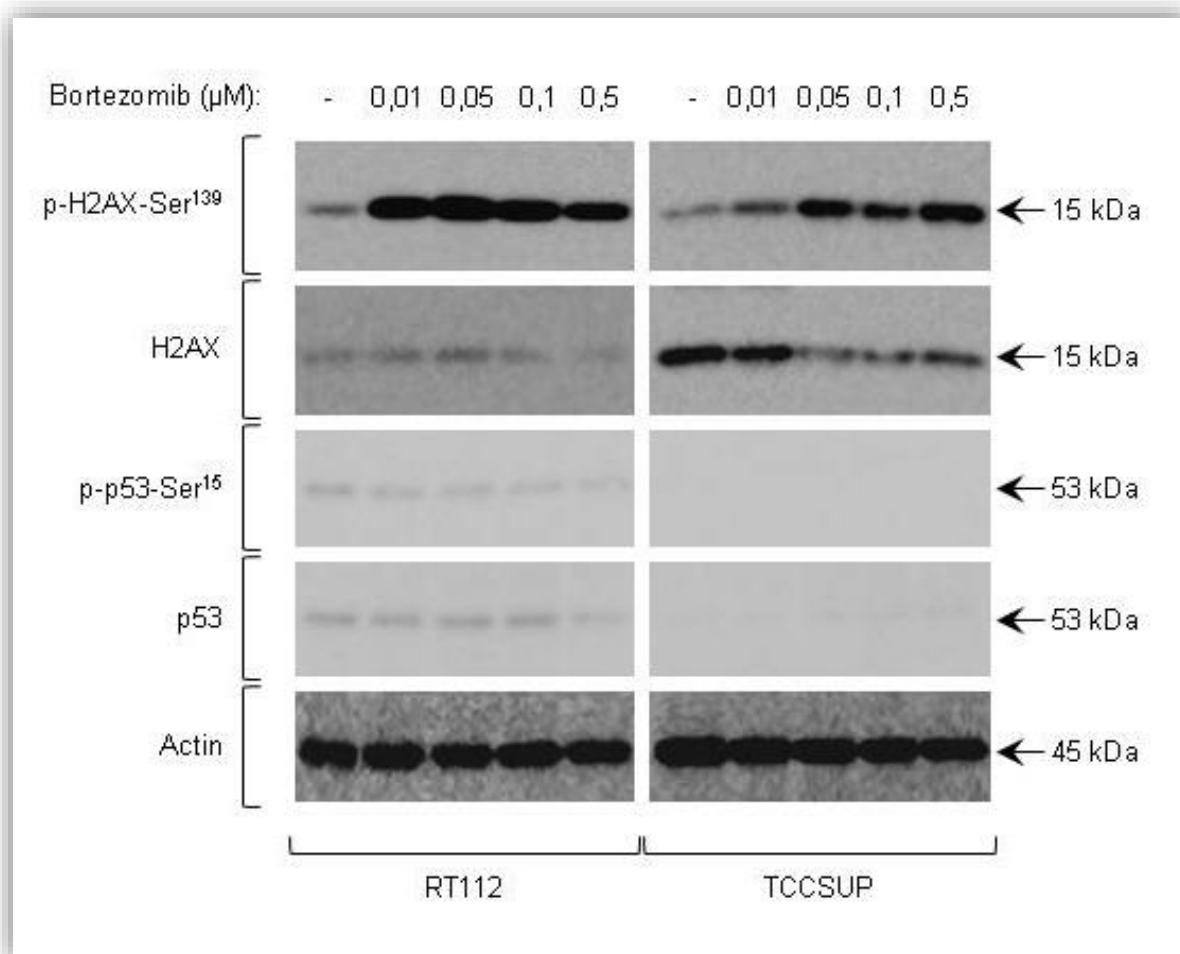
Κρίσιμοι Αντι-αποπτωτικοί Ρυθμιστές, *Caspase*: Κασπάση, *cleaved form*: πρωτεολυμένη μορφή, *Lamin*: Λαμίνη, *Actin*: Ακτίνη και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### **3.2.10 Η επαγωγή του γονιδιωματικού στρες στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP ως απόκριση στο Bortezomib δεν συνοδεύεται από ενεργοποίηση του p53 μεταγραφικού παράγοντα**

Τα συνολικά επίπεδα έκφρασης των H2AX και p53 πρωτεϊνών, καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών, εξετάστηκαν σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT112 και TCCSUP κυττάρων μετά από χορήγηση για 24 ώρες διαφορετικών δόσεων Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ), και τελική επεξεργασία αυτών μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης αντίστοιχων πρωτογενών αντισωμάτων. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.20**, το Bortezomib αποδείχθηκε ικανό να επάγει την ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης, στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη 139 (*Ser*<sup>139</sup>), H2AX ιστόνης (*p-H2AX-Ser*<sup>139</sup>) και στους δύο κυτταρικούς τύπους ως απόκριση στο φάρμακο, γεγονός που αποκαλύπτει την υψηλή γονιδιωματική τοξικότητα του Bortezomib στο κακόηθες ουροθήλιο με τη μορφή δίκλωνων θραύσεων DNA. Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης p-H2AX-Ser<sup>139</sup> πρωτεΐνης ανέδειξε, για μία ακόμα φορά, το μεγαλύτερο βαθμό ευπάθειας των RT112 ως προς τα TCCSUP κύτταρα σε σχέση με το επαγόμενο από το φάρμακο γονιδιωματικό στρες.

Εντυπωσιακά ανιχνεύεται η αδυναμία του p53 μεταγραφικού παράγοντα να σταθεροποιείται και να φωσφορυλιώνεται (ενεργοποιείται), στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη 15 (*Ser*<sup>15</sup>), και στους δύο RT112 και TCCSUP κυτταρικούς τύπους (**Εικόνα 3.20**), σε αντίθεση με ότι παρατηρήθηκε στα RT4 κύτταρα (**Εικόνα 3.12**). Το εν λόγω εύρημα θα μπορούσε να συσχετισθεί άμεσα με την μεταλλαγμένη μορφή της p53 στα TCCSUP, αλλά όχι στα RT112 κύτταρα τα οποία φέρουν φυσικού τύπου αντίστοιχη πρωτεΐνη. Η αδυναμία των RT112 κυττάρων να κινητοποιούν -φυσικού τύπου- p53-εξαρτώμενα μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης μετά από έκθεση αυτών (RT112) στο Bortezomib θα μπορούσε να αποδοθεί σε μηχανισμούς

λειτουργικού ή/και τοπολογικού αποκλεισμού αυτής (p53) από τη δυνατότητά της να «αισθάνεται» και να «ανταποκρίνεται» σε φαινόμενα φαρμακο-γονιδιοματικής τοξικότητας. Είναι, λοιπόν, σαφές ότι το Bortezomib μπορεί και επάγει κυτταροειδικού τύπου γονιδιοματικό στρες, με τη μορφή δίκλωνων σχάσεων DNA, το οποίο δεν συνοδεύεται από παράλληλη εμπλοκή και ενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης ως «φύλακα-προστάτη» (*guardian*) της γονιδιοματικής ακεραιότητας του κακοήθους ουροθηλίου σε συνθήκες στρες (για παράδειγμα, πρωτεασωμική αδρανοποίηση).



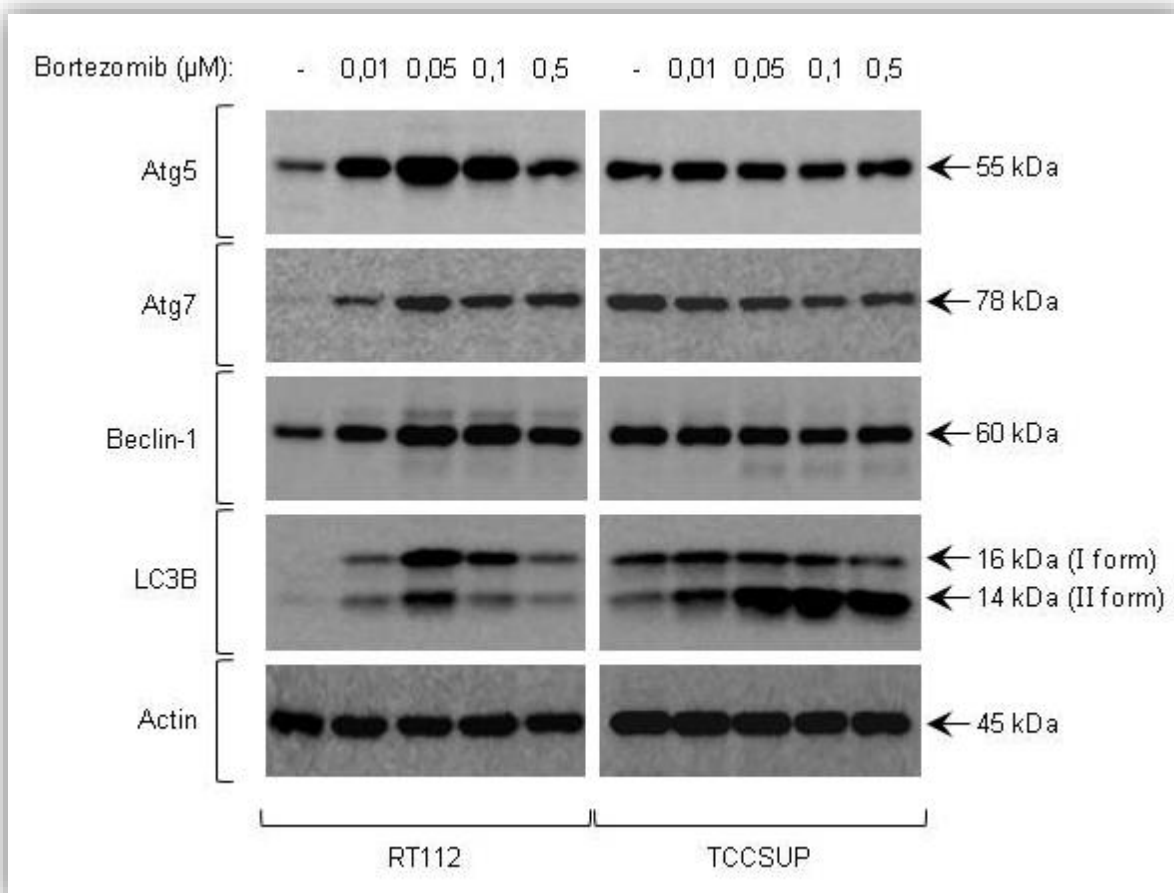
**Εικόνα 3.20** p53-ανεξάρτητη επαγωγή γονιδιοματικής τοξικότητας από την 24ωρη έκθεση στο Bortezomib του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου των RT112 και TCCSUP κυττάρων, όπως αποκαλύπτεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *p*-: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.11 Η διαφορική συμμετοχή του μηχανισμού της αυτοφαγίας ως καθοριστική απόκριση στην κυτταροτοξική δράση του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο των RT112 και TCCSUP κυττάρων

Με σκοπό την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προφίλ έκφρασης κρίσιμων αυτοφαγικών πρωτεϊνών που ελέγχουν καθοριστικά τη βιογένεση και λειτουργία του αυτοφαγισώματος στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από RT112 και TCCSUP κύτταρα αναπτυγμένα παρουσία ή απουσία Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες υποβλήθηκαν σε ανοσο-στύπωμα Western δια μέσου της χρήσης πρωτογενών αντισωμάτων με ειδική ικανότητα αναγνώρισης των Atg5, Atg7, Beclin-1 και LC3B (I/II) αυτοφαγικών πρωτεϊνών. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 3.21**, το Bortezomib εμφανίζεται ικανό να επηρεάζει τον αυτοφαγικό μηχανισμό με έναν αυστηρά κυτταρο-ειδικό και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Ειδικότερα, τα RT112 κύτταρα, μετά από έκθεση αυτών στο Bortezomib, φέρονται να μπορούν να αυξορρυθμίζουν ισχυρά, ακολουθώντας ένα δοσο-εξαρτώμενο προφίλ, τις Atg5, Atg7, Beclin-1 και LC3B αυτοφαγικές πρωτεΐνες, με μέγιστη παρατηρούμενη συσσώρευση καθεμίας εξ αυτών στη δόση φαρμάκου των 0,05  $\mu\text{M}$ . Αντίθετα, τα TCCSUP κύτταρα χαρακτηρίζονται από σταθερά και ουσιαστικά ανεπηρέαστα επίπεδα των Beclin-1 και Atg5, ενώ η Atg7 πρωτεΐνη υπόκειται σε μία δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση ως απόκριση στο φάρμακο. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ισχυρή επαγωγή σχηματισμού της LC3B-II ισομορφής (14 kDa), η οποία στις συγκεντρώσεις των 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$  του Bortezomib παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα αυξορρύθμισης. Είναι, λοιπόν, σαφές ότι ανάλογα με το κατά περίπτωση διαφορικό κυτταρικό περιβάλλον και είδος εφαρμοζόμενου στρες σε αυτό η αυτοφαγία μπορεί να προάγει τον κυτταρικό θάνατο με διαφορετικό κάθε φορά μηχανισμό. Ειδικότερα, όπως παρατηρήθηκε και για τα T24 (**Εικόνα 3.13**), τα συγκριτικά υψηλότερα συστατικά -βασικά- επίπεδα των υπό μελέτη αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα TCCSUP κύτταρα απουσία στρες (0  $\mu\text{M}$  φαρμάκου) ενδέχεται να σχετίζονται άρρηκτα με την απόκτηση του κακοήθους και μεταστατικού χαρακτήρα αυτών (TCCSUP), γεγονός που υποδηλώνει ότι οποιαδήποτε διαταραχή της αυτοφαγικής μηχανής (για παράδειγμα, μειορρύθμιση της Atg7) θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι η



LC3B-II ισομορφή εμφανίζεται να υπερ-εκφράζεται σε εκείνες τις δόσεις φαρμάκου όπου η Atg7 μειορρυθμίζεται, είναι ιδιαίτερα πιθανόν η LC3B να αποτελεί τον κρίσιμο καθοριστικό σηματοδότη για την ενεργοποίηση ενός προγράμματος ενδοκυτταρικής υπερ-αυτοφαγίας [για παράδειγμα «αυτοφαγίας» των αυτοφαγικών συστατικών (Atg7)] που παρουσία Bortezomib καλείται να υπερ-λειτουργήσει ώστε να εξοντώσει το προσβεβλημένο κύτταρο. Όσον αφορά στα RT112 κύτταρα, η έκθεση στο Bortezomib αποδεικνύεται να προκαλεί ισχυρή εμπλοκή του αυτοφαγικού μηχανισμού στην κυτταροτοξική ικανότητα του εν λόγω φαρμάκου, όπως προφανώς αποκαλύπτεται από την έντονη συσσώρευση των υπό εξέταση αυτοφαγικών συστατικών, ενώ η παρατηρούμενη ισχυρή μειορρύθμιση αυτών στην τελευταία και πλέον δραστική δόση φαρμάκου των 0,5  $\mu$ M θα μπορούσε να αντανakλά είτε μηχανισμούς κατάρρευσης ή, αντίθετα, υπερ-λειτουργίας της αυτοφαγικής μηχανής (για παράδειγμα «αυτοφαγία» του αυτοφαγοσώματος) είτε αδυναμία εκχύλισης των εν λόγω πρωτεϊνών στην εκάστοτε πρωτεϊνική παρασκευή (*protein preparation*) λόγω εκτεταμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αυτών τύπου ουμπικουϊτινίωσης.



**Εικόνα 3.21** Διαφορική ρύθμιση συσσώρευσης κρίσιμων αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα RT112 και TCCSUP ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μετά από 24ωρη έκθεση στο Bortezomib, και επακόλουθη εφαρμογή της τεχνολογίας του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη αυτοφαγικών πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *form*: ισομορφή, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### **3.2.12 Απορρύθμιση της λειτουργικής ακεραιότητας κρίσιμων μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP μετά από χορήγηση Bortezomib**

Τα συνολικά επίπεδα έκφρασης θεμελιωδών σηματοδοτικών διαμεσολαβητών τύπου κινάσης σερίνης/θρεονίνης, καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών, στο προσβεβλημένο από το Bortezomib κακόηθες ουροθήλιο, εξετάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων. Ειδικότερα, ουροθηλιακά μονο-ταπήτια RT112 και TCCSUP κυτταρικών πληθυσμών επώαστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ) και τα αντίστοιχα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, μετά από επεξεργασία ανοσο-στυπώματος Western, υποβλήθηκαν σε επώαση με αντισώματα έναντι των Akt, GSK-3 $\beta$ , p44/42 MAPK, p38 MAPK, AMPK $\alpha$  και IKK $\alpha$  κινασών σερίνης/θρεονίνης, καθώς και των ομοειδών φωσφορυλιωμένων τους μορφών. Αποδείχθηκε η ικανότητα του Bortezomib να προκαλεί, κυρίως στα RT112 κύτταρα, μία ισχυρή και δόσο-εξαρτώμενη εμφάνιση ενός Akt-like προϊόντος με μοριακό βάρος  $\sim 40$  kDa, το οποίο αντιπροσωπεύει είτε πρωτεολυτικό θραύσμα της ενδογενούς και άθικτης Akt κινάσης είτε ισομορφή προερχόμενη από φαρμακο-ελεγχόμενο μηχανισμό εναλλακτικού ματίσματος. Το εν λόγω Akt-like πρωτεϊνικό μόριο ενδέχεται να εξασκεί έναν «αρνητικά επικρατή» και κατασταλτικό ρόλο έναντι της ενδογενούς Akt κινάσης ή μία υψηλή και μη-ελεγχόμενη ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης με απώλεια εξειδίκευσης υποστρώματος. Αντίθετα, τα συνολικά επίπεδα έκφρασης της Akt στα TCCSUP εμφανίζονται ουσιαστικά ανεπηρέαστα, με μία ιδιαίτερα ήπια φαρμακο-επαγόμενη

αυξορρύθμιση της Akt-like μορφής, ενώ η συστατικώς φωσφορυλιωμένη μορφή αυτής, p-Akt-Ser<sup>473</sup>, αποκλειστικά παρατηρούμενη στα εν λόγω κύτταρα, και όχι στα RT112, δικαιολογώντας έτσι τον υψηλού βαθμού κακοήθειας και μεταστατικότητας χαρακτήρα τους, φάνηκε να μειορρυθμίζεται μόνο στην τελευταία δόση των 0,5 μΜ του φαρμάκου (**Εικόνα 3.22Α**).

Στην ίδια κατεύθυνση, και αναλύοντας το -κύριο- κατωρροϊκό υπόστρωμα της Akt κινάσης GSK-3β κινάση σερίνης/θρεονίνης, αποκαλύφθηκε η δοσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης μορφής p-GSK-3β-Ser<sup>9</sup> και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με τα TCCSUP να εμφανίζουν εντυπωσιακά υψηλότερα επίπεδα επαγωγίμης έκφρασης αυτής. Η μικρότερου μοριακού βάρους φαρμακο-επαγόμενη πρωτεΐνη των ~42 kDa, προερχόμενη είτε από εκλεκτική πρωτεόλυση είτε από εναλλακτικό μάτισμα, ενδέχεται να μπορεί να αλλοιώνει τις δράσεις της ενδογενούς φωσφορυλιωμένης ομοειδούς κινάσης ή να κατέχει συνεχή και μη-ελεγχόμενη ενζυμική ενεργότητα. Σε σχέση με τα GSK-3β συνολικά επίπεδα έκφρασης, παρατηρήθηκε έντονη και δοσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση αυτών στα RT112, με σταθερά και σχετικά ανεπηρέαστα προφίλ στα TCCSUP κύτταρα, όπου και πάλι ανιχνεύθηκε ο σχηματισμός της GSK-3β-like πρωτεϊνικής μορφής των ~42 kDa (**Εικόνα 3.22Α**). Συμπερασματικά, είναι ίσως, τελικά, οι έντονα φωσφορυλιωμένες μορφές των Akt και GSK-3β κινασών εκείνες που μπορούν και προσφέρουν στα TCCSUP ένα ισχυρό συγκριτικό πλεονέκτημα επιβίωσης ως προς τα RT112 κύτταρα όσον αφορά στην κυτταροτοξική δραστηριότητα του Bortezomib (**Εικόνα 3.18**).

Σε σχέση με την p44/42 MAPK κινάση διαφάνηκε η δυνατότητα του Bortezomib να την αυξορρυθμίζει σημαντικά στα RT112 και να την μειορρυθμίζει αισθητά στα TCCSUP κύτταρα με έναν αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Παρομοίως, τα p-p44/42 MAPK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> επίπεδα έκφρασης αυτής αποκαλύφθηκαν να ελαττώνονται ισχυρά στα 0,05, 0,1 και 0,5 μΜ του Bortezomib στα TCCSUP, ενώ η ανιχνεύσιμη επαγωγή στη δόση των 0,01 μΜ στα RT112 κύτταρα οδηγήθηκε σε εξαφάνιση στις τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε η δυνατότητα των RT112 να αυξορρυθμίζουν ισχυρά τόσο την συνολική όσο και την φωσφορυλιωμένη (p-p38 MAPK-Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) μορφή της p38 MAPK κινάσης, ακολουθώντας πάλι ένα ελεγχόμενο από τη συγκέντρωση φαρμάκου προφίλ. Αντίθετα, τα TCCSUP αποδείχθηκαν ανθεκτικά ως προς την p38 MAPK, ενώ η ανιχνεύσιμη επαγωγή έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής αυτής

στη δόση των 0,01  $\mu\text{M}$  συνοδεύτηκε από αισθητή ελάττωση στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις Bortezomib (**Εικόνα 3.22B**).

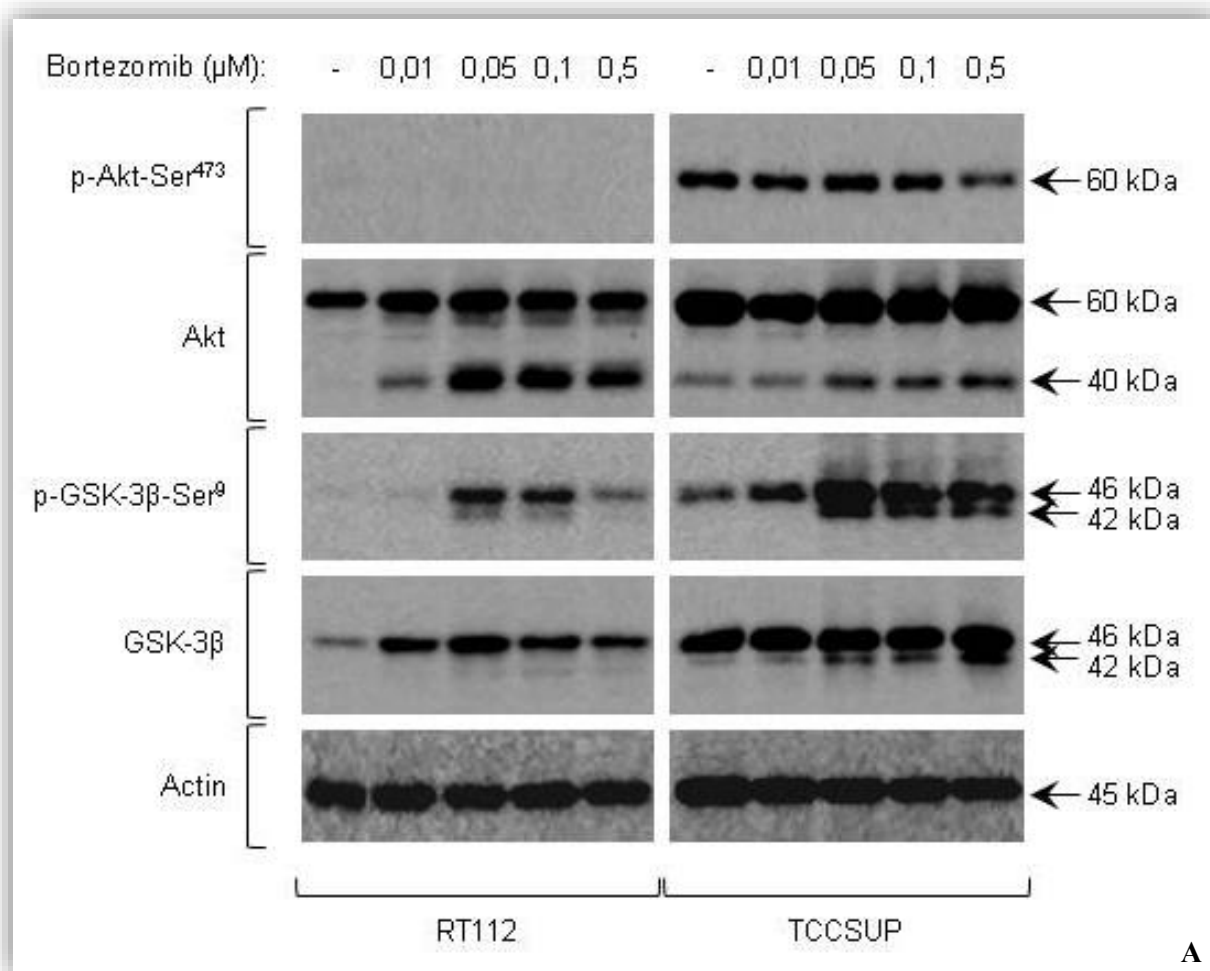
Ομοίως με την Akt, όσον αφορά στην συνολική καθώς και στην φωσφορυλιωμένη (*p*-AMPK $\alpha$ -Thr<sup>172</sup>) AMPK $\alpha$  κινάση σερίνης/θρεονίνης, αποκαλύφθηκε η ικανότητα του Bortezomib να προκαλεί τον δοσο-εξαρτώμενο σχηματισμό ενός μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικού προϊόντος  $\sim 58$  kDa, αποτέλεσμα είτε πρωτεόλυσης είτε εναλλακτικού ματίσματος, ως απόκριση των RT112 κυττάρων στο φάρμακο. Οι εν λόγω AMPK $\alpha$ -like μορφές θα μπορούσαν ενδεχομένως να φέρουν «αρνητικά επικρατείς» λειτουργικές ιδιότητες με δυνατότητες καταστολής δράσης της ενδογενούς, και άθικτης, κινάσης ή, εναλλακτικά, συστατικώς υψηλές, και μη-ελεγχόμενες, ενζυμικές λειτουργίες. Σε αντίθεση, τα TCCSUP κύτταρα φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από δοσο-εξαρτώμενα προφίλ αυξορρύθμισης τόσο της συνολικού τύπου όσο και της φωσφορυλιωμένης μορφής της AMPK $\alpha$  κινάσης, με τον παράλληλο σχηματισμό δύο μικρότερου μοριακού βάρους φαρμακο-επαγόμενων πρωτεϊνικών θραυσμάτων ( $\sim 58$  kDa και  $\sim 55$  kDa), διαταραγμένης ενδεχομένως μοριακής λειτουργίας (**Εικόνα 3.22B**).

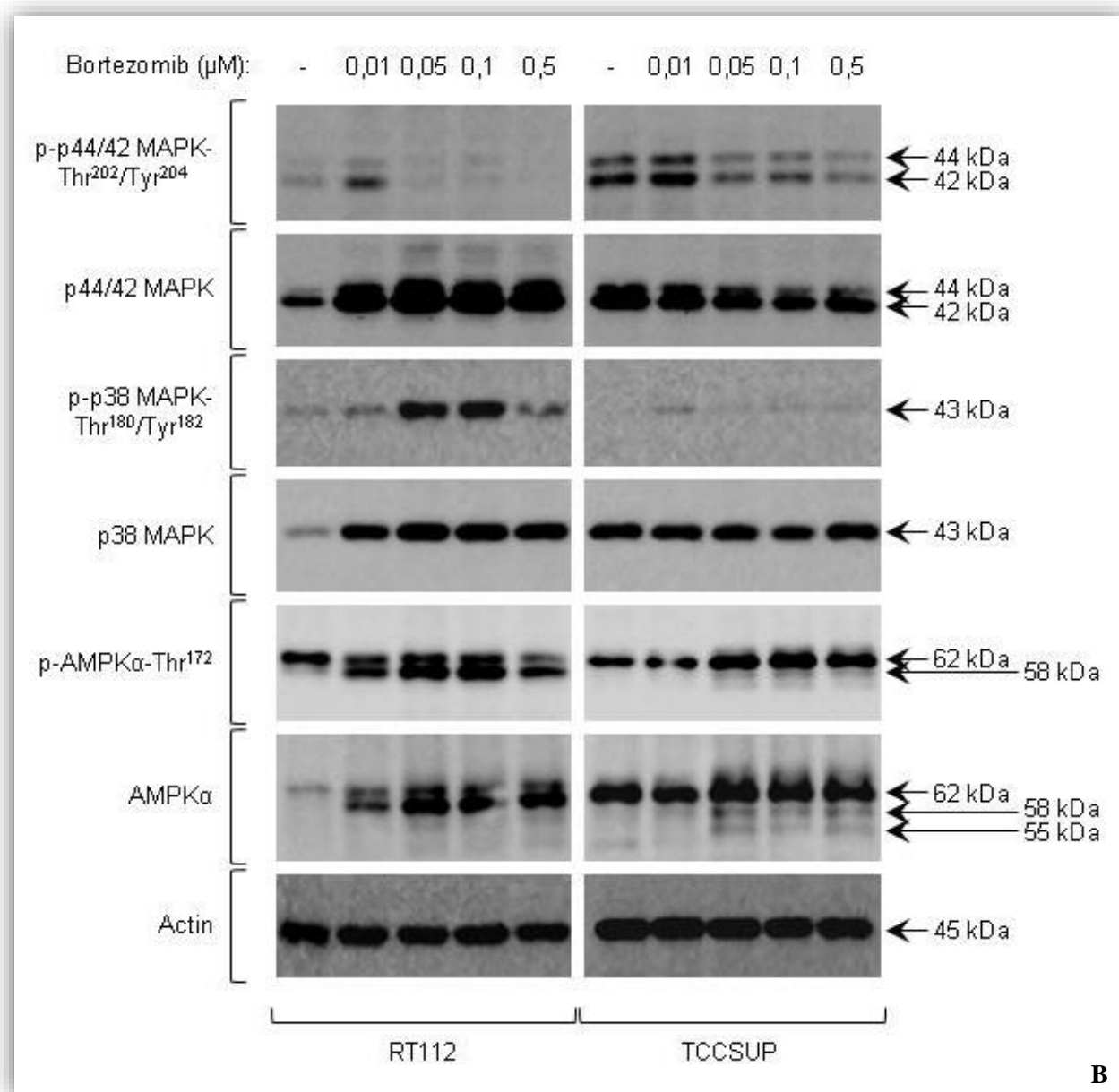
Εντυπωσιακή αποδεικνύεται η διαφορική απόκριση των RT112 και TCCSUP κυττάρων στη δράση του Bortezomib σε σχέση με την δομική ακεραιότητα της IKK $\alpha$  κινάσης σερίνης/θρεονίνης, καθώς και των κατωροϊκών υποστρωμάτων αυτής I $\kappa$ B $\alpha$  και I $\kappa$ B $\beta$ . Όπως αποκαλύπτει η **Εικόνα 3.22Γ**, η έκθεση στο Bortezomib προκαλεί ισχυρό σχηματισμό ενός χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικού μορίου  $\sim 45$  kDa στα RT112 και μία μικρής έντασης επαγωγή ενός ίδιου μοριακού βάρους προϊόντος στα TCCSUP κύτταρα, με πιθανό τρόπο προέλευσης έναν δοσο-ειδικό και φαρμακο-ελεγχόμενο μηχανισμό πρωτεολυτικής υδρόλυσης ή εναλλακτικού ματίσματος. Σε αντίθεση με τα TCCSUP, παρατηρήθηκε έντονη επαγωγή των ενδογενών επιπέδων έκφρασης της IKK $\alpha$  κινάσης στα RT112 κύτταρα στις τρεις μεγαλύτερες δόσεις φαρμάκου, γεγονός που θα μπορούσε να αντισταθμίζει τον ενδεχόμενο ισχυρό παρεμβατικό ρόλο του IKK $\alpha$ -like πρωτεϊνικού μορίου των  $\sim 45$  kDa στην φυσιολογική λειτουργία της άθικτης IKK $\alpha$  κινάσης.

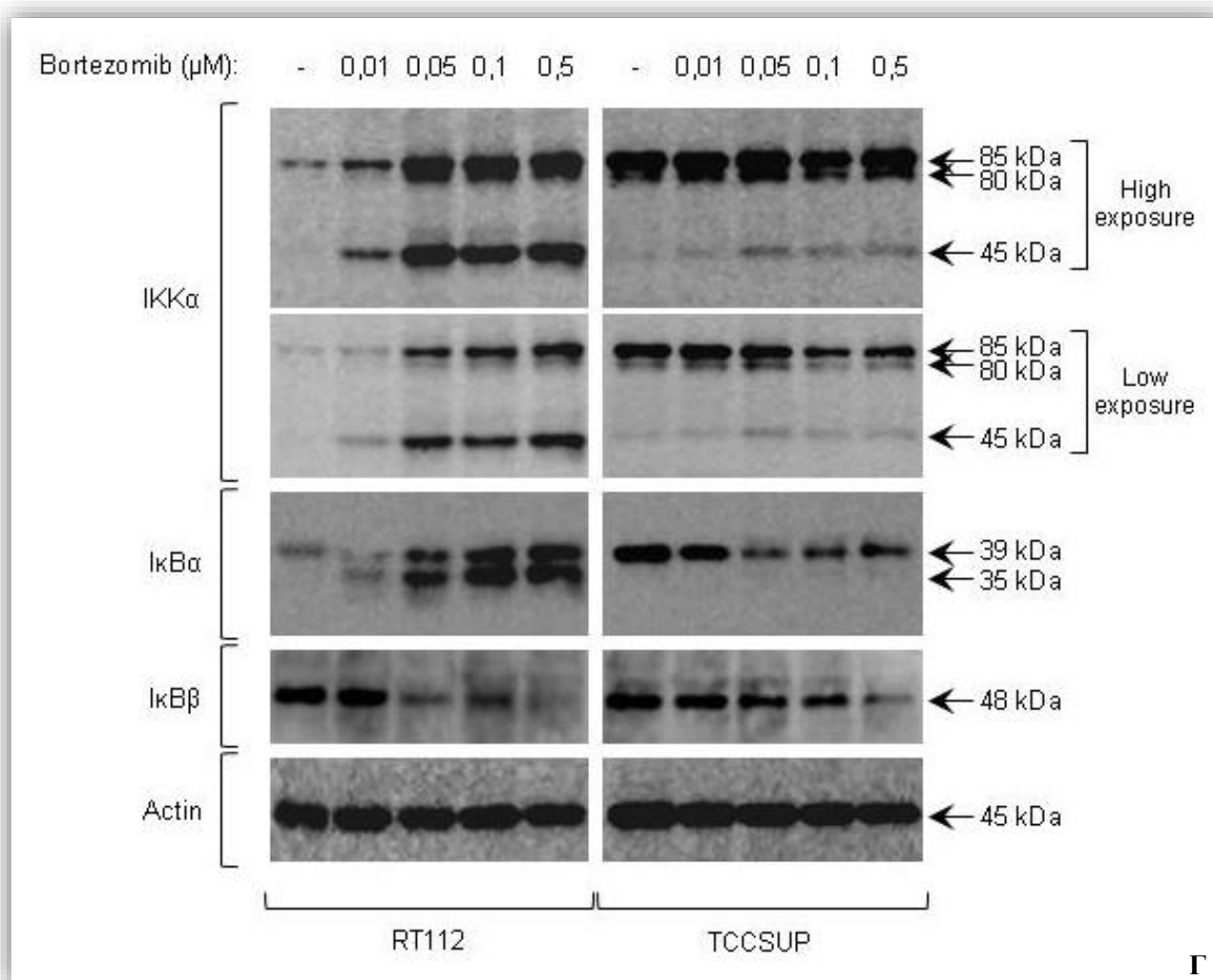
Ομοίως, δείχθηκε η ικανότητα του Bortezomib να οδηγεί όχι μόνο στην αυξορρύθμιση των I $\kappa$ B $\alpha$  συνολικών επιπέδων έκφρασης στα RT112, αλλά και στον σχηματισμό μίας I $\kappa$ B $\alpha$ -like χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικής μορφής  $\sim 35$  kDa (με συμμετοχή ενός μηχανισμού είτε πρωτεόλυσης είτε διαφορεικού ματίσματος),

της οποίας η ενδεχόμενη δραστικά παρεμβατική δραστηριότητα στην λειτουργική δυναμική του ενδογενούς IκBa αναστολέα θα μπορούσε να αντισταθμίζεται ή να ενισχύεται από την εν λόγω παρατηρούμενη φαρμακο-επαγόμενη υπερ-έκφραση της άθικτης IκBa πρωτεΐνης. Αντίθετα, τα TCCSUP κύτταρα φάνηκαν να χαρακτηρίζονται από μία έντονη μειορρύθμιση του IκBa αναστολέα ως απόκριση της έκθεσης στο φάρμακο, με τις τρεις μεγαλύτερες δόσεις να επιδεικνύουν τα υψηλότερα ποσοστά ελάττωσης (**Εικόνα 3.22Γ**). Ο IκBβ αναστολέας ανιχνεύθηκε να ακολουθεί παρόμοια πρότυπα δοσο-εξαρτώμενης μειορρύθμισης και για τους δύο κυτταρικούς τύπους μετά από έκθεση αυτών στο Bortezomib με τα RT112 να εμφανίζονται συγκριτικά περισσότερο ευπαθή από τα TCCSUP κύτταρα στην κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου (**Εικόνα 3.22Γ**).

Συμπερασματικά, καταλήγουμε ότι η σχετική ανθεκτικότητα των TCCSUP στο Bortezomib θα πρέπει να σχετίζεται σθεναρά με: α) τα υψηλά και εν γένει ανεπηρέαστα επίπεδα συστατικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης Akt κινάσης, β) τα ισχυρά φαρμακο-επαγόμενα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης GSK-3β κινάσης και γ) την έντονη φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμιση της AMPKα κινάσης (συνολική και φωσφορυλιωμένη μορφή). Από την άλλη πλευρά, η συγκριτικά υψηλότερη ευπάθεια των RT112 στη δράση του Bortezomib θα μπορούσε να προέρχεται από: α) τον ισχυρό δομικό ακρωτηριασμό της Akt κινάσης, β) την σχετικά μετρίου βαθμού επαγωγή της φωσφορυλιωμένης GSK-3β κινάσης μετά από έκθεση στο φάρμακο, γ) την ισχυρή φαρμακο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης p44/42 MAPK κινάσης, δ) την έντονη φαρμακο-ελεγχόμενη αυξορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK κινάσης, ε) τον δομικό ακρωτηριασμό της φωσφορυλιωμένης (αλλά και συνολικής) AMPKα κινάσης και στ) την απώλεια της δομικής ακεραιότητας των IKKα και IκBa κρίσιμων σηματοδοτικών καθοριστών, ως απόκριση στο φάρμακο.



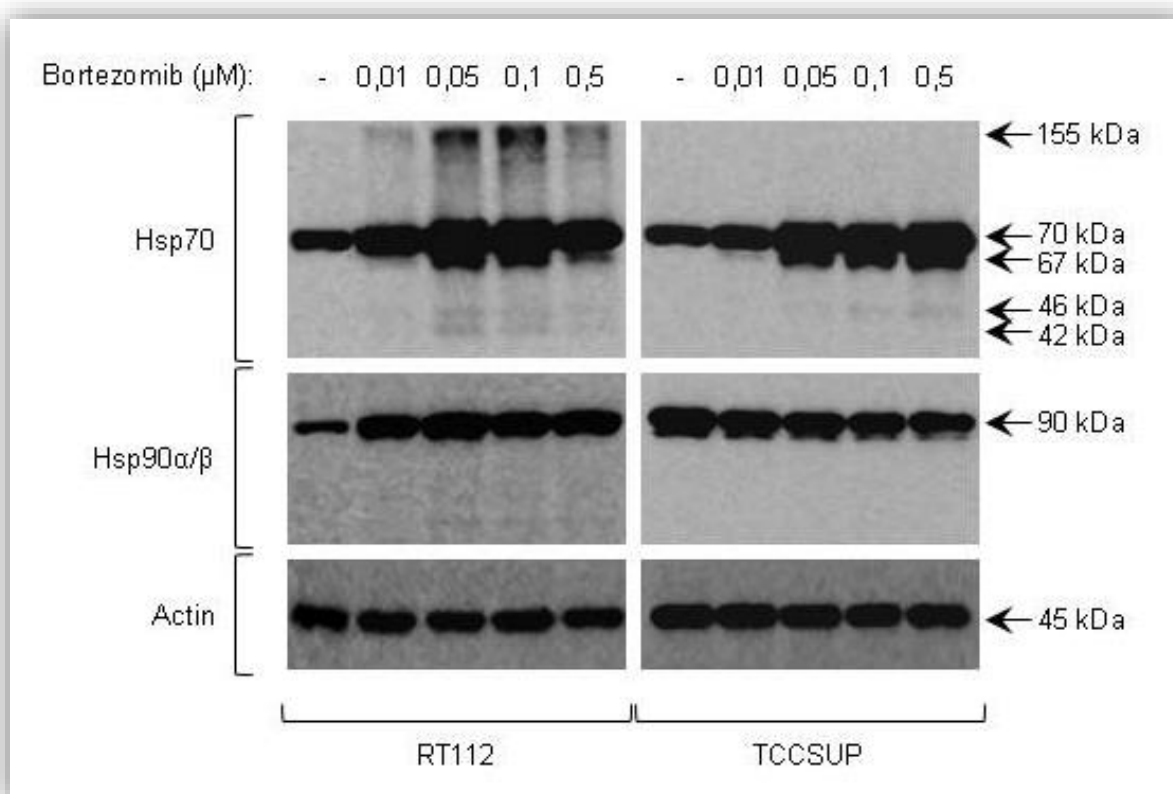




**Εικόνα 3.22** Αλλοιώσεις της λειτουργικής ακεραιότητας κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών στα RT112 και TCCSUP ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου ως αποτέλεσμα της 24ωρης έκθεσης στο Bortezomib, όπως αποδεικνύεται από το ανοσο-στύπωμα Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε- δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. (A) Akt/GSK-3 Σηματοδοτικός Άξονας, (B) MAPK και AMPK Σηματοδοτικοί Άξονες και (Γ) IKK/I $\kappa$ B Σηματοδοτικός Άξονας. *p*-: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Thr*: Θρεονίνη, *Tyr*: Τυροσίνη, *Actin*: Ακτίνη, *High exposure*: Υψηλή έκθεση, *Low exposure*: Χαμηλή έκθεση και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.



Δεδομένου ότι οι μοριακοί συνοδοί Hsp70 και Hsp90 ( $\alpha/\beta$ ) συνιστούν θεμελιώδη συστατικά της λειτουργίας του «συνοδοσώματος» (*chaperosome*), το οποίο διασφαλίζει την χωροταξική διαμόρφωση και την δομική ευστάθεια πλήθους πρωτεϊνών του θηλαστικού πρωτεώματος (*proteome*), ελέγχθηκε η απόκριση των εν λόγω καθοριστών στη δράση του Bortezomib στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο. Ως εκ τούτου, συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT112 και TCCSUP κυττάρων, αναπτυγμένων παρουσία ή απουσία Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5  $\mu\text{M}$ ), για 24 ώρες, υποβλήθηκαν σε ανοσο-στύπωμα Western μέσω χρήσης ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν εκλεκτικά τις Hsp70 και Hsp90 ( $\alpha/\beta$ ) μοριακές συνοδούς. Όπως αποκαλύπτει η **Εικόνα 3.23**, η Hsp70 φάνηκε να αυξορρυθμίζεται ισχυρά με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με επιπρόσθετο χαρακτηριστικό στοιχείο τον σχηματισμό ενός κύριου πρωτεολυτικού -πιθανότατα- θραύσματος μοριακού βάρους  $\sim 67$  kDa, το οποίο ενδεχομένως θα μπορούσε να εμπλέκεται με έναν παρεμβατικά κατασταλτικό τρόπο στη λειτουργία της ενδογενούς Hsp70 πρωτεΐνης. Εντυπωσιακά είναι τα υψηλού μοριακού βάρους ( $\sim 155$  kDa) πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα στα RT112 κύτταρα, τα οποία ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν πολυ-ουμπικουϊτινωμένα πρωτεϊνικά συσσωματώματα (*aggregates*) τοξικής δράσης, προερχόμενα από την αναστολή λειτουργίας του πρωτεασώματος λόγω χορήγησης του Bortezomib. Αντίθετα, η Hsp90 ( $\alpha/\beta$ ) αποδείχθηκε να παραμένει ουσιαστικά ανεπηρέαστη από τη δράση του φαρμάκου στα TCCSUP, ενώ να αυξορρυθμίζεται με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο από την μικρότερη κιάλας συγκέντρωση Bortezomib (0,01  $\mu\text{M}$ ) στα RT112 κύτταρα (**Εικόνα 3.23**). Παρατηρείται, λοιπόν, ότι το Bortezomib δύναται να προκαλεί μία μέτριας εμβέλειας απορρύθμιση του βαθμού έκφρασης, της δομικής ακεραιότητας και, ενδεχομένως, της λειτουργίας του “chaperosome” των RT112 και TCCSUP κυττάρων, συγκριτικά ηπιότερη από την αντίστοιχη των RT4 και T24 κυττάρων (**Εικόνα 3.15**), η οποία θα μπορούσε να σχετίζεται άρρηκτα με την παρατηρούμενη δομική αστάθεια και πρωτεολυτική ευαισθησία αρκετών μελών (για παράδειγμα κινασών) του κακοήθους ουροθηλιακού πρωτεώματος ως απόκριση στο Bortezomib (**Εικόνα 3.22**).

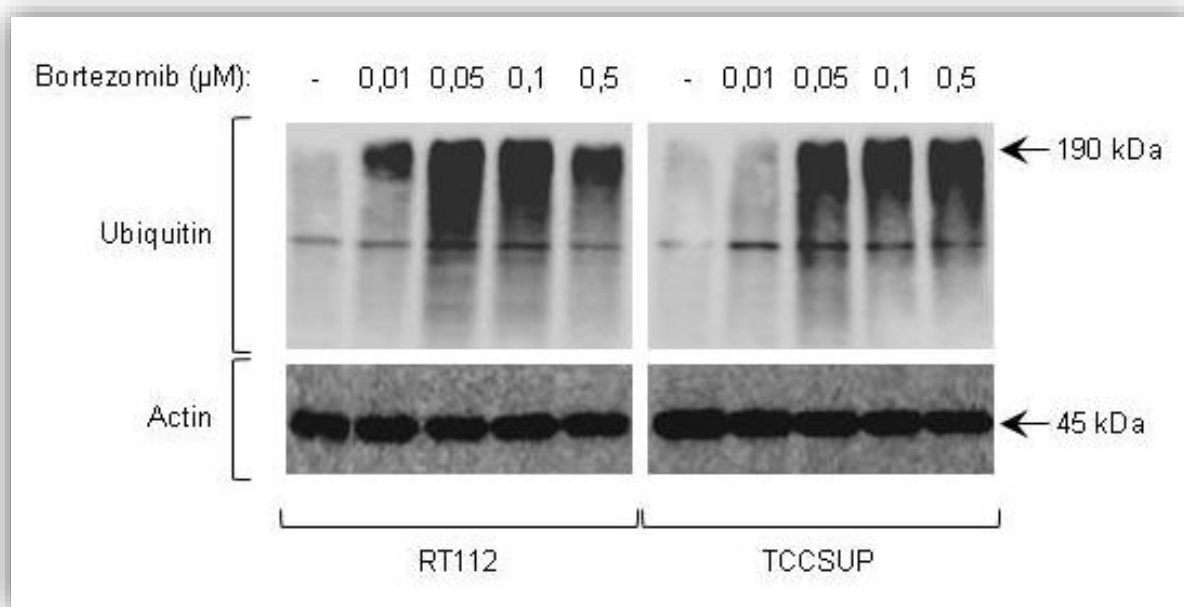


**Εικόνα 3.23** Προφίλ πρωτεϊνικής έκφρασης και δομικής ευστάθειας των μοριακών συνοδών Hsp70 και Hsp90(α/β) μετά από 24ωρη έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP στο Bortezomib, όπως διαφαίνονται μέσω της εφαρμογής του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των τριών υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο των δομικά ανεπηρέαστων όσο και των πρωτεολυτικά επεξεργασμένων (ή διαφορετικά ματισμένων) αντίστοιχων μορφών τους, αν και όπου υπάρχουν. *Actin*: Ακτίνη, *High exposure*: Υψηλή έκθεση, *Low exposure*: Χαμηλή έκθεση και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.2.13 Ισχυρή αναστολή της ενδογενούς ενεργότητας του πρωτεασώματος μετά από έκθεση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης RT112 και TCCSUP στο Bortezomib

Συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT112 και TCCSUP κυττάρων, μετά από 24ωρη έκθεση αυτών στο Bortezomib (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 μM), επεξεργάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και χρήσης ειδικού πρωτογενούς

αντισώματος που αναγνωρίζει εκλεκτικά την ουμπικουΐτινη και ως εκ τούτου το σύνολο των μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων μέσω ουμπικουΐτινίωσης πρωτεϊνών. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.24**, η έκθεση στο Bortezomib οδήγησε στον δόσο-εξαρτώμενο σχηματισμό πολυ-μοριακών συσσωματωμάτων υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία εμφανώς περιείχαν (πολυ-)ουμπικουΐτινωμένες πρωτεΐνες με ενδεχόμενη τοξική δράση και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Η υψηλότερη ευπάθεια των RT112 στο φάρμακο (**Εικόνα 3.18**) αντανακλάται στην εμφάνιση των εν λόγω (πολυ-)ουμπικουΐτινωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στη δόση των 0,01  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου στα υπό μελέτη κύτταρα, γεγονός που δεν ανιχνεύεται στα TCCSUP, ενώ η ισχυρή δημιουργία αυτών (συσσωματωμάτων) στις τρεις μεγαλύτερες δόσεις αναδεικνύει άμεσα τη δυνατότητα του Bortezomib να αναστέλλει δραματικά την αποικοδομητική ενεργότητα του πρωτεασώματος στο περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου των RT112 και TCCSUP κυττάρων.



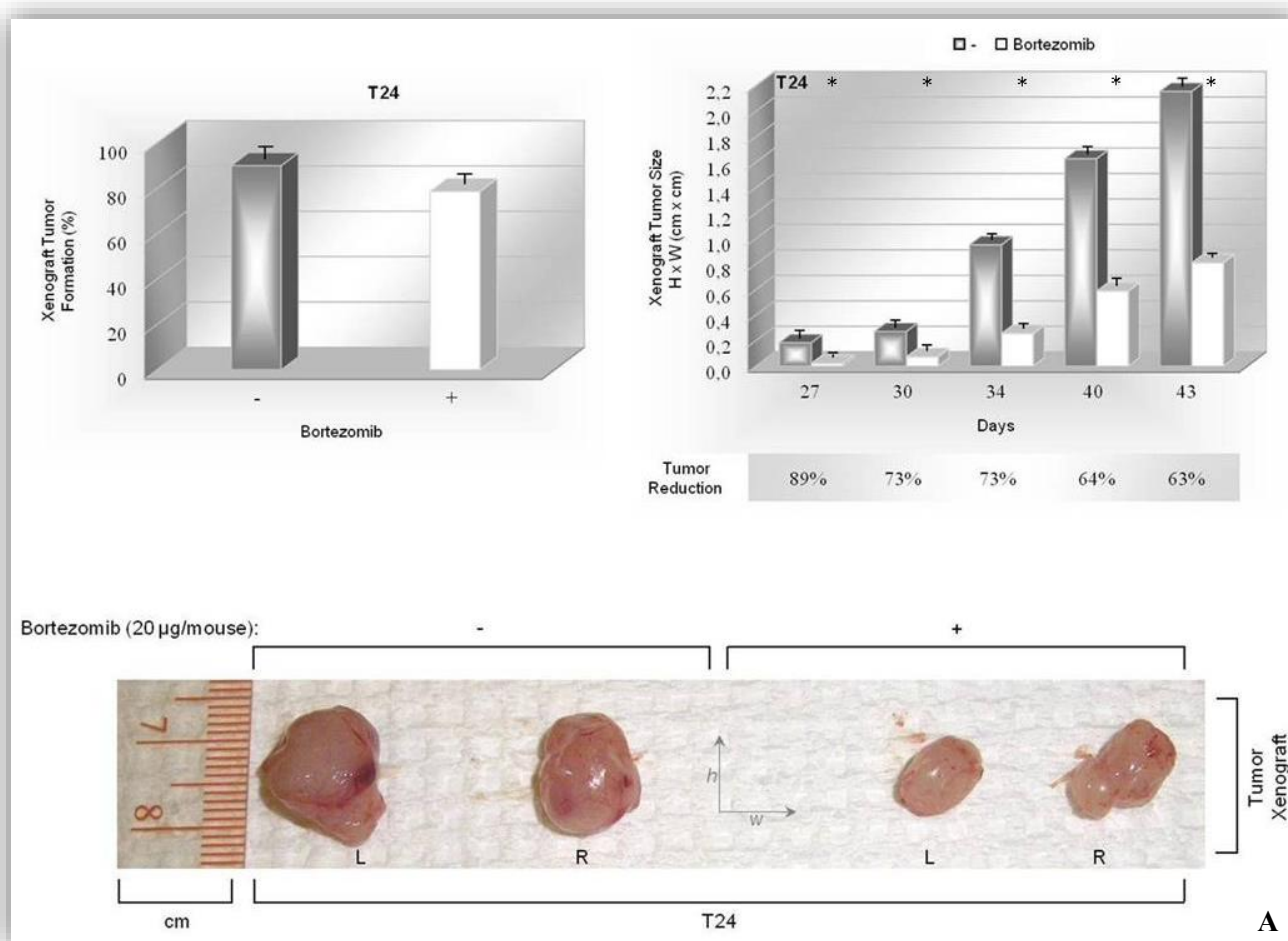
**Εικόνα 3.24** Αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος, ως αποτέλεσμα της 24ωρης δράσης του Bortezomib στα RT112 και TCCSUP κύτταρα του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου, όπως αποκαλύπτεται από το δόσο-εξαρτώμενο ποσοστό εμφάνισης (πολυ-)ουμπικουΐτινωμένων πρωτεϊνών στη μορφή μεγαλο-μοριακών συσσωματωμάτων σύμφωνα με το ανοσο-στύπωμα Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών ή συμπλόκων αυτών, ενώ στο δεξιό της τμήμα τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *Ubiquitin*: Ουμπικουΐτινη, *Actin*: Ακτίνη και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

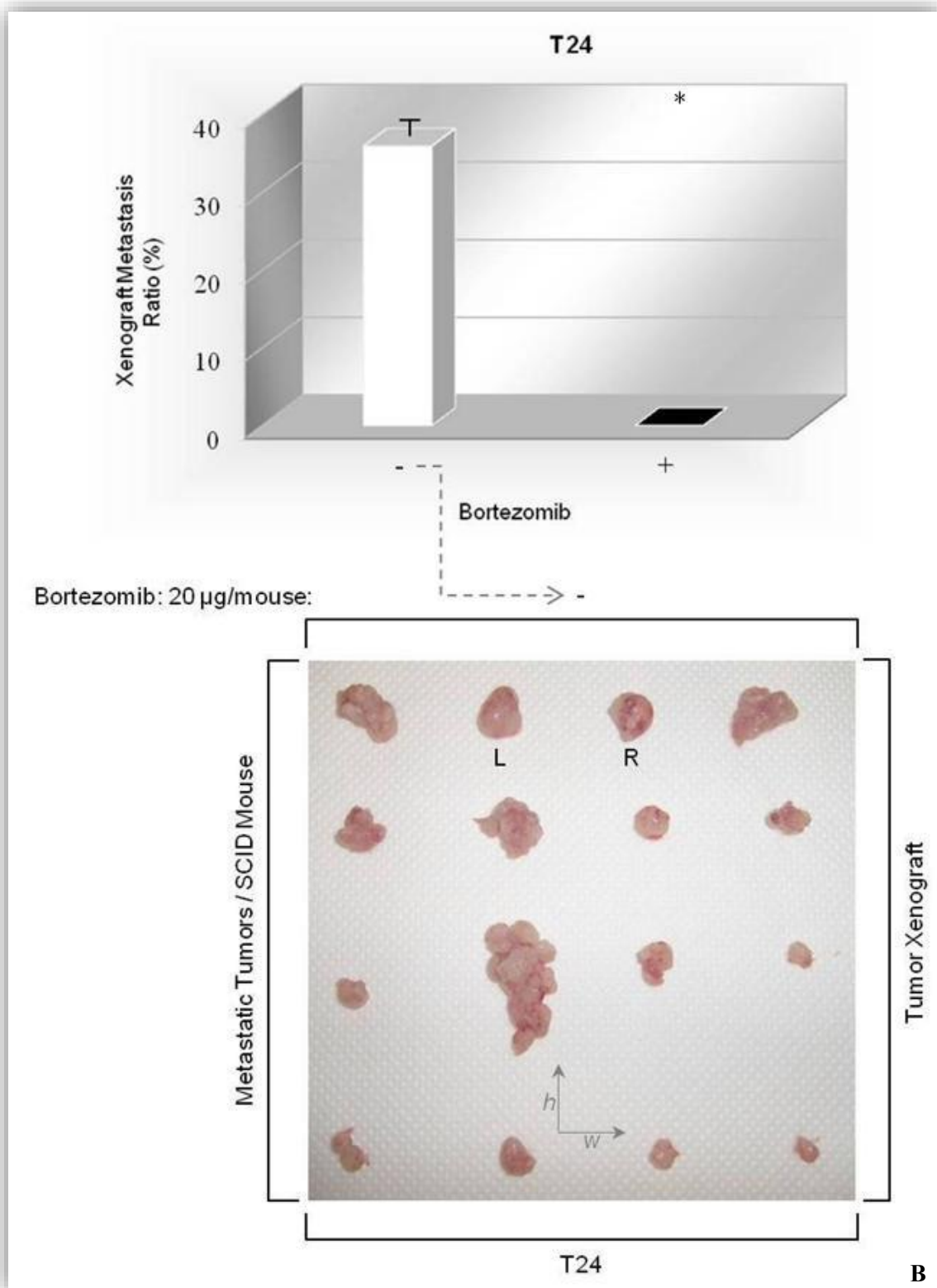
### 3.2.14 *In vivo* θεραπευτική δυναμική του Bortezomib σε πειραματικούς όγκους κακοήθους ουροθηλίου τύπου αλλομοσχεύματος (“Xenograft”) σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς

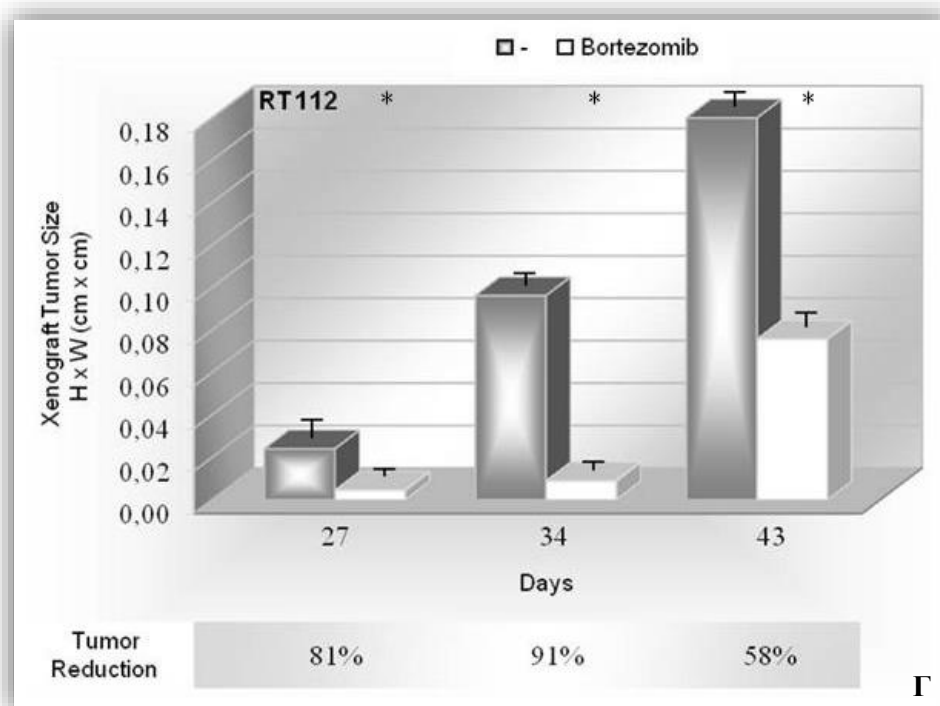
Με στόχο την *in vivo* ανάπτυξη πειραματικών όγκων προερχόμενων από τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης T24 και RT112, SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικοί εμβολιάστηκαν υποδόρια στην μηριαία περιοχή (2 ενέσεις/ποντικό) με το αντίστοιχο κυτταρικό εναιώρημα ( $\sim 10^6$  κύτταρα/ένεση) και η ανάπτυξη του μεγέθους του εκάστοτε όγκου μετριόταν με παχύμετρο ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μέχρι τελικής περιόδου 43 ημερών. Το σύνολο των SCID ποντικών (ίδιας ηλικίας, ίδιου τρόπου τροφικής ανάπτυξης και διαχείρισης, και ίδιας κατανομής ποσοστού αρσενικών/θηλυκών) που ενεσοποιήθηκαν με κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου διαχωρίστηκε σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτήν που το Bortezomib (20  $\mu\text{g}$ /ποντικό) χορηγήθηκε ενδοφλέβια στην ουριαία (*tail-vein*) περιοχή του εκάστοτε SCID ποντικού την ίδια ημέρα ενοφθαλμισμού των καρκινικών κυττάρων (T24 ή RT112) και β) σε αυτήν που ως ουσία αναφοράς χορηγήθηκε ίδιος όγκος (100  $\mu\text{l}$ /ποντικό) ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1X, pH 7,4 (control group). Η μέτρηση με τη βοήθεια παχυμέτρου των εξωτερικών διαστάσεων [ύψος (*h*) x πλάτος (*w*)] του κάθε αναπτυσσόμενου όγκου στην 27<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 34<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup> και 43<sup>η</sup> ημέρα, από τη στιγμή ένεσης των καρκινικών κυττάρων και χορήγησης είτε του Bortezomib είτε του διαλύτη αναφοράς (PBS 1X), αποκάλυψε την ικανότητα του φαρμάκου να επιβραδύνει ισχυρά το χρόνο εμφάνισης και να αποδυναμώνει σθεναρά τον ρυθμό ανάπτυξης των T24 (*grade III*) ανθρώπινων πειραματικών όγκων τύπου “Xenograft” στους υπό μελέτη SCID ποντικούς, σε ποσοστά της τάξης του  $\sim 89\%$ ,  $\sim 73\%$ ,  $\sim 73\%$ ,  $\sim 64\%$  και  $\sim 63\%$ , αντίστοιχα, χωρίς να μειώνει εντυπωσιακά το συνολικό ποσοστό σχηματισμού πρωτογενών όγκων (ανεξάρτητα από το μέγεθος και τον «χρονισμό» ανάπτυξης αυτών) (Εικόνα 3.25Α). Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν και για τα RT112 κύτταρα (*grade I-II*), των οποίων οι πειραματικοί όγκοι τύπου “Xenograft” αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ελαττωμένοι σε μέγεθος ως απόκριση στην *in vivo* δράση του Bortezomib σε ποσοστά που έφθαναν στο  $\sim 81\%$ ,  $\sim 91\%$  και  $\sim 58\%$  για αντίστοιχη περίοδο χορήγησης φαρμάκου 27, 34, και 43 ημερών (Εικόνα 3.25Γ). Ανατομή των SCID ποντικών και φωτογραφική απεικόνιση των αποκτηθέντων όγκων τύπου “Xenograft” που είχαν εκτεθεί στο Bortezomib, σε σύγκριση με τους όγκους

αναφοράς (PBS 1X), για την ίδια ακριβώς χρονική περίοδο, αποκάλυψαν την εντυπωσιακά μειωμένη ανάπτυξη των πρώτων (Bortezomib) ως προς τους δεύτερους (PBS 1X) (Εικόνα 3.25A), γεγονός που αναδεικνύει αδιαμφισβήτητα την *in vivo* ικανότητα του Bortezomib να λειτουργεί ως ένας ισχυρός χημειοθεραπευτικός παράγοντας για την επιτυχή εκρίζωση του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Ένα από τα εντυπωσιακότερα αποτελέσματα των εν λόγω πειραμάτων εστιάζεται στην ισχυρή αντι-μεταστατική δράση του Bortezomib στο κακόηθες ουροθήλιο. Η Εικόνα 3.25B αποκαλύπτει όχι μόνο τη δυνατότητα των T24 κυττάρων να δημιουργούν, απουσία φαρμάκου, δευτερογενείς μεταστατικές εστίες/πυρήνες σε όλη την έκταση της κοιλιακής περιοχής και των εσωτερικών οργάνων ενός τυπικού SCID ποντικού (κάτω πλαίσιο) σε παρατηρούμενο ποσοστό της τάξης του ~36%, αλλά κυρίως την ικανότητα του Bortezomib να καταστέλλει πλήρως (100%) τον μεταστατικό χαρακτήρα των T24 κυττάρων, όπως εμφανώς αποδεικνύεται από την παντελή έλλειψη ανίχνευσης μεταστάσεων σε όλους τους T24-SCID ποντικούς που χορηγήθηκε το φάρμακο (άνω πλαίσιο).







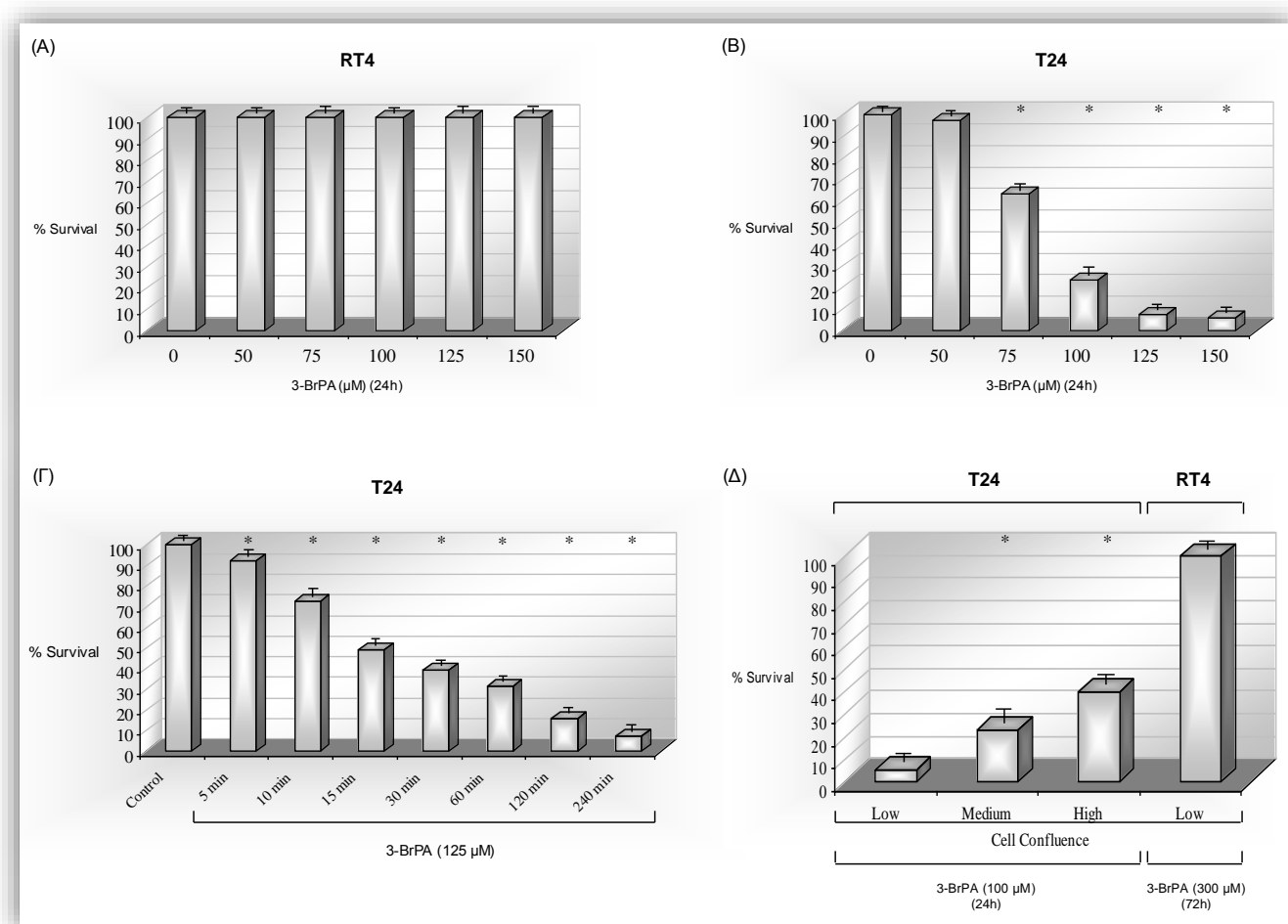
**Εικόνα 3.25** Ογκο-κατασταλτική ικανότητα του Bortezomib *in vivo* σε T24 (*grade III*) (Α και Β) και RT112 (*grade I-II*) (Γ) πειραματικούς όγκους τύπου “Xenograft” (αλλομοσχεύματος) σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς, όπως αποκαλύπτεται (Α) από την ισχυρή μείωση των διαστάσεων ( $h \times w$ ) αναπτυσσόμενων T24 πρωτογενών όγκων παρουσία του φαρμάκου καθ’ όλη την πειραματική περίοδο (άνω και κάτω πλαίσιο), (Β) από την πλήρη εξάλειψη εμφάνισης T24 δευτερογενών μεταστατικών όγκων (άνω και κάτω πλαίσιο) και (Γ) από την δραστική ελάττωση των RT112, αντίστοιχων του (Α), πειραματικών όγκων, ως απόκριση στο Bortezomib. *Xenograft Tumor Formation*: Σχηματισμός Όγκου τύπου Αλλομοσχεύματος, *Xenograft Tumor Size*: Μέγεθος Όγκου τύπου Αλλομοσχεύματος, *Tumor Reduction*: Ελάττωση Όγκου, *Tumor Xenograft*: Όγκος Αλλομοσχεύματος, *Tumor Xenograft Metastasis Ratio*: Ποσοστό Μετάστασης Όγκου Αλλομοσχεύματος, *Metastatic Tumor*: Μεταστατικός Όγκος, *Mouse*: Ποντικός, *Day*: Ημέρα, *L*: Αριστερός, *R*: Δεξιός, *h(H)*: ύψος, *w(W)*: πλάτος,  $\mu g$ : ποσότητα (μάζα) χορηγούμενης δόσης φαρμάκου και *grade*: βαθμός κακοήθειας. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών φαρμακο-επαγόμενης μείωσης διαστάσεων των πρωτογενών όγκων (Α και Γ) και αναστολής ανάπτυξης των μεταστατικών εστιών (Β), σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς.  $P < 0,05$ .

### 3.3 3-BrPA (3-Βρωμοπυροσταφυλικό οξύ)

#### 3.3.1 Το 3-BrPA επάγει κυτταρο-ειδική τοξικότητα και θάνατο σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης

Τα προφίλ επιβίωσης των RT4 (βαθμός κακοήθειας I, φυσικού τύπου p53) και T24 (βαθμός κακοήθειας III, μεταλλαγμένη p53) καρκινικών κυττάρων σε απόκριση στο 3-BrPA εξετάστηκαν με τη δοκιμασία MTT. Σε αντίθεση με τα RT4, τα οποία παρέμειναν αμετάβλητα, παρατηρήθηκε μία ξεκάθαρη και σθεναρή δόσο-εξαρτώμενη ελάττωση της βιωσιμότητας των T24 κυττάρων, με τον βαθμό επιβίωσής τους να μειώνεται περίπου στο 60, 20 και 5% από τις τιμές του δείγματος μάρτυρα (*control*), έπειτα από χορήγηση των συγκεντρώσεων 75, 100 και 125  $\mu\text{M}$  3-BrPA, αντίστοιχα, για 24 ώρες (**Εικόνες 3.26A και 3.26B**). Δεδομένου ότι τα T24 εξαλείφθηκαν σχεδόν παντελώς στη δόση 150  $\mu\text{M}$ , ενώ απεναντίας παρέμειναν ανθεκτικά στη δόση 50  $\mu\text{M}$ , οι δύο αυτές συγκεντρώσεις φαρμάκου παραλείφθηκαν από όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης. Η κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA δύναται να ανιχνευθεί ακόμα και μετά από πέντε λεπτά χορήγησής του στα κύτταρα, ενώ τέσσερις και εικοσιτέσσερις ώρες επώασης με τη δόση 125  $\mu\text{M}$  είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πανομοιότυπων προτύπων μειωμένης επιβίωσης (**Εικόνες 3.26B και 3.26Γ**). Τα T24 καρκινικά κύτταρα, τα οποία αναπτύχθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα δημιουργίας μονοστιβάδας (*confluency*) (~30%), αποδείχθηκαν εξαιρετικά ευάλωτα στην τοξική δυναμική του 3-BrPA, ενώ οι καλλιέργειες υψηλής επικάλυψης υποστρώματος (~90%) αποδείχθηκαν ως μερικώς προστατευόμενες, έπειτα από έκθεση 24 ωρών στο εν λόγω χημειοθεραπευτικό, σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$  (**Εικόνα 3.26Δ**). Ως εκ τούτου, για όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αναλύονται παρακάτω, επιλέχθηκαν καλλιέργειες με μέτρια κυτταρική κάλυψη υποστρώματος, περίπου στο 60%, συμπεριλαμβανομένων και αυτών στις **Εικόνες 3.26A – 3.26Γ**. Προς μεγάλο ενδιαφέρον, διαπιστώνεται ότι το 3-BrPA δεν είναι ικανό να επάγει κυτταρικό θάνατο στα RT4 καρκινικά κύτταρα, ακόμα και μετά από 72 ώρες επώασης με 300  $\mu\text{M}$  φαρμάκου. Συνάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα πως το 3-BrPA ενεργοποιεί ταχύτατα κυτταροτοξικές αποκρίσεις, εξαρτώμενες από το ποσοστό κάλυψης υποστρώματος και τη δόση φαρμάκου, αποκλειστικά στην T24 και όχι στην RT4 καρκινική κυτταρική σειρά ουροδόχου κύστης.

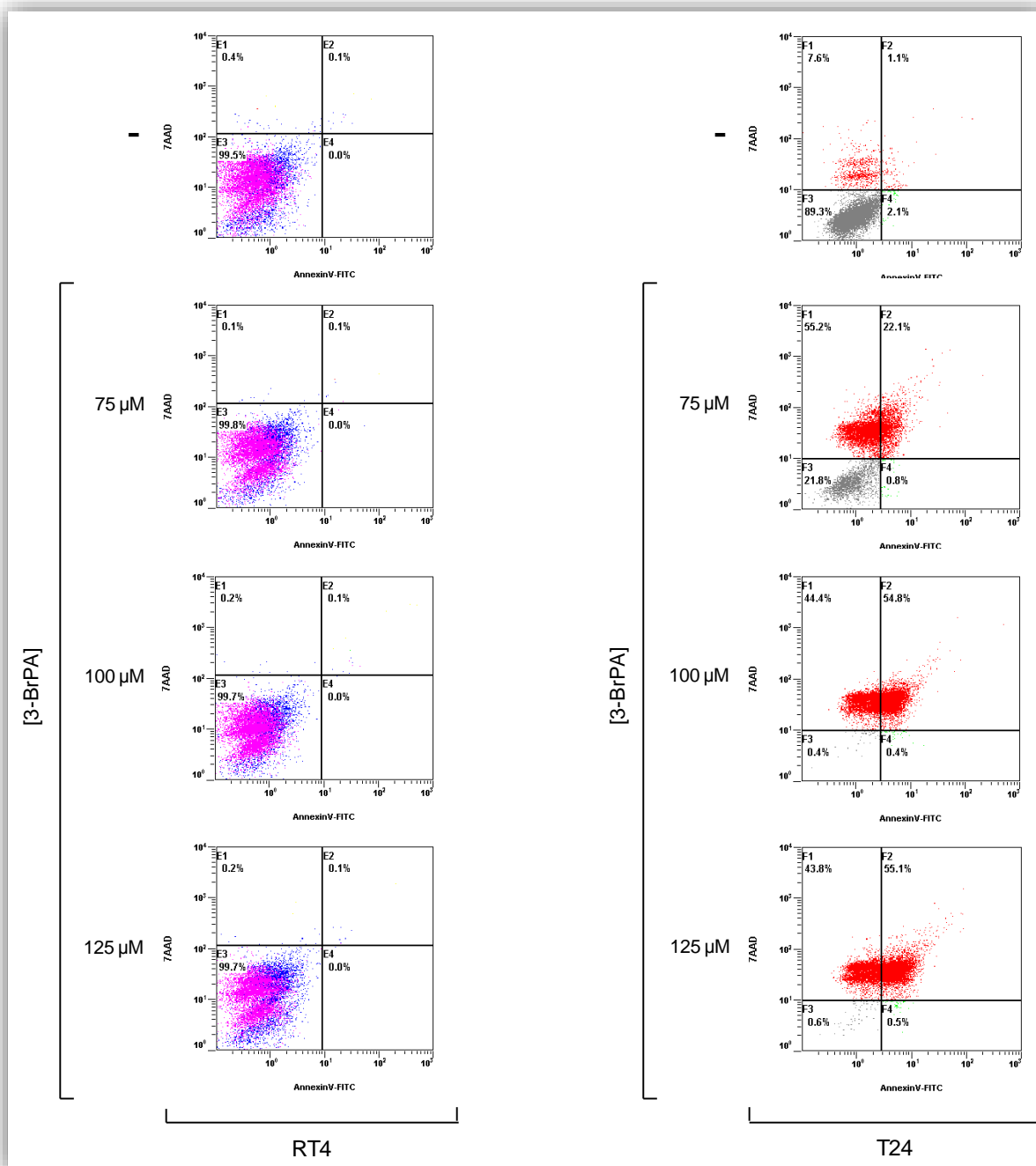




**Εικόνα 3.26** Κυτταροτοξικές επιδράσεις του 3-BrPA στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης RT4 και T24, όπως αποκαλύπτεται μέσω της MTT δοκιμασίας: ισχυρά βαθμο-ειδικές και ταχύτατες αποκρίσεις. (A) RT4 κύτταρα με ~60% πυκνότητα κάλυψης του υποστρώματος και 24ωρη έκθεση στο φάρμακο, (B) T24 κύτταρα με ~60% πυκνότητα κάλυψης του υποστρώματος και 24ωρη έκθεση στο φάρμακο, (Γ) T24 κύτταρα με ~60% πυκνότητα κάλυψης του υποστρώματος επωαζόμενα για διαφορετικούς χρόνους, από 5 – 240 min, στο φάρμακο και (Δ) RT4 και T24 κύτταρα διαφορετικής πυκνότητας κάλυψης του υποστρώματος, διακριτού χρόνου έκθεσης στο φάρμακο και διαφορετικής δόσης 3-BrPA. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *Cell Confluence*: Κυτταρική Πυκνότητα Κάλυψης Υποστρώματος, *Control*: Δείγμα Αναφοράς, *Low*: Χαμηλή, *Medium*: Ενδιάμεση, *High*: Υψηλή, *h*: ώρες, *min*: λεπτά και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ

οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής και των δύο κυτταρικών καρκινικών τύπων (ποσοστό κυτταρικής πυκνότητας ~60%), έπειτα από χορήγηση 3-BrPA για 24 ώρες και κατόπιν χρώσης με AnnexinV-FITC και 7AAD, αποκάλυψε μία δόσο-εξαρτώμενη ισχυρή επαγωγή εμφάνισης T24 κυτταρικών πληθυσμών θετικών στο 7AAD και διπλά θετικών στην AnnexinV-FITC/7AAD. Τουναντίον, σε συμφωνία και με τις κυτταροτοξικές αποκρίσεις (**Εικόνα 3.26**), τα RT4 επέδειξαν αρνητικό πρότυπο χρώσης και για τις δύο χρωστικές, έπειτα από τις ίδιες συνθήκες έκθεσης στο φάρμακο. Όλες οι συγκεντρώσεις 3-BrPA αποδείχτηκε ότι εμφανίζουν διακριτά και δόσο-εξαρτώμενα πρότυπα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, τα οποία αντιπροσωπεύονται από διαφορετικά ποσοστά καταστροφής των T24 κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα θετικά στο 7AAD κύτταρα, στις δόσεις φαρμάκου 75, 100 και 125  $\mu\text{M}$ , τα ποσοστά ανέρχονται στα 55,2%, 44,4% και 43,8%, ενώ στα διπλά θετικά κύτταρα τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 22,1%, 54,8% και 55,1% (**Εικόνα 3.27**). Σε αντιδιαστολή με το 7AAD, το οποίο αναμένεται να διεισδύει εύκολα, εξαιτίας του μικρού μοριακού του μεγέθους, στις διαφορετικές μορφές κατεστραμμένων κυττάρων, η χρωστική AnnexinV-FITC είναι ικανή να διακρίνει την απόπτωση από τη νέκρωση, μέσω της επιλεκτικής της πρόσδεσης στην εκτιθέμενη στην κυτταρική επιφάνεια φωσφατιδυλοσερίνη. Για τον λόγο αυτό, το σχετικά χαμηλό ποσοστό (22,1%) των διπλά θετικών T24 στη δόση 75  $\mu\text{M}$  3-BrPA θα μπορούσε να αντανakλά την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού (η AnnexinV-FITC δεν εισέρχεται στα κύτταρα, αλλά προσδένεται στη φωσφατιδυλοσερίνη η οποία προβάλλει στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη), ενώ οι σημαντικά πιο υψηλές αντίστοιχες ποσοστιαίες αναλογίες (54,8 και 55,1%) στις συγκεντρώσεις φαρμάκου 100 και 125  $\mu\text{M}$  πιθανότατα ενοχοποιούν την εμπλοκή των T24 κυττάρων στη νέκρωση (η AnnexinV-FITC εισέρχεται στα σφοδρώς κατεστραμμένα κύτταρα και αναγνωρίζει τη φωσφατιδυλοσερίνη ποικίλων μεμβρανικών τοπολογιών -εσωτερικά και εξωτερικά- και μοριακών προσανατολισμών).



**Εικόνα 3.27** Κυτταρο-ειδική επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου υπό την 24ωρη δράση του 3-BrPA στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο των RT4 και T24 κυττάρων (~60% πυκνότητα κάλυψης), όπως αποδεικνύεται δια μέσου της FACS τεχνολογίας και χρήσης των 7AAD και AnnexinV-FITC βιομοριακών χρωστικών. *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Η παρουσία των δύο αυτών (μονών και διπλά θετικών) φαρμακο-επαγόμενων προτύπων χρώσης θα μπορούσε να σχετίζεται με διακριτές αποκρίσεις των προσβεβλημένων από το 3-BrPA T24 κυττάρων που αφορούν στον κυτταρικό κύκλο

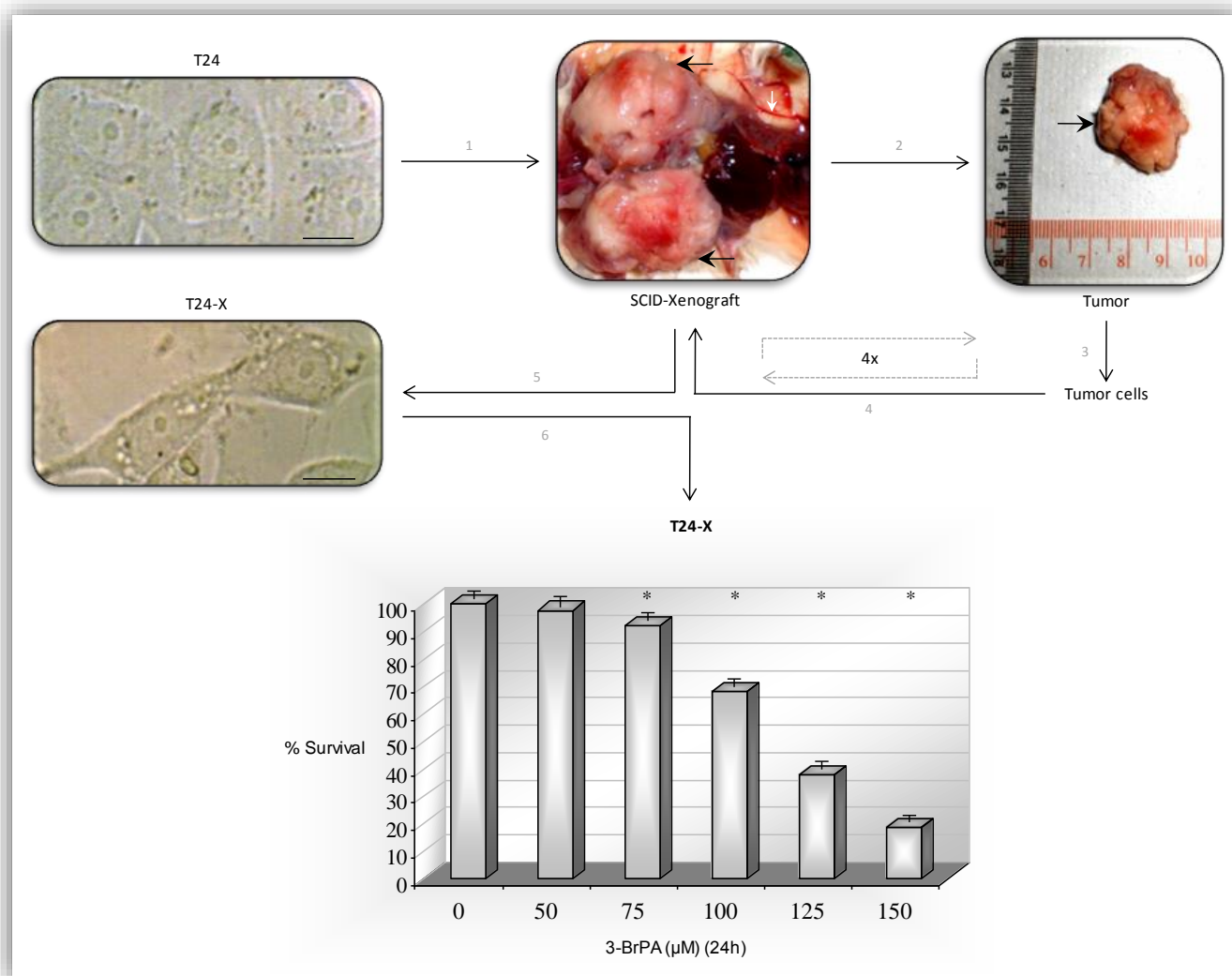
και κυτταρικό θάνατο. Μία ενδεχόμενη υψηλότερη ευαισθησία των T24 μιτωτικών κυττάρων σε σχέση με τα αντίστοιχα μεσοφασικά στο εν λόγω φάρμακο πιθανόν προκαλεί κάλυψη (*masking*) ή εξάλειψη (*depletion*) της φωσφατιδυλοσερίνης, με αποτέλεσμα την απόκτηση αρνητικών στην AnnexinV-FITC φαινοτύπων (θετικών όμως στο 7AAD) (αποκρίσεις μιτωτικών T24 κυττάρων στα 75  $\mu$ M φαρμάκου). Τα αποτελέσματα αυτά επιδεικνύουν την ικανότητα του 3-BrPA να επάγει δόσο-εξαρτώμενα προγράμματα κυτταρικού θανάτου, εκλεκτικά στον T24 αλλά όχι στον RT4 καρκινικό κυτταρικό τύπο.

### 3.3.2 Τα T24-X κύτταρα παρουσιάζουν συγκριτικά μέτρια ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA

Έπειτα από υποδόρια ένεση T24 κυττάρων σε ομάδα έντεκα νεαρών και ανοσο-ανεπαρκών ποντικών (*SCID mice*) επιτράπηκε η ανάπτυξη όγκων και μελέτη αυτών για χρονικό διάστημα 43 ημερών (**Εικόνα 3.28**). Αντιπροσωπευτικοί όγκοι διαχωρίστηκαν και τα κύτταρα που αποσπάστηκαν από αυτούς μεταφέρθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM 1X για διατήρηση και κλωνική ανάπτυξη (*clonal expansion*). Σύμφωνα με τους διεθνώς αποδεκτούς χειρισμούς και την γενετική πρακτική εργαστηριακών ποντικών, τέσσερις διαδοχικές *in vivo* γενεές απαιτούνται συνήθως για την αξιόπιστη εγκαθίδρυση αλλομοσχευμάτων (*tumor “Xenografts”*) και τον επακόλουθο κυτταροβιολογικό χαρακτηρισμό τους. Ενωρήματα καρκινικών κυττάρων μεταμοσχεύθηκαν ακολούθως σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Ο κυτταρικός πληθυσμός που απομονώθηκε από το πέμπτο κατά σειρά αλλομόσχευμα καρκίνου ουροδόχου κύστης (έπειτα από τις τέσσερις ανακαλλιέργειες) καλλιεργήθηκε περαιτέρω και τελικά εδραιώθηκε ως η νέα κυτταρική σειρά ονόματι T24-X (*X: Xenograft*). Απεικόνιση φωτονικής μικροσκοπίας αποκάλυψε ισχυρές μορφολογικές ομοιότητες των T24 και T24-X κυττάρων (**Εικόνα 3.28**), ενώ συγκριτική κυτταρογενετική ανάλυση των αντίστοιχων καρυοτύπων απέδειξε την κλωνική προέλευση των T24-X παραγόμενων κυττάρων από την πατρική T24 καλλιέργεια αυτών (μη-παρουσίασιμα αποτελέσματα).

Η ευαισθησία των T24-X κυττάρων στο 3-BrPA εκτιμήθηκε μέσω της διαδικασίας MTT. Αποδείχθηκε ότι έκθεση αυτών (σε πυκνότητα ~60%) στο

φάρμακο προκαλεί έντονες κυτταροτοξικές αποκρίσεις με τρόπο δόσο-εξαρτώμενο, με τα συνολικά ποσοστά επιβίωσης να ελαττώνονται περίπου στο 65, 35 και 15% σε σύγκριση με τις τιμές του δείγματος μάρτυρα έπειτα από 24ωρη επώαση με τις συγκεντρώσεις 100, 125 και 150  $\mu\text{M}$  3-BrPA, αντίστοιχα (Εικόνα 3.28). Συγκριτικά με τα T24 κύτταρα, τα T24-X εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στο φάρμακο (Εικόνα 3.26B), ενδεχομένως εξαιτίας νέων *in vivo* αποκτηθέντων μεταλλαγών κατά τη διαδικασία της κλωνικής επιλογής (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα).



**Εικόνα 3.28** Εγκαθίδρυση μίας νέας καρκινικής κυτταρικής σειράς ανθρώπινου ουροθηλίου T24-X (X: Xenograft), μετά από 4 διαδοχικούς κύκλους σχηματισμού πειραματικών ουροθηλιακών πρωτογενών όγκων τύπου “Xenograft” (αλλομοσχεύματος) σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς, με εμφανή στοιχεία μέτριας ανθεκτικότητας στην 24ωρη κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA (σε συνθήκες κυτταρικής πυκνότητας  $\sim 60\%$ ) (βλέπε Εικόνα 3.26), όπως αποδεικνύεται δια μέσου της MTT δοκιμασίας. SCID-Xenograft:

Όγκος Αλλομοσχεύματος σε SCID Ποντικό, *Tumor*: Όγκος, *Tumor cells*: Κύτταρα όγκου, *Survival*: Επιβίωση, *h*: ώρες και  $\mu M$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.  $P < 0,05$ . Ράβδοι Μεγέθυνσης: 10  $\mu m$ .

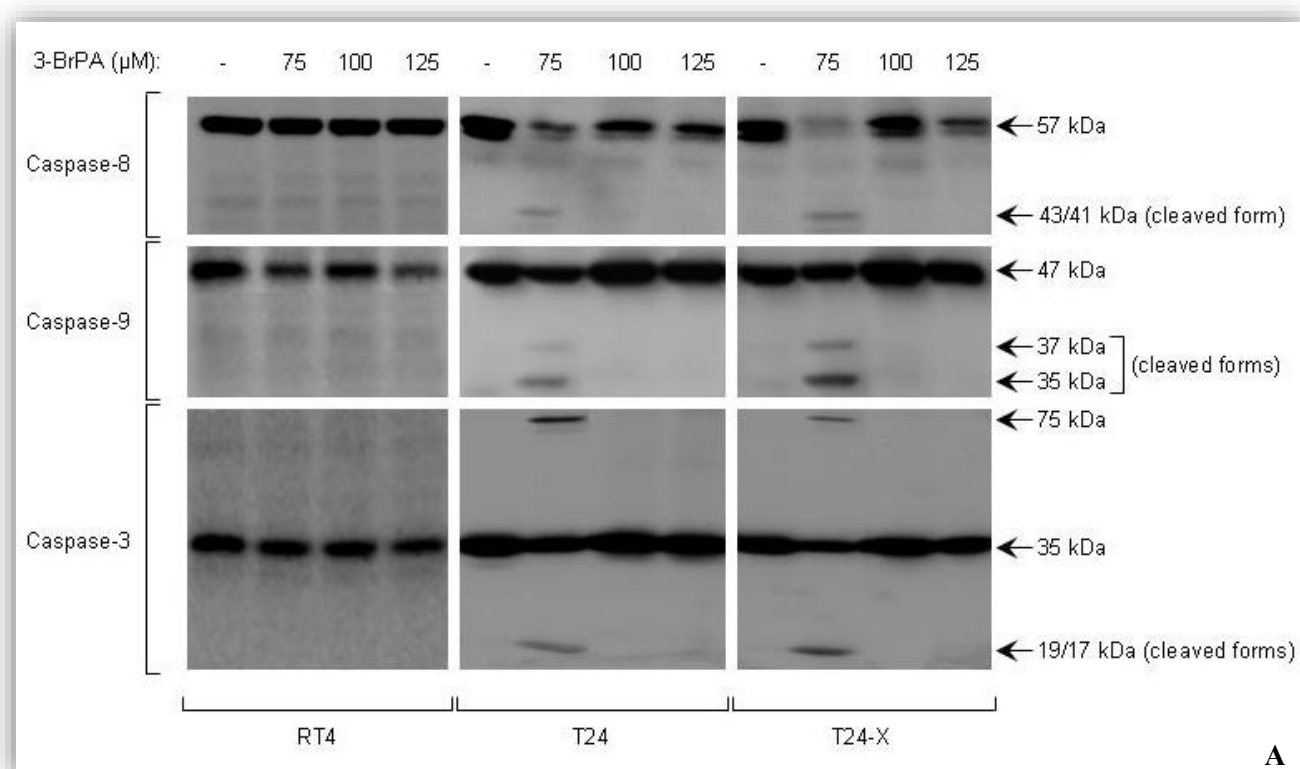
Είναι ενδιαφέρον ότι συγκριτικά υψηλότερη ανοχή των T24-X κυττάρων έχει παρατηρηθεί και υπό την 24ωρη επίδραση άλλων γενετοξικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την Doxorubicin (Δοξορουβικίνη) και την 5'-Fluorouracil (5'-Φθοροουρακίλη) (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα). Διαφαίνεται ότι τα T24-X προερχόμενα από αλλομόσχευμα καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης έχουν αναπτύξει εξισορροπιστικούς μηχανισμούς άμυνας και επιβίωσης ενάντια στην κυτταροτοξική δυναμική του 3-BrPA.

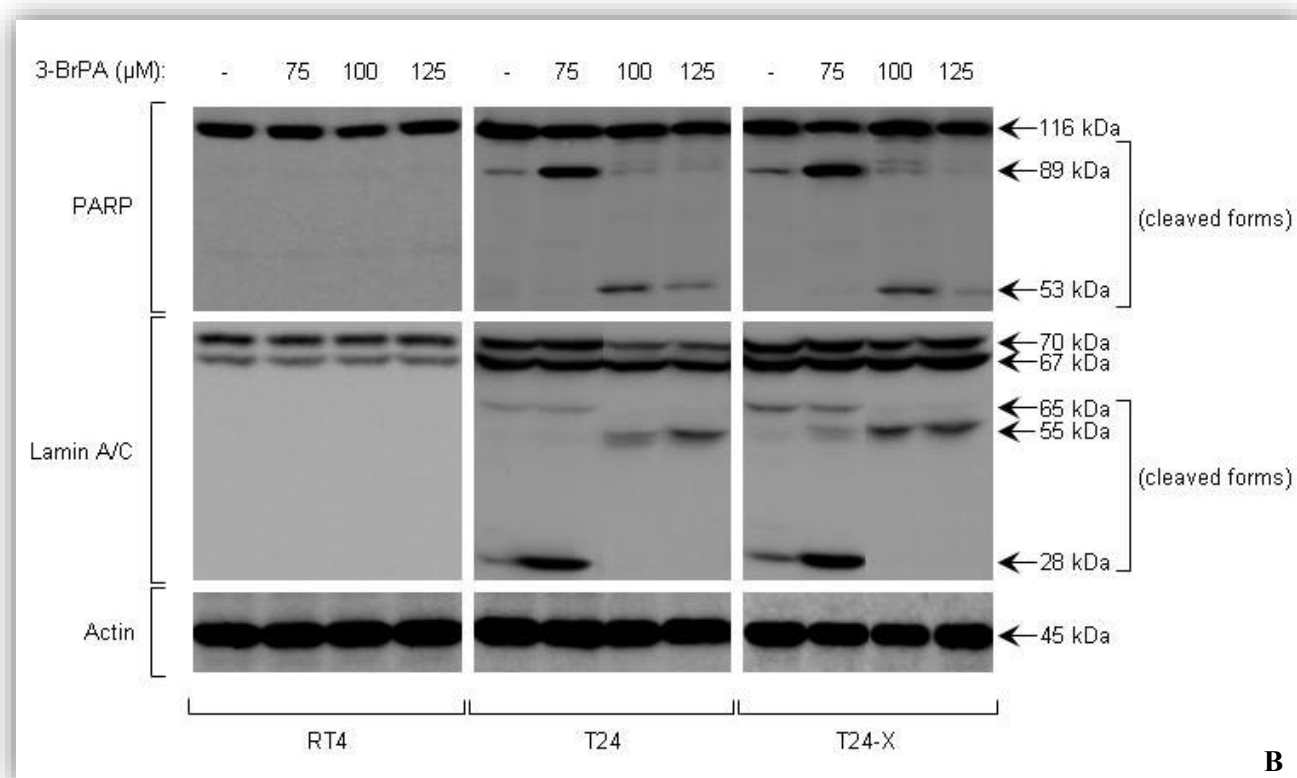
### 3.3.3 Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης υπόκεινται σε επαγόμενο από το 3-BrPA αποπτωτικό και μη-αποπτωτικό θάνατο με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο

Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από επωασμένα στο 3-BrPA για 24 ώρες RT4, T24 και T24-X κύτταρα και από αντίστοιχα δείγματα μάρτυρες (πυκνότητας 60%) επεξεργάστηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα που αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση κρίσιμους αποπτωτικούς ρυθμιστές. Σε αντίθεση με τα RT4 κύτταρα, τα οποία εμφανίζονται ανεπηρέαστα για όλες τις υπό μελέτη αποπτωτικές πρωτεΐνες, έκθεση των T24 και T24-X κυττάρων σε 75  $\mu M$  3-BrPA έχει ως αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση των πρόδρομων -ανενεργών- πρωτεϊνών, και την πρωτεϊνική θραύση -ενεργοποίηση- και των τριών μελών της οικογένειας των Κασπασών (Κασπάση-8, Κασπάση-9 και Κασπάση-3) αποδεικνύοντας ισχυρά την επαγωγή της απόπτωσης (Εικόνα 3.29A).

Σε απόλυτη συμφωνία, τα υποστρώματα του ρεπερτορίου των Κασπασών PARP και Lamin A/C δείχθηκε να ακολουθούν δόσο-εξαρτώμενα πρωτεολυτικά προφίλ, με τη δόση των 75  $\mu M$  να αποτελεί τη μοναδική που δύναται να επάγει τον σχηματισμό των θραυσμάτων 89 και 28 kDa, αντίστοιχα, τα οποία και σχετίζονται με

ενεργοποίηση μηχανισμών αποπτωτικού θανάτου. Προς μεγάλη έκπληξη και ενδιαφέρον, τα παντελώς διαφορετικά πρότυπα θρυμματισμού των πρωτεϊνών PARP και Lamin A/C χαρακτηρίζονται κυρίως από πρωτεολυτικά θραύσματα των περίπου 53 και 55 kDa, αντίστοιχα, τα οποία παρατηρούνται κατόπιν χορήγησης 100 και 125  $\mu$ M 3-BrPA στα T24 και T24-X κύτταρα, προτείνοντας πιθανή εμπλοκή μη-αποπτωτικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (**Εικόνα 3.29B**).



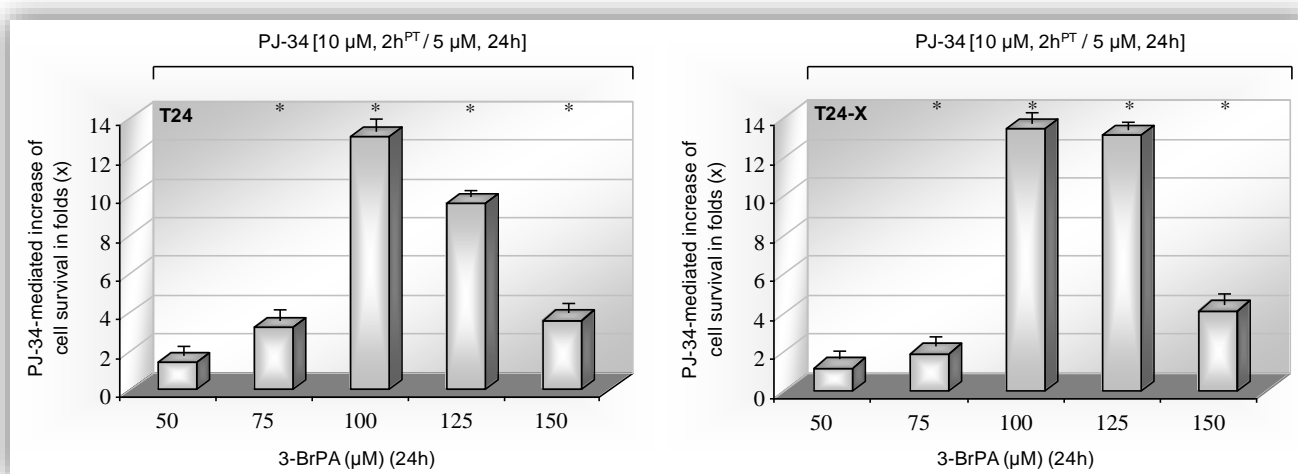


**Εικόνα 3.29** Διαφορική συμμετοχή του ρεπερτορίου των Κασπασών (A) και των ομοειδών υποστρωμάτων αυτών (B) στον επαγόμενο από το 3-BrPA (24 ώρες) αποπτωτικό και μη-αποπτωτικό θάνατο κυττάρων του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου [T24 και T24-X (σε συνθήκες κυτταρικής πυκνότητας ~60%)], όπως αποδεικνύεται από το ανοσο-στύπωμα Western: μία δοδο-εξαρτώμενη απόκριση. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της εκάστοτε πρόδρομης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου υπάρχει. *Caspase*: Κασπάση, *cleaved form*: πρωτεολυμένη μορφή, *Actin*: Ακτίνη, *Lamin*: Λαμίνη και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου του PARP στην υπερ-ενεργοποίηση της προγραμματισμένης νέκρωσης [452], τα T24 και T24-X κύτταρα (~30% κυτταρική πυκνότητα για υπερ-ευαισθητοποίηση στο 3-BrPA) προ-επωάστηκαν για 2 ώρες στο PJ-34 (10  $\mu\text{M}$ ), ειδικό αναστολέα του PARP [452], και οι κυτταροτοξικές αποκρίσεις στις διάφορες δόσεις του 3-BrPA (για 24 ώρες), παρουσία του PJ-34 (5  $\mu\text{M}$ ), εξετάστηκαν μέσω της δοκιμασίας MTT. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.30**, το PJ-34 αποδεικνύεται ικανό να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα επιβίωσης των T24 και



T24-X κυττάρων, στα οποία έχει χορηγηθεί και 3-BrPA, σε ποσοστά περίπου 13 φορές επάνω (*13x folds*) και για τις δύο κυτταρικές σειρές στη δόση 100  $\mu\text{M}$ , και περίπου 9 φορές (*9x folds*) και 12 φορές (*12x folds*) επάνω για κάθε μία αντίστοιχα, στη δόση 125  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, υποδηλώνοντας έντονα τη σχέση και των δύο κυτταρικών τύπων με την, εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη PARP και δόση φαρμάκου, προγραμματισμένη νέκρωση. Τα αποπτωτικά (75  $\mu\text{M}$  3-BrPA) και τα κύτταρα που έχουν πληγεί σφοδρά (150  $\mu\text{M}$  3-BrPA) παρουσιάζονται με αξιοσημείωτα ελαττωμένη PJ-34-μεσολαβούμενη επιβίωση σε απόκριση στο ισχυρό κυτταροτοξικό δυναμικό του 3-BrPA.



**Εικόνα 3.30** Ισχυρή διάσωση των T24 και T24-X ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (~30% κυτταρικής πυκνότητας) από την 24ωρη κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA μετά από έκθεση (προ-επώαση) αυτών στον ειδικό αναστολέα του PARP ενζύμου PJ-34: απόδειξη μηχανισμού επαγόμενης από το 3-BrPA προγραμματισμένης νέκρωσης τύπου «παρθάνατος» (*parthanatos*). Κάθε συγκέντρωση και συνδυασμός φαρμάκων ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *PJ-34-mediated increase of cell survival in folds (x)*: PJ-34-διαμεσολαβούμενη αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε «φορές» της κλίμακας «1-20», *PT (Pre-treatment)*: Προ-επώαση, *h*: ώρες και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών (αυξημένης) βιωσιμότητας σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς.  $P < 0,05$ .

Η πρωτεΐνη ICAD, υπόστρωμα στόχος του ρεπερτορίου των Κασπασών και αναστολέας της CAD νουκλεάσης, υπέστη επίσης πρωτεολυτική σχάση (~12 kDa πρωτεϊνικό θραύσμα) έπειτα από έκθεση των T24 και T24-X κυττάρων σε 75  $\mu$ M 3-BrPA, ενώ ένα «κλιμακωτό» προφίλ (*ladder-resembling profile*) πιθανώς πολυ-ADP-ριβοζυλιωμένων [*poly(ADP-ribosyl)ated*] πρωτεϊνικών μορφών [χωρίς να αποκλείονται και άλλοι τύποι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η πυρουβυλίωση (*pyruvylation*)] ανιχνεύθηκε στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Αντίθετα, η CAD DNάση παρέμεινε αμετάβλητη και στους δύο κυτταρικούς τύπους στη δόση 75  $\mu$ M, ενώ παρουσίασε ισχυρή μειορρύθμιση και πρωτεόλυση με παραγόμενο προϊόν περίπου 20 kDa, ως απόκριση στα 100 και 125  $\mu$ M 3-BrPA (**Εικόνα 3.31A**). Μειωμένα επίπεδα έκφρασης των Bcl-X<sub>L</sub> και Bcl-2 πρωτεϊνών σε όλες τις δόσεις φαρμάκου παρατηρήθηκαν στα T24 κύτταρα, σε σύγκριση όχι μόνο με τα δείγματα μάρτυρες, αλλά και με τα αντίστοιχα επίπεδα των T24-X, υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό τους καθοριστικούς ρόλους των δύο αποπτωτικών καταστολέων στην αποκτώμενη -ισχύ- ανθεκτικότητα των T24-X έναντι της κυτταροτοξικής δραστηριότητας του 3-BrPA. Η υψηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνική ζώνη, σθεναρά επαγόμενη στα 100 και 125  $\mu$ M φαρμάκου, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μία φωσφορυλιωμένη μορφή του Bcl-X<sub>L</sub>, η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία της νέκρωσης και σε μικρότερο βαθμό της απόπτωσης και για τους δύο κυτταρικούς τύπους (**Εικόνα 3.31A**).

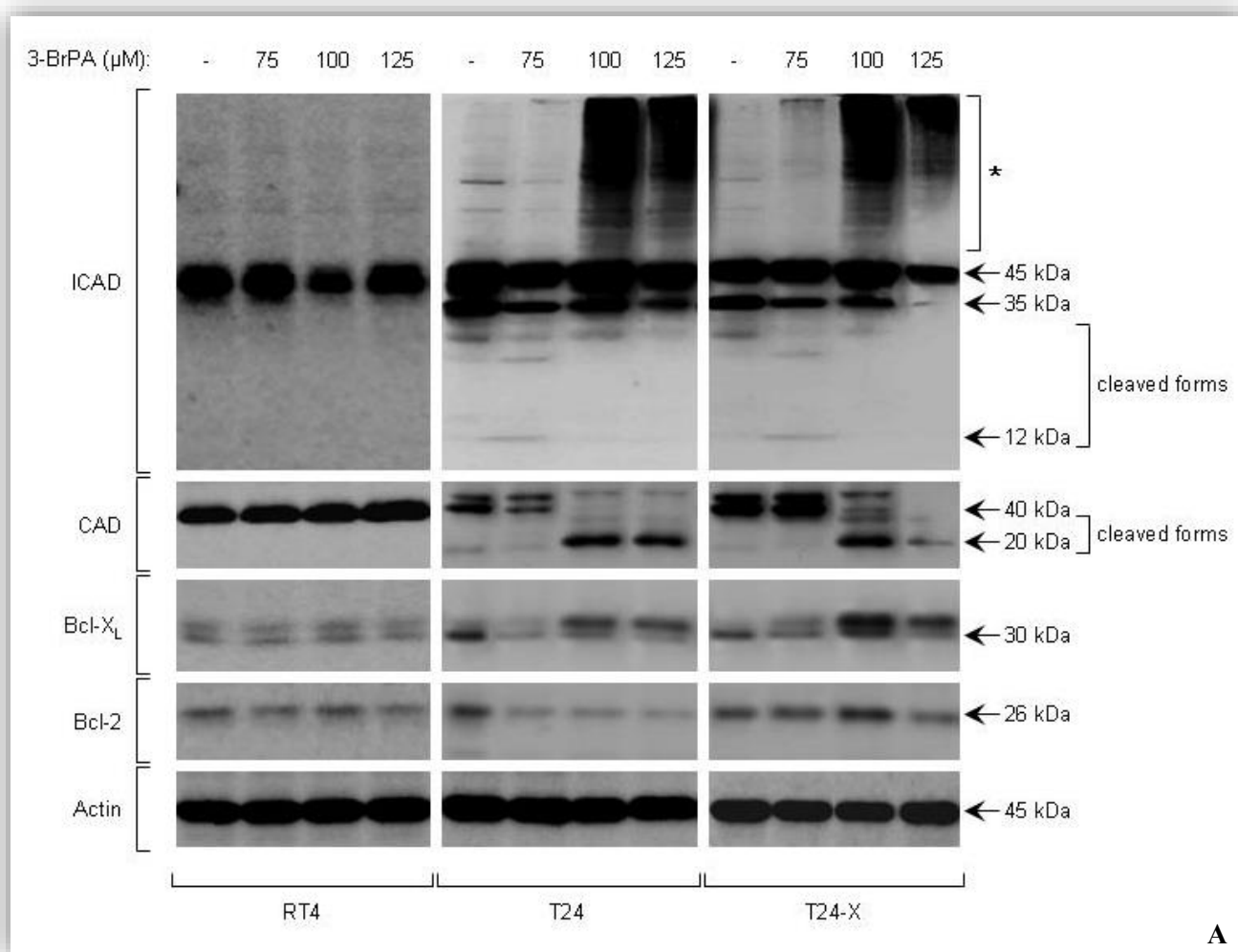
Εκχυλίσματα ολικού (*total*) RNA συλλέχθηκαν έπειτα από 24ωρη έκθεση των κυττάρων RT4, T24 και T24-X (κυτταρικής πυκνότητας ~60%) σε διαφορετικές δόσεις 3-BrPA και εξετάστηκαν οι μεταγραφικές ενεργότητες (ή/και σταθερότητες παραγόμενων RNA μεταγράφων) γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, δια μέσου της ημι-ποσοτικής (*sq: semi quantitative*) RT-PCR τεχνολογίας χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους ολιγο-εκκινητές (**Πίνακας 3.3**).

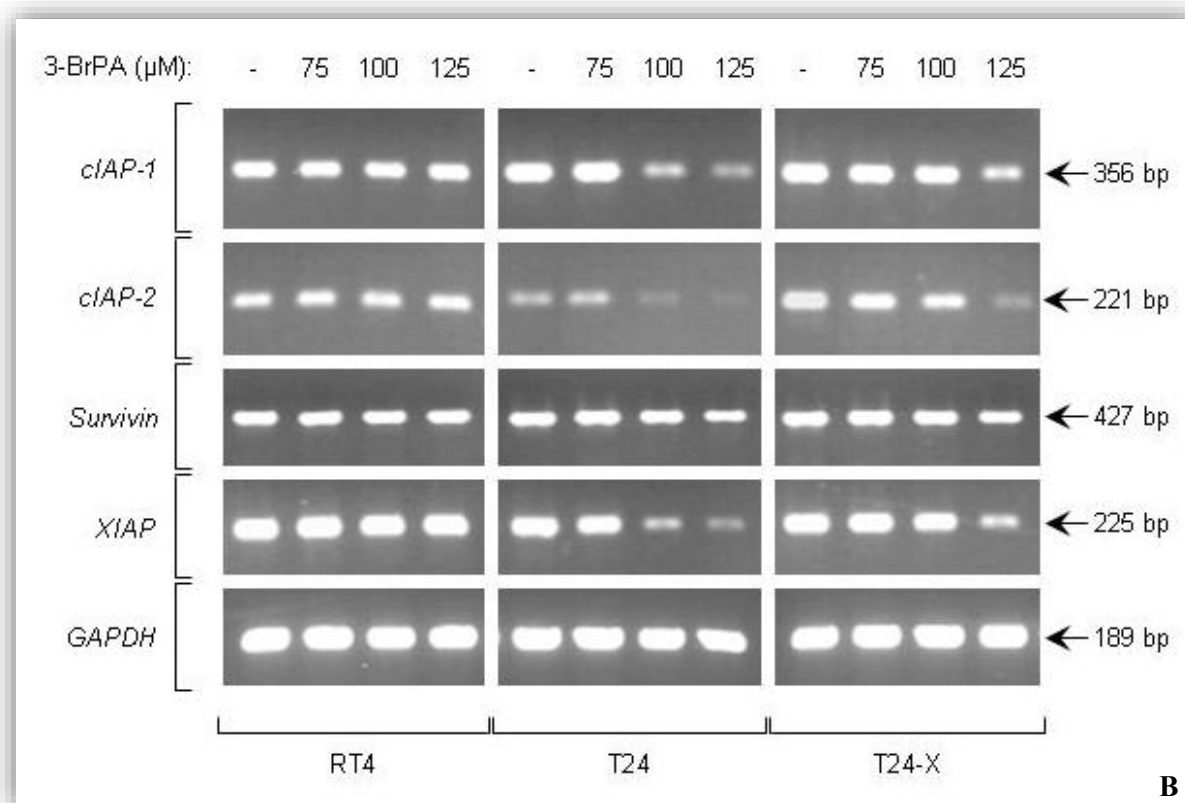
**Πίνακας 3.3** Παραθέτονται τα ονόματα των γονιδίων, οι αλληλουχίες των ολιγο-εκκινητών *Forward (F)* (Πρόσθιος) και *Reverse (R)* (Ανάστροφος), τα μοριακά μεγέθη (*bp: base pairs*) των προϊόντων της PCR και οι συνθήκες (*Ta* και ο αριθμός των κύκλων) της PCR για τα γονίδια που εξετάστηκαν. *Gene Name*: Όνομα Γονιδίου, *Primer Sequence*: Αλληλουχία Ολιγο-Εκκινητή, *Length of PCR Product*: Μήκος PCR Προϊόντος, *Ta*: Θερμοκρασία Επαναδιάταξης και *Number of Cycles*: Αριθμός Κύκλων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

	Gene Name	Primer Sequence	Length of PCR Product	T <sub>a</sub>	Number of Cycles
1.	<i>clAP-1</i>	F: 5'-GCC TTT CTC CAA ACC CTC TT- 3' R: 5'-CAT TCG AGC TGC ATG TGT CT- 3'	356	55°C	30
2.	<i>clAP-2</i>	F: 5'-GCA GCC ACT GTA TTC AGA AAC- 3' R: 5'-TTG CAT ACT ACT AGA TGA CCA C- 3'	221	57°C	30
3.	<i>Survivin</i>	F: 5'-GAG CTG CAG GTT CCT TAT C- 3' R: 5'-ACA GCA TCG AGC CAA GTC AT- 3'	427	55°C	30
4.	<i>XIAP</i>	F: 5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA- 3' R: 5'-GTC CTT GAA ACT GAA CCC CA- 3'	225	55°C	30
5.	<i>Rab2a</i>	F: 5'-CAC TTG ACA ACC TGG TTA G- 3' R: 5'-GAA GCA GTC TTA GCA GAC G- 3'	176	54°C	30
6.	<i>Rab8a</i>	F: 5'-ACC TGT TCA AGC TGC TGC TG- 3' R: 5'-CGT TGT GAT CGT CCG AAA CC- 3'	206	57°C	30
7.	<i>Rab14</i>	F: 5'-TGG CAA CTG CAC CAT ACA AC- 3' R: 5'-CCT AAA TCG CTC CTG TCC TG- 3'	221	55°C	30
8.	<i>Glut1</i>	F: 5'-GTC ACC ATC CTG GAG CTG TT- 3' R: 5'-GAA GGC CGT GTT GAC GAT AC- 3'	192	57°C	30
9.	<i>Glut2</i>	F: 5'-CTT GGA TGA GTT ATG TGA GC- 3' R: 5'-GAC TTT CCT TTG GTT TCT GG- 3'	292	53°C	32
10.	<i>Glut3</i>	F: 5'-GTC GGA CTC TTC GTC AAC C- 3' R: 5'-CCA ATA ACC AAG CGA CCC AG- 3'	143	57°C	30
11.	<i>Glut4 exons 1-2</i>	F: 5'-GTC GGG CTT CCA ACA GAT AG- 3' R: 5'-CCA AGG GAA AGT TCA GCG TC- 3'	321	57°C	33
12.	<i>Glut4 exons 1-3</i>	F: 5'-GTC GGG CTT CCA ACA GAT AG- 3' R: 5'-TTC TGA GGG GCA TTG ATG AC- 3'	143	55°C	33
13.	<i>Glut4 exons 2-3</i>	F: 5'-AGT GTT TCG AGG ACC GGA G- 3' R: 5'-TTC TGA GGG GCA TTG ATG AC- 3'	205	55°C	33
14.	<i>Glut4 intron 2-3</i>	F: 5'-ACT ACC TTC CTG CCC TCC TC- 3' R: 5'-CTG CCT TGC CTA CCT ATC TG- 3'	334	57°C	33
15.	<i>Glut4 exons 3-4</i>	F: 5'-GAC CCT GGT CCT TGC TGT G- 3' R: 5'-TTC CAA GCC ACT GAG AGA TG- 3'	257	55°C	33
16.	<i>Glut4 exon 4-intron 4/5</i>	F: 5'-CAG AGC TAC AAT GAG ACG TG- 3' R: 5'-AGA CAG AGT GAG GCT GTG AG- 3'	247	57°C	33
17.	<i>Glut4 exons 4-5</i>	F: 5'-GAA CAG AGC TAC AAT GAG AC- 3' R: 5'-GAG CAT TTC ATA GGA GGC AG- 3'	258	55°C	33
18.	<i>Glut4 exons 5-7</i>	F: 5'-CCA TGC TGG TCA ACA ATG TC- 3' R: 5'-CGA GAT TCT GGA TGA TGT AG- 3'	378	55°C	33
19.	<i>Glut4 exons 7-8</i>	F: 5'-AGT CCC TCC TGG GCA CTG- 3' R: 5'-GCA GCA CGA CCG CAA TGA- 3'	306	53°C	33
20.	<i>Glut4 exons 8-9</i>	F: 5'-TGT TTC TGG AGT GCT GGC TG- 3' R: 5'-CGA GAC CAA GGT GAA GAC TG- 3'	265	57°C	33
21.	<i>Glut4 exons 9-10</i>	F: 5'-GAC CAG CAT CTT CGA GAC AG- 3' R: 5'-GGA GCA GAG CCA CAG TCA TC- 3'	188	57°C	33
22.	<i>Glut4 exons 10-11</i>	F: 5'-CAT GTG TGG CTG TGC CAT CC- 3' R: 5'-CTG TGT GAT GCC CAC CTC TG- 3'	306	58°C	33
23.	<i>Glut4 exons 10-11</i>	F: 5'-CGG ACG CTC CAT CTC CTG- 3' R: 5'-GCC AAT GAT GAA GTT GCT CG- 3'	258	55°C	33
24.	<i>Glut4 exons 11-12</i>	F: 5'-AGC GAG TTC CAG CCA TGA G- 3' R: 5'-AAG AGA GGG TGT CCG GTG- 3'	344	55°C	33
25.	<i>G6PD</i>	F: 5'-CTA CGA GCG CCT CAT CCT G- 3' R: 5'-GTA GGT GCC CTC ATA CTG G- 3'	214	55°C	32
26.	<i>FasL</i>	F: 5'-CTC TGG AAT GGG AAG ACA CC- 3' R: 5'-ACC AGA GAG AGC TCA GAT ACG- 3'	325	57°C	40
27.	<i>K-Ras</i>	F: 5'-GGC CTG CTG AAA ATG ACT GA- 3' R: 5'-GTC CTG CAC CAG TAA TAT GC- 3'	162	55°C	30
28.	<i>B-Raf 15</i>	F: 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA- 3' R: 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A- 3'	224	56°C	30
29.	<i>GAPDH</i>	F: 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC- 3' R: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC- 3'	189	55°C	28

Εν αντιθέσει με τα RT4 κύτταρα, τα οποία παρέμειναν απρόσβλητα, τα T24 επέδειξαν ισχυρή μειορρύθμιση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων *cIAP-1*, *cIAP-2* και *XIAP* στις δόσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, αλλά όχι στη συγκέντρωση 75  $\mu\text{M}$ . Εντούτοις, ένα άλλο γονίδιο καταστολέας της απόπτωσης, το *Survivin*, επηρεάστηκε συγκριτικά ασθενέστερα από τη δράση του 3-BrPA, υποδεικνύοντας έτσι την ικανότητα του φαρμάκου να παρεμποδίζει τη μεταγραφή με γονιδιο-ειδικό τρόπο. Με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε ότι τα T24-X εν συγκρίσει με τα T24 κύτταρα χαρακτηρίζονται από σαφώς πιο αυξημένα -συστατικά (*constitutive*)- επίπεδα *cIAP-2* μεταγράφων απουσία 3-BrPA και σχετικά λιγότερο μειωμένες μεταγραφικές ενεργότητες των γονιδίων *cIAP-1*, *cIAP-2*, *XIAP* και *Survivin* σε όλες τις δόσεις φαρμάκου (Εικόνα 3.31B). Οι ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο αποκρίσεις έναντι του 3-BrPA θα μπορούσαν να συνδέονται με την υψηλότερη αντοχή των T24-X στην κυτταροτοξική ισχύ του εν λόγω φαρμάκου σε σχέση με τα T24 καρκινικά κύτταρα (Εικόνες 3.26 και 3.28).





**Εικόνα 3.31** Εμπλοκή κρίσιμων προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών καθοριστών στην διαφορική εκτέλεση του αποπτωτικού και μη-αποπτωτικού θανάτου ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (~60% κυτταρικής πυκνότητας) ως απόκριση στην 24ωρη δράση του 3-BrPA, όπως αποδεικνύεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western (A) και ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας (B). Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (A) και γονιδίων (B), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” της εκάστοτε πρόδρομης και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) (\*) πρωτεϊνικής μορφής, αν και όπου υπάρχει (A) και τα μοριακά μεγέθη σε bp των υπό εξέταση γονιδιακών PCR προϊόντων (B). *cleaved form*: πρωτεολυμένη μορφή, *Actin*: Ακτίνη, *bp* (*base pair*): ζεύγος βάσεων και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Συνολικά, το 3-BrPA αποδεικνύεται ικανό να επάγει απόπτωση δια μέσου ενεργοποίησης του ρεπερτορίου των Κασπασών στη δόση 75  $\mu\text{M}$  και προγραμματισμένη νέκρωση μέσω ενεργοποιημένου PARP στις δόσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$  στα T24 και T24-X, αλλά όχι στα RT4, κύτταρα. Η διαφορική ευαισθησία των T24 και T24-X κυτταρικών σειρών στο 3-BrPA φαίνεται ότι περιλαμβάνει τις αντι-

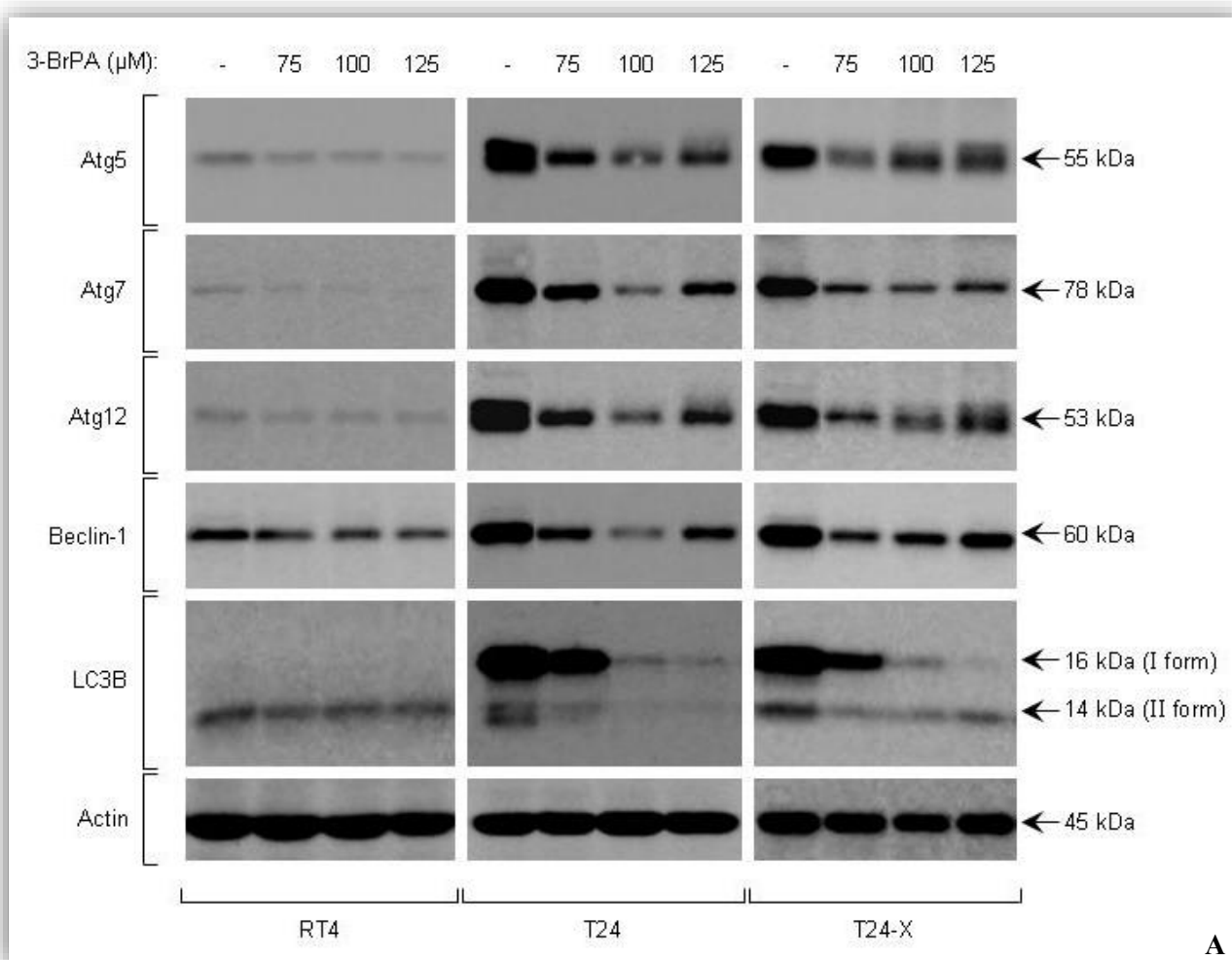
αποπτωτικές λειτουργίες των Bcl-2 και Bcl-X<sub>L</sub>, καθώς επίσης και τις μεταγραφικές ενεργότητες των *cIAP-1*, *cIAP-2*, *XIAP* και *Survivin* που σχετίζονται με την καταστολή της απόπτωσης, υποστηρίζοντας επίσης την δυναμική συμμετοχή όλων αυτών και στην εκτέλεση του προγράμματος της νέκρωσης.

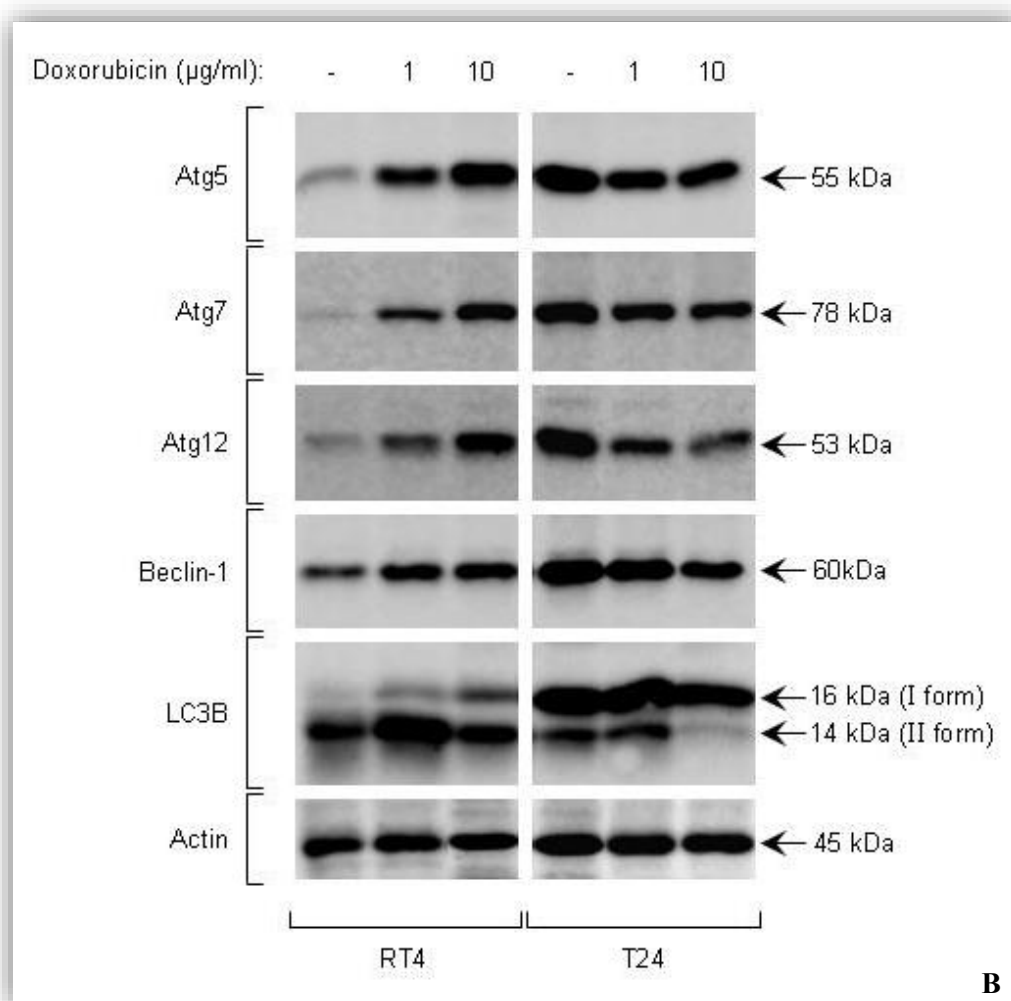
### 3.3.4 Έκθεση καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή καταστολή της αυτοφαγίας

Προσφάτως, αναφέρθηκε η επαγωγή αυτοφαγίας από το 3-BrPA σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος [453] και για το λόγο αυτό εξετάστηκε η ικανότητα του φαρμάκου να προκαλεί αυτοφαγία στα RT4, T24 και T24-X καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (κυτταρικής πυκνότητας ~60%), μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση κρίσιμα συστατικά της αυτοφαγίας, αποδείχθηκε ότι το 3-BrPA (σε συγκεντρώσεις 75, 100 και 125 μM για 24 ώρες) είναι ανίκανο να επάγει τόσο τη μετατροπή της κυτοσολικής LC3B-I στην λιπιδική LC3B-II μορφή, η οποία σχετίζεται με τη συγκρότηση του αυτοφαγοσώματος, όσο και την αυξορρύθμιση των γονιδιακών προϊόντων Atg5, Atg7, Atg12 και Beclin-1, που συνδέονται με την αυτοφαγία, και στους τρεις κυτταρικούς τύπους που εξετάστηκαν. Αντιθέτως, η έκφραση όλων των αυτοφαγικών πρωτεϊνών ελαττώθηκε σημαντικά στα T24 και T24-X κύτταρα υπό την επίδραση του 3-BrPA, αποδεικνύοντας ως εκ τούτου την ισχυρή καταστολή του μηχανισμού της αυτοφαγίας (**Εικόνα 3.32A**).

Εντούτοις, καταφανείς αυτοφαγικές αποκρίσεις, χαρακτηριζόμενες κυρίως από μία δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1 και LC3B (I/II), ανιχνεύθηκαν μετά από έκθεση στον χημειοθεραπευτικό παράγοντα Doxorubicin (Δοξορουβικίνη) (1 και 10 μg/ml για 24 ώρες) στα RT4 αλλά όχι στα T24 κύτταρα (αντιθέτως, διαπιστώθηκαν μετριοπαθείς εξασθενήσεις των πρωτεϊνικών προτύπων έκφρασης) (**Εικόνα 3.32B**), επιβεβαιώνοντας περαιτέρω προηγούμενες παρατηρήσεις που αφορούσαν στην μειωμένη ανθεκτικότητα των RT4 κυττάρων -σε σχέση με τα T24- στο κυτταροτοξικό δυναμικό της Doxorubicin [454]. Τα υψηλά βασικά επίπεδα (*basal levels*) αυτοφαγίας ίσως να παρέχουν στα T24 και T24-X κύτταρα σημαντικά πλεονεκτήματα για την επιβίωση και ανάπτυξή τους [455], ενώ η επαγωγή της

αυτοφαγίας στα RT4 κύτταρα, ύστερα από επώασή τους με Doxorubicin, ενδεχομένως να λειτουργεί ως ένας κυτταρο-ειδικός μηχανισμός εξάλειψης του όγκου. Συμπερασματικά, από τα ως άνω γίνεται αντιληπτό ότι το 3-BrPA (καθώς και η Doxorubicin) δεν απαιτεί ενεργοποίηση της αυτοφαγίας για την εξόντωση των T24 και T24-X κυττάρων, αλλά πιθανώς η φαρμακο-επαγόμενη καταστολή της αυτοφαγίας είναι αυτή που μετέχει καθοριστικά στον αποπτωτικό/νεκρωτικό θάνατό τους.





**Εικόνα 3.32** Κυτταρο-ειδικές και δοδο-εξαρτώμενες αυτοφαγικές αποκρίσεις κυττάρων ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου (~60% κυτταρικής πυκνότητας) στην 24ωρη έκθεση στο 3-BrPA (A) και στην Doxorubicin (B), όπως αποκαλύπτεται μέσω του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη αυτοφαγικών πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *form*: ισομορφή, *Actin*: Ακτίνη, *Doxorubicin*: Δοξορουβικίνη και  $\mu M - \mu g/ml$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.3.5 Ισχυρή κατάρρευση δικτύων σηματοδοτικής ακεραιότητας με δοδο-εξαρτώμενο τρόπο σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης υπό την επίδραση του 3-BrPA

Η ινσουλίνη καθώς και οι αυξητικοί παράγοντες που προσομοιάζουν σε αυτήν (*IGFs*) είναι γνωστοί ως θεμελιώδεις ρυθμιστές του ενεργειακού μεταβολισμού και



της ανάπτυξης [456]. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε ο υποδοχέας του IGF-I (*IGF-IR*) και πλήθος κατωροϊκών διαμεσολαβητών αυτού, μέσω ανοσο-στυπώματος Western, χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση κρίσιμες σηματοδοτικές πρωτεΐνες και τις ομοειδείς φωσφορυλιωμένες τους μορφές. Αντίθετα με τα RT4, 24ωρη έκθεση των T24 και T24-X κυττάρων (~60% πυκνότητα καλλιέργειας) στο 3-BrPA οδηγεί σε δόσο-εξαρτώμενη πτώση των επιπέδων της ολικής IGF-IRα πρωτεΐνης και στους δύο τύπους κυττάρων, με τα T24-X να εμφανίζονται συγκριτικά πιο επηρεασμένα. Ο συστατικός (*constitutively*) φωσφορυλιωμένος υποδοχέας στο κρίσιμο κατάλοιπο τυροσίνης στη θέση 1131 (*p-IGF-IRβ-Tyr<sup>1131</sup>*) (και ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας ινσουλίνης *p-IRβ-Tyr<sup>1146</sup>* που αναγνωρίζεται από το ίδιο αντίσωμα) μειορρυθμίστηκε δραματικά στα T24 και T24-X στη δόση 75 μM, ενώ οι μεγαλύτερες δόσεις του φαρμάκου αύξησαν και αποκατέστησαν τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα, συγχρόνως με την παραγωγή μίας έντονης (και κάποιων συγκριτικά ασθενέστερων) φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ~52 kDa (πιθανώς δημιουργούμενης από πρωτεολυτική επεξεργασία ή εναλλακτικό μάτισμα), η οποία ίσως παρεμβαίνει και τροποποιεί τις σηματοδοτικές δράσεις του υποδοχέα. Οι υψηλού μοριακού βάρους φωσφορυλιωμένες ζώνες στα T24 και T24-X κύτταρα, έπειτα από χορήγηση 3-BrPA, ενδεχομένως αντιπροσωπεύουν πρωτεϊνικές μορφές εκτεταμένως επεξεργασμένες στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο [για παράδειγμα πυρουβυλίωση (*pyruvylation*)], ή ομοιοπολικώς διασταυρούμενα (*cross-linked*) (ομοδιμερή ή ετεροδιμερή) συμπλέγματα υποδοχέων (ή τμημάτων αυτών). Εναλλακτικά, ένα πιθανό σενάριο διαφορικού ματίσματος δεν θα μπορούσε προφανώς να αποκλειστεί. Όπως αναμένεται από τον χαμηλό βαθμό κακοήθειάς τους, τα RT4 κύτταρα παρουσιάζουν μη-ανιχνεύσιμα επίπεδα φωσφορυλιωμένων υποδοχέων IGF-IRβ και IRβ (**Εικόνα 3.33A**).

Η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt, η οποία αποτελεί κρίσιμο κατωροϊκό τελεστή του ενεργοποιημένου IGF-IR (και IR) υποδοχέα [191, 456, 457], αποκαλύφθηκε φωσφορυλιωμένη στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνη στη θέση 308 (*p-Akt-Thr<sup>308</sup>*) ως απόκριση στα 75 μM 3-BrPA, ενώ οι συγκεντρώσεις 100 και 125 μM του φαρμάκου (για 24 ώρες) αποδείχθηκαν όχι μόνο ανίκανες να επάγουν την συγκεκριμένη φωσφορυλιωμένη μορφή, αλλά, επιπλέον, είχαν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της συστατικώς (*constitutively*) φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 473 (*p-Akt-Ser<sup>473</sup>*) και στους δύο

κυτταρικούς τύπους T24 και T24-X (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%). Εντούτοις, τα T24 κύτταρα επηρεάστηκαν συγκριτικά λιγότερο από τη δόση 75  $\mu\text{M}$  του 3-BrPA όσον αφορά στα επίπεδα της συστατικώς ενεργού Akt κινάσης (*p-Akt-Ser<sup>473</sup>*). Τα RT4 δεν παρουσίασαν ανιχνεύσιμες φωσφορυλιωμένες μορφές, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ολικής Akt δεν μεταβλήθηκαν και στους τρεις κυτταρικούς τύπους μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου (**Εικόνα 3.33A**).

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν κρίσιμες ομάδες σημαντικών στόχων της Akt, μεταξύ των οποίων οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες και οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης GSK-3 $\alpha/\beta$  [191, 457-460]. Τα μέλη της οικογένειας FoxO, FoxO1 και FoxO3 $\alpha$ , τα οποία εμφανίζονται συστατικώς (*constitutively*) φωσφορυλιωμένα στο κρίσιμο κατάλοιπο θρεονίνη στη θέση 24 και 32 (*p-FoxO1-Thr<sup>24</sup>/FoxO3 $\alpha$ -Thr<sup>32</sup>*), αντίστοιχα, χαρακτηρίζονται από ισχυρή μειορρύθμιση σε απάντηση στο 3-BrPA (24 ώρες επώαση) στις T24 και T24-X κυτταρικές σειρές (~60% κυτταρικής πυκνότητας), με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο και με τα T24-X να παρουσιάζονται συγκριτικά περισσότερο ευάλωτα στη δόση 75  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου. Τα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης FoxO1 ελαττώθηκαν επίσης σημαντικά και στους δύο κυτταρικούς τύπους κατόπιν χορήγησης του φαρμάκου, με τα T24 να επιδεικνύουν αξιόλογα μεγαλύτερη ανοχή σε σύγκριση με τα T24-X, σε όλες τις συγκεντρώσεις του 3-BrPA. Για μία ακόμη φορά, τα RT4 προβάλλονται με ανύπαρκτη συστατική φωσφορυλίωση και αμετάβλητη πρωτεϊνική έκφραση των FoxO μελών υπό τη δράση του φαρμάκου (**Εικόνα 3.33B**). Παρόμοια, οι συστατικώς (*constitutively*) φωσφορυλιωμένες μορφές των κινασών GSK-3 $\alpha/\beta$  στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 21, για την GSK-3 $\alpha$ , και στη θέση 9, για την GSK-3 $\beta$ , υπέστησαν σοβαρή δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση στα T24 και T24-X κύτταρα (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) έπειτα από χορήγηση του 3-BrPA για 24 ώρες, ενώ απουσίαζαν παντελώς από την καρκινική σειρά RT4. Επιπροσθέτως, τα T24 αποκαλύπτονται περισσότερο ανθεκτικά εν συγκρίσει με τα T24-X κύτταρα όσον αφορά στην σηματοδοτική δυναμική της GSK-3 $\alpha/\beta$  κινάσης. Σε αντιδιαστολή με την GSK-3 $\beta$  η οποία παραμένει ουσιαστικά «αλώβητη» και στους τρεις υπό εξέταση κυτταρικούς τύπους, η GSK-3 $\alpha$  εμφανίζεται με σαφώς πιο μειωμένα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης στα T24 και T24-X, αλλά όχι στα RT4 κύτταρα, ως απόκριση στο 3-BrPA (**Εικόνα 3.33B**).

Γενικά, φαίνεται ότι ο IGF-IR(IR)/Akt/FoxO-GSK-3 άξονας σηματοδότησης είναι πλήρως ανενεργός στα χαμηλού βαθμού κακοήθειας RT4 κύτταρα, ενώ παρουσιάζεται συστατικώς ενεργοποιημένος στα υψηλού βαθμού κακοήθειας T24 και T24-X κύτταρα. Επιπλέον, το 3-BrPA αποδεικνύεται ικανό να διαταράσσει δραματικά την σηματοδοτική ακεραιότητα και λειτουργία όλων των διαμεσολαβητών του μονοπατιού που μελετήθηκε, με τρόπο αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο και κυτταροειδικό. Ενδιαφέρον δεν αποτελεί μόνο το γεγονός ότι τα RT4 παρέμειναν ανεπηρέαστα, αλλά και το ότι τα T24-X κύτταρα, συγκριτικά με τα T24, εμφανίστηκαν σχετικά πιο ευαίσθητα όσον αφορά στην φαρμακο-επαγόμενη σηματοδοτική καταστολή.

Οι υποδοχείς IGF-IR και IR αποτελούν, επίσης, σημαντικούς ρυθμιστές των MAPK-εξαρτώμενων σηματοδοτικών δικτύων σε νεοπλασματικούς ιστούς, με τα μέλη της οικογένειας ERK1/2 (p44/42 MAPK) της οικογένειας MAPK να επάγονται έντονα ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και στην ινσουλίνη [136, 456]. Συνεπώς, και οι δύο αυτές πρωτεΐνες εξετάστηκαν στα RT4, T24 και T24-X κύτταρα (~60% πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος), ύστερα από 24ωρη έκθεσή τους στο 3-BrPA, μέσω της τεχνικής ανοσο-στυπώματος Western. Όπως διαφαίνεται στην **Εικόνα 3.33Γ** οι συστατικώς (*constitutively*) φωσφορυλιωμένες μορφές της p44/42 MAPK κινάσης σερίνης/θρεονίνης -στο κρίσιμο αμινιξικό κατάλοιπο θρεονίνη 202 και τυροσίνη 204, αντίστοιχα- επάγονται εμφανώς στη δόση 75  $\mu$ M, ενώ μειορρυθμίζονται, συγκριτικά με τη δόση αυτή στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμάκου 100 και 125  $\mu$ M. Τα T24 παρουσιάζονται πιο ευάλωτα στο 3-BrPA σε σχέση με τα T24-X κύτταρα, με την p-p44 MAPK-Thr<sup>202</sup> να εξαφανίζεται τελείως και την p-p42 MAPK-Tyr<sup>204</sup> να μειώνεται δραστικά στη δόση 125  $\mu$ M του φαρμάκου. Έκπληξη προκαλεί η εμφάνιση μίας υψηλότερου μοριακού βάρους ζώνης, γύρω στα 47 kDa, στις T24 και T24-X κυτταρικές σειρές, η οποία αποτελεί ενδεχομένως μία φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη τύπου p44/42 MAPK (p44/42 MAPK-like phosphorylated protein) και η οποία αυξορρυθμίζεται ισχυρά σε απάντηση στα 100 και 125  $\mu$ M 3-BrPA, με τα T24 να παρουσιάζουν έντονη και συγκριτικά ισχυρότερη έκφραση αυτής. Η εν λόγω πρωτεΐνη θα μπορούσε να αποτελεί παράγωγο είτε εκτεταμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [για παράδειγμα πυρουβυλίωση (*pyruvylation*)] είτε μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος (*alternative splicing*) και ίσως να κατέχει κρίσιμο ρόλο στην φαρμακο-επαγόμενη τοξικότητα και θάνατο των

υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Τα επίπεδα έκφρασης των ολικών p44/42 MAPK πρωτεϊνών παρέμειναν αμετάβλητα στα T24 και T24-X καρκινικά κύτταρα, αν και παρατηρήθηκαν σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους, πιθανώς σχηματιζόμενα μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [για παράδειγμα πυρουβυλίωση (*pyruvylation*)], έπειτα από χορήγηση 100 και 125  $\mu\text{M}$  3-BrPA. Αντιθέτως, τα RT4 κύτταρα εμφανίσθηκαν με άθικτα, αν και χαμηλά, ολικά και φωσφορυλιωμένα επίπεδα p44/42 MAPK κινασών (**Εικόνα 3.33Γ**).

Καθώς η πρωτεΐνη p38, μέλος της οικογένειας MAPK, δύναται να επάγεται υπό ποικίλα στρεσογόνα ερεθίσματα, αναλύθηκαν, μέσω ανοσο-στυπώματος Western, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα RT4, T24 και T24-X κυττάρων (~60% κυτταρικής πυκνότητας), τα οποία επώασθηκαν για 24 ώρες στο 3-BrPA, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα πρωτογενή αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης p38 MAPK, καθώς και της φωσφορυλιωμένης μορφής αυτής. Οι δόσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου αποδείχθηκαν ικανές να καταστέλλουν πλήρως την συστατική (*constitutive*) φωσφορυλίωση στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνη στη θέση 180 και τυροσίνη στη θέση 182, ενώ έντονη ήταν και η μειορρύθμιση στη δόση 75  $\mu\text{M}$ , με τα T24 να παρουσιάζονται συγκριτικά περισσότερο ευπαθή. Τα επίπεδα, όμως, της ολικής πρωτεΐνης p38 MAPK παρέμειναν σχεδόν ανέπαφα και στους τρεις υπό εξέταση κυτταρικούς τύπους. Το προφίλ συστατικής φωσφορυλίωσης στα RT4 διατηρήθηκε, επίσης, αμετάβλητο, ενώ η ισχύη και μετά δυσκολίας ανίχνευσή του, δικαιολογεί τον χαμηλό βαθμό κακοήθειας της εν λόγω καρκινικής κυτταρικής σειράς (**Εικόνα 3.33Γ**). Διαπιστώνεται, πάντως, ότι σε αντίθεση με το μονοπάτι IGF-IR/Akt, οι p44/42 MAPK και p38 MAPK παρέχουν σημαντικά σηματοδοτικά πλεονεκτήματα στα T24-X κύτταρα, τα οποία τα καθιστούν, σε σχέση με τα T24, λιγότερο ευάλωτα στο κυτταροτοξικό δυναμικό του 3-BrPA.

Στη συνέχεια, μέσω του ανοσο-στυπώματος Western εξετάσθηκε και στις τρεις κυτταρικές σειρές, η AMPK πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία συνιστά έναν σημαντικό μεταβολικό αισθητήρα, ικανό να ενεργοποιείται ακόμη και υπό συνθήκες μέτριας ελάττωσης παραγόμενων ATP επιπέδων, τα οποία οδηγούν σε σχετική αύξηση των AMP ή ADP επιπέδων [148, 191, 209, 456, 458]. Σε αντιπαραβολή με τα RT4, τα T24 και T24-X κύτταρα (~60% κυτταρικής κάλυψης υποστρώματος), παρουσία 100 και 125  $\mu\text{M}$  3-BrPA (για 24 ώρες) επέδειξαν σθεναρή μειορρύθμιση της συστατικώς φωσφορυλιωμένης μορφής p-AMPK $\alpha$ -Thr<sup>172</sup>, με τα

T24 να παρουσιάζονται ελαφρώς πιο ανθεκτικά στη δράση του φαρμάκου. Επιπλέον, τα επίπεδα της συστατικώς φωσφορυλιωμένης μορφής p-AMPKα1-Ser<sup>485</sup>/AMPKα2-Ser<sup>491</sup> ελαττώθηκαν ισχυρά με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και στους δύο τύπους κυττάρων σε απάντηση στο 3-BrPA, με τα T24 και αυτή τη φορά να αποδεικνύονται λίγο πιο ανθεκτικά συγκριτικά με τα T24-X. Η έκφραση της ολικής AMPKα πρωτεΐνης δεν φάνηκε να επηρεάζεται από το φάρμακο και στους δύο κυτταρικούς τύπους, αν και μία μικρή, αλλά ανιχνεύσιμη δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση παρατηρήθηκε τόσο στα T24-X όσο και στα T24 κύτταρα. Προς μεγάλη έκπληξη και ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τα RT4 κύτταρα αποκαλύπτονται με μία έκδηλη συστατική φωσφορυλίωση της AMPKα κινάσης στο κατάλοιπο θρεονίνη 172, η οποία παρά την απουσία φωσφορυλιωμένων μορφών των AMPKα1 και AMPKα2 στο κατάλοιπο σερίνη 485 και 491 αντίστοιχα, είναι ενδεχομένως ικανή να διατηρεί τον κακοήθη -αν και χαμηλού βαθμού- χαρακτήρα της κυτταρικής αυτής σειράς. Η ελάττωση της ολικής και φωσφορυλιωμένης στη θέση θρεονίνη 172 AMPKα πρωτεΐνης στα RT4 κύτταρα πιθανώς υποδεικνύει ότι η κυτταρική τοξικότητα δύναται να αναπτυχθεί μόνο στην περίπτωση που η λειτουργία της AMPKα κινάσης βρίσκεται κάτω από μια συγκεκριμένη ουδό (*threshold*) (Εικόνα 3.33Γ).

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η AMPK κινάση αντιτίθεται στις επιδράσεις της Akt κινάσης και λειτουργεί ως πιθανός αναστολέας της πρωτεΐνης mTOR, μίας κινάσης σερίνης/θρεονίνης που ελέγχει την πρωτεϊνική σύνθεση [148, 191, 456, 458, 461], συλλέχθηκαν εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών και από τις τρεις κυτταρικές σειρές (~60% κυτταρική πυκνότητα), τα οποία υποβλήθησαν στη διαδικασία ανοσο-στυπώματος Western, χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα εξειδικευμένα για την αναφερθείσα πρωτεΐνη. Ενώ ο κυτταρικός τύπος RT4 παρέμεινε αμετάβλητος, 24 ώρες επώαση των T24 και T24-X κυττάρων με 3-BrPA αποδείχθηκε ικανή να επάγει ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση της συστατικώς φωσφορυλιωμένης mTOR πρωτεΐνης στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 2448. Αν και τα T24 παρουσιάστηκαν με σθεναρή μείωση των επιπέδων έκφρασης της ολικής mTOR πρωτεΐνης σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις, τα T24-X δείχθηκε ότι μπορούν να ανακτούν την εν λόγω πρωτεΐνη στις μεγάλες δόσεις φαρμάκου (100 και 125 μM), αλλά όχι στη συγκέντρωση 75 μM. Η πρωτεΐνη υψηλότερου μοριακού βάρους που εμφανίζεται κυρίως στα T24-X κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε 100 και 125 μM 3-BrPA αντιπροσωπεύει ενδεχομένως μία τροποποιημένη μετα-μεταφραστικά πρωτεΐνη

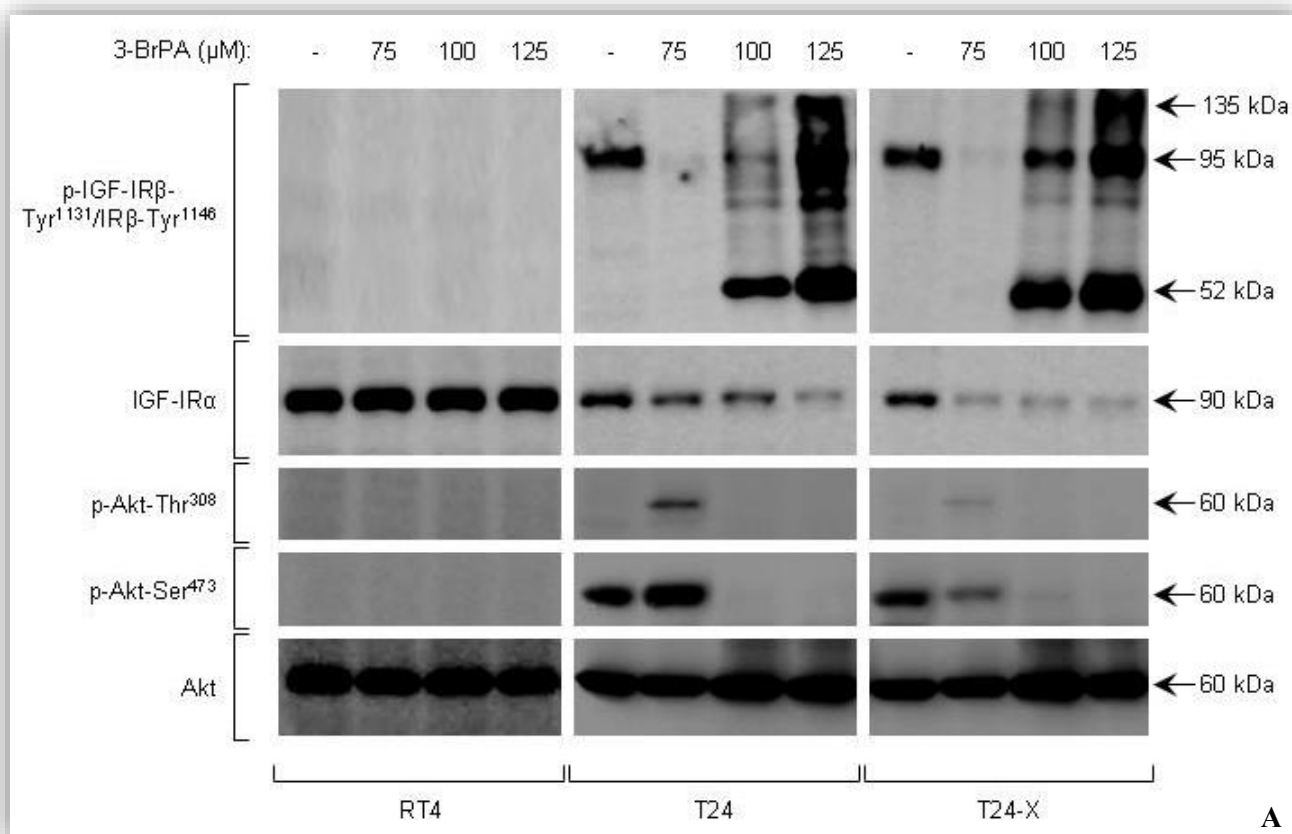
ή μία μορφή εναλλακτικού ματίσματος, η οποία θα μπορούσε να επιδράσει αρνητικά στην φυσιολογική σηματοδοτική λειτουργία της mTOR πρωτεΐνης. Για ακόμη μία φορά, η συστατική φωσφορυλίωση της mTOR κινάσης στα RT4 κύτταρα φαίνεται να συνεισφέρει στον -χαμηλό- βαθμό κακοήθειάς τους (**Εικόνα 3.33Δ**).

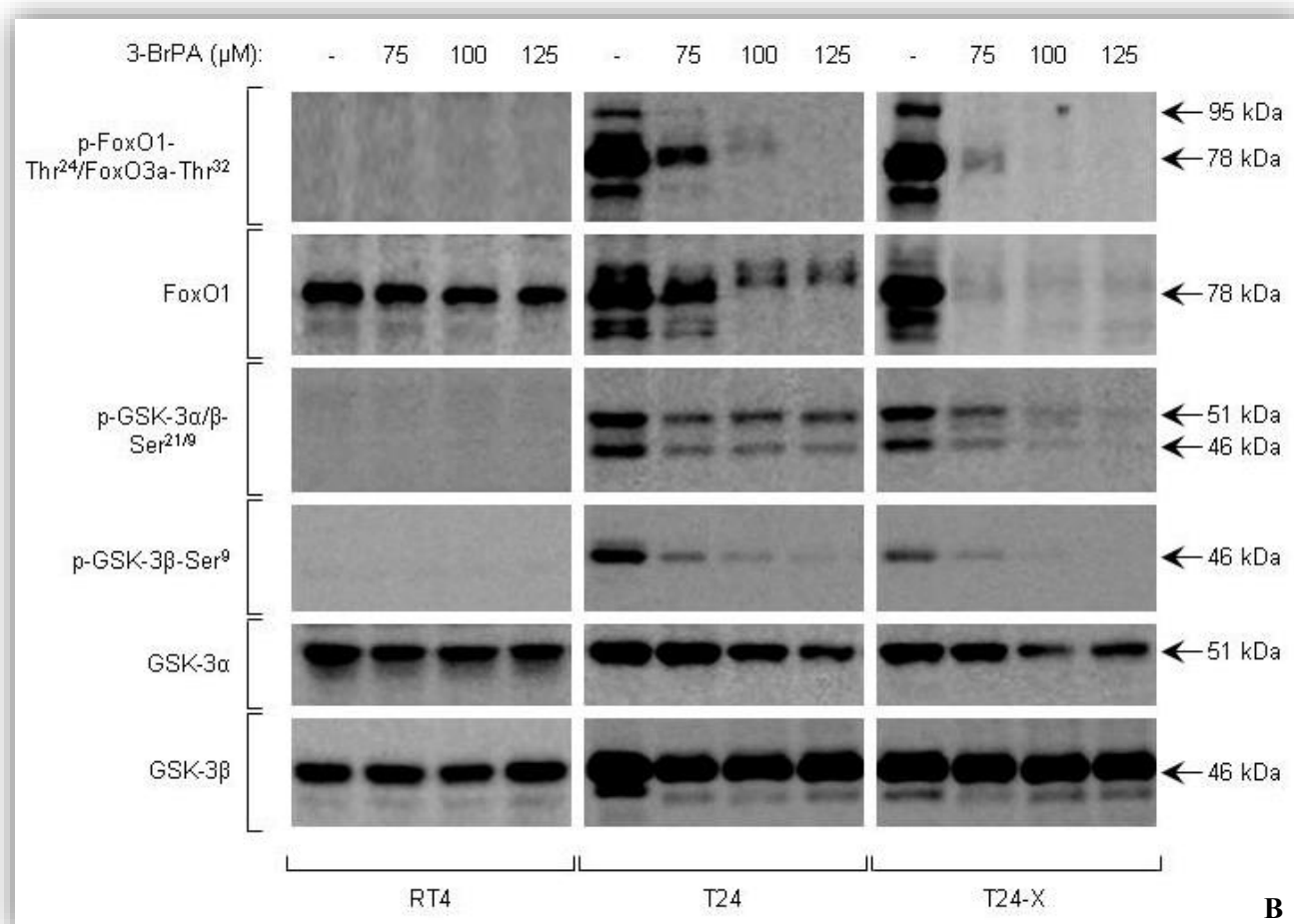
Εν συνεχεία, μελετήθηκε η S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη, θεμελιώδες συστατικό του 40S ευκαρυωτικού ριβοσώματος και κατωροϊκός τελεστής του σηματοδοτικού άξονα mTOR/S6 κινάσης (S6K) [148, 191, 456, 461, 462]. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.33Δ**, τα επίπεδα έκφρασης της συστατικώς φωσφορυλιωμένης S6 πρωτεΐνης στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 235 και 236, μειώνονται ισχυρά μετά από 24ωρη δράση του 3-BrPA στα T24 και T24-X, αλλά όχι στα RT4 καρκινικά κύτταρα (~60% πυκνότητα κάλυψης υποστρώματος), με τα T24 να εμφανίζονται συγκριτικά πιο ανθεκτικά. Η ολική S6 πρωτεΐνη υπέστη μέτρια μειορρύθμιση στα T24 και T24-X κύτταρα κατόπιν χορήγησης φαρμάκου, ενώ στα RT4 δεν σημειώθηκε καμία μεταβολή. Η αξιοσημείωτη ύπαρξη της p-S6-Ser<sup>235/236</sup> μορφής στα RT4 πιθανόν να σχετίζεται για ακόμη μία φορά με την -χαμηλή- κακοήθεια των εν λόγω κυττάρων.

Η πρωτεΐνη eIF2α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καταστολής της μετάφρασης ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα [463] και για τον λόγο αυτό μελετήθηκε ο βαθμός έκφρασης της φωσφορυλιωμένης και ολικής πρωτεΐνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (~60% κυτταρικής πυκνότητας), έπειτα από 24ωρη χορήγηση 3-BrPA, μέσω ανοσο-στυπώματος Western. Δείχθηκε ότι η έκθεση των T24 και T24-X κυττάρων στο φάρμακο είχε ως επακόλουθο την ισχυρή μειορρύθμιση των συστατικώς φωσφορυλιωμένων, στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη 51, μορφών της eIF2α πρωτεΐνης, με τα T24 να επιδεικνύονται ελαφρώς πιο ανθεκτικά στο κυτταροτοξικό δυναμικό της δόσης 75 μM του φαρμάκου εν συγκρίσει με τα T24-X κύτταρα. Τα RT4 εμφανίζουν πολύ χαμηλές ποσότητες συστατικών μορφών p-eIF2α-Ser<sup>51</sup>, οι οποίες ελαττώνονται και αυτές ισχυρά παρουσία 3-BrPA με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα ολικά επίπεδα της eIF2α πρωτεΐνης υπέστησαν μέτρια μείωση παρουσία φαρμάκου στα T24 και T24-X κύτταρα κυρίως στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100 και 125 μM), ενώ στα RT4 παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητα (**Εικόνα 3.33Δ**).

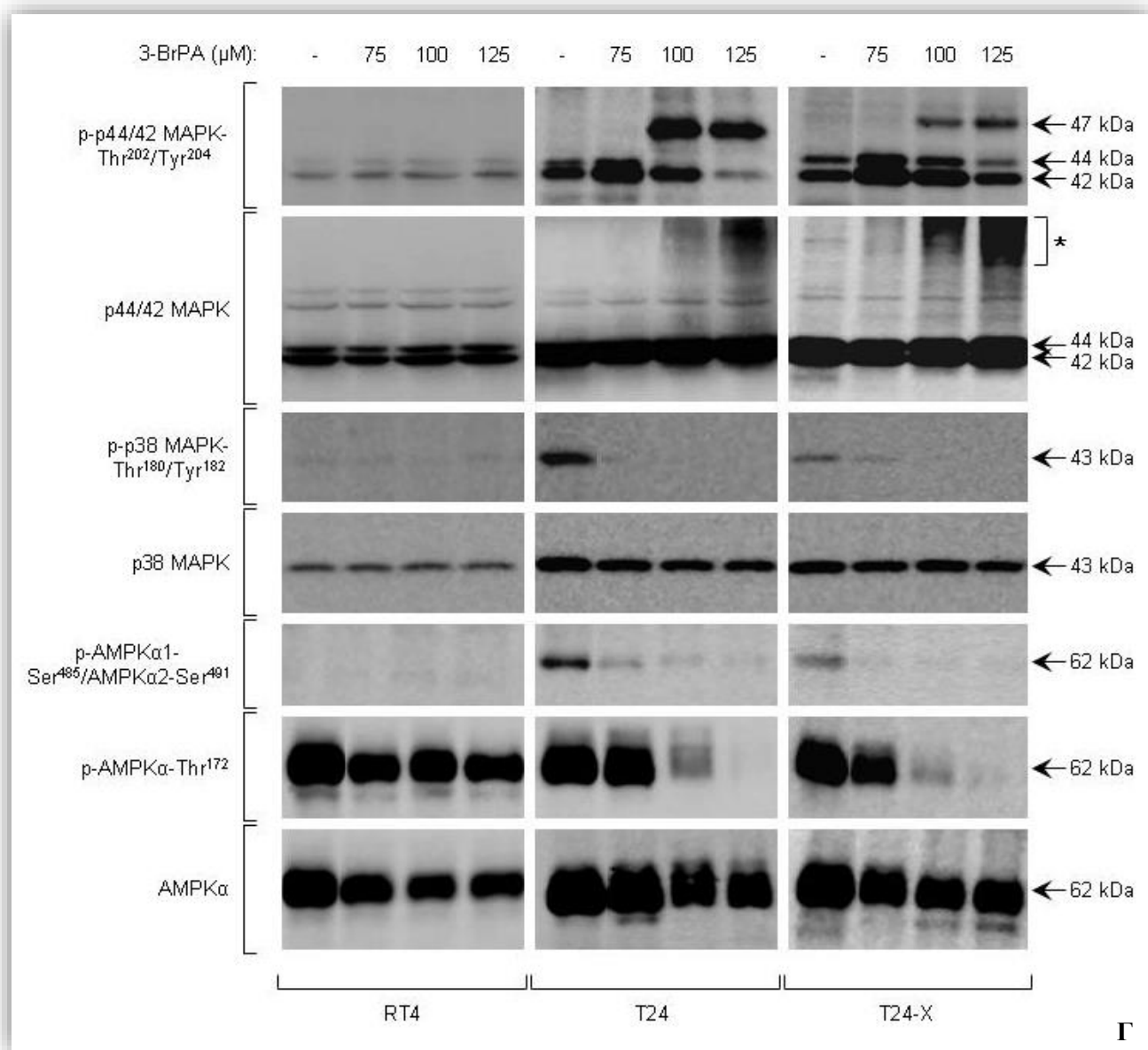
Συνολικά, αποδεικνύεται ότι το 3-BrPA δύναται κυρίως να παρεμποδίζει λειτουργίες άμεσα εξαρτώμενες από τη φωσφορυλίωση και, ενίοτε, να μειώνει

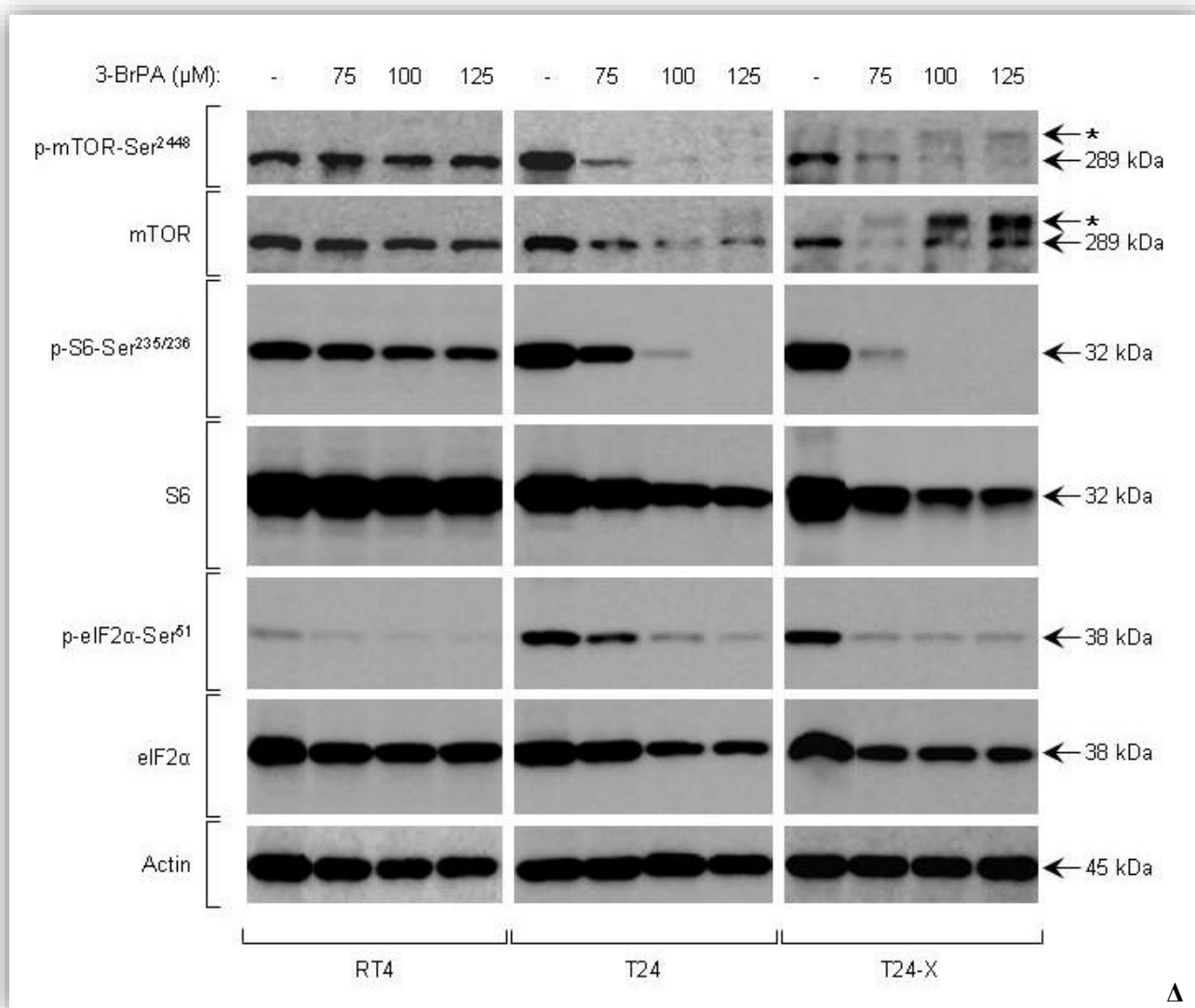
ποσοτικά το κυτταρικό περιεχόμενο, να διαταράσσει την δομική ακεραιότητα, να επάγει τοξικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και να μεταβάλλει τα πρότυπα ματίσματος/συρραφής μεταγράφων πληθώρας σηματοδοτικών πρωτεϊνών, με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο και κυτταρο-ειδικό, οδηγώντας, ως εκ τούτου, σε καθολική κατάρρευση θεμελιωδών δικτύων σηματοδότησης, τα οποία διατηρούν τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης ζωντανά, ανεπηρέαστα και κακοήγη.









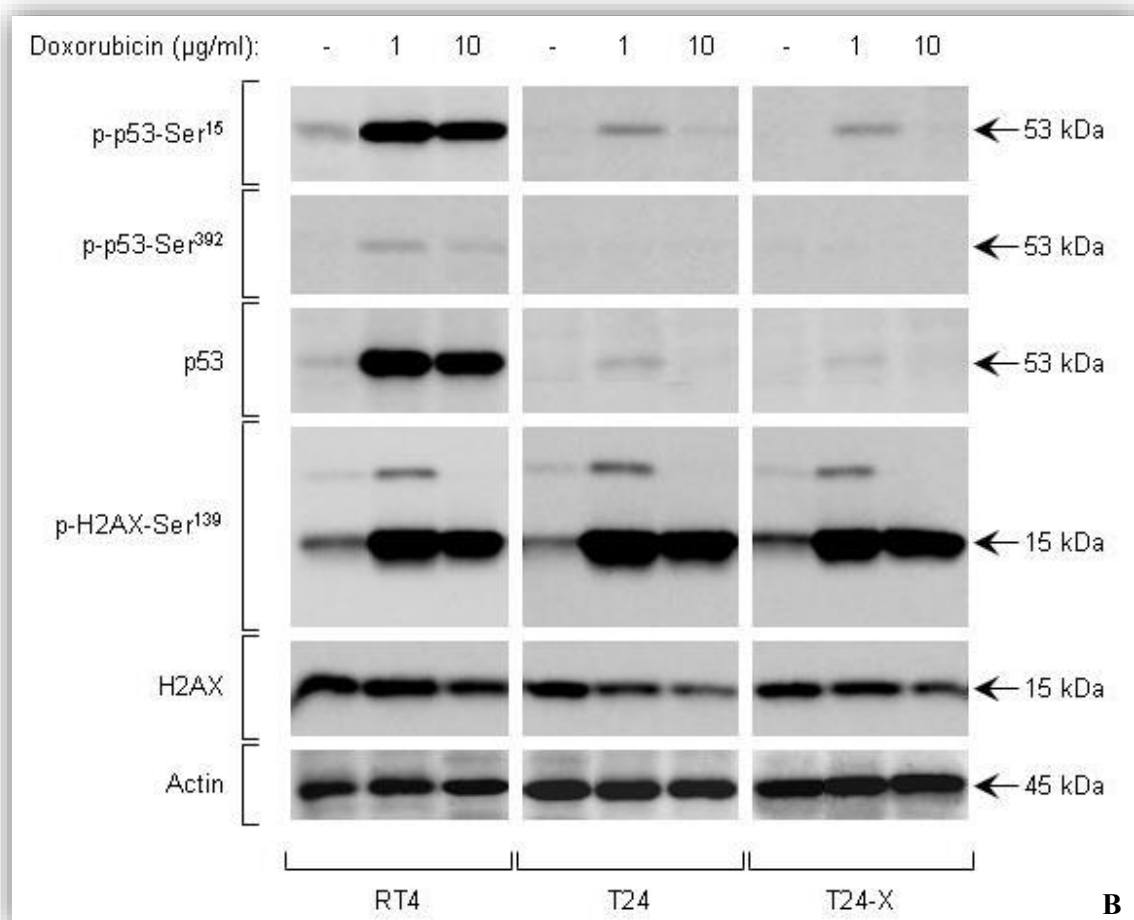
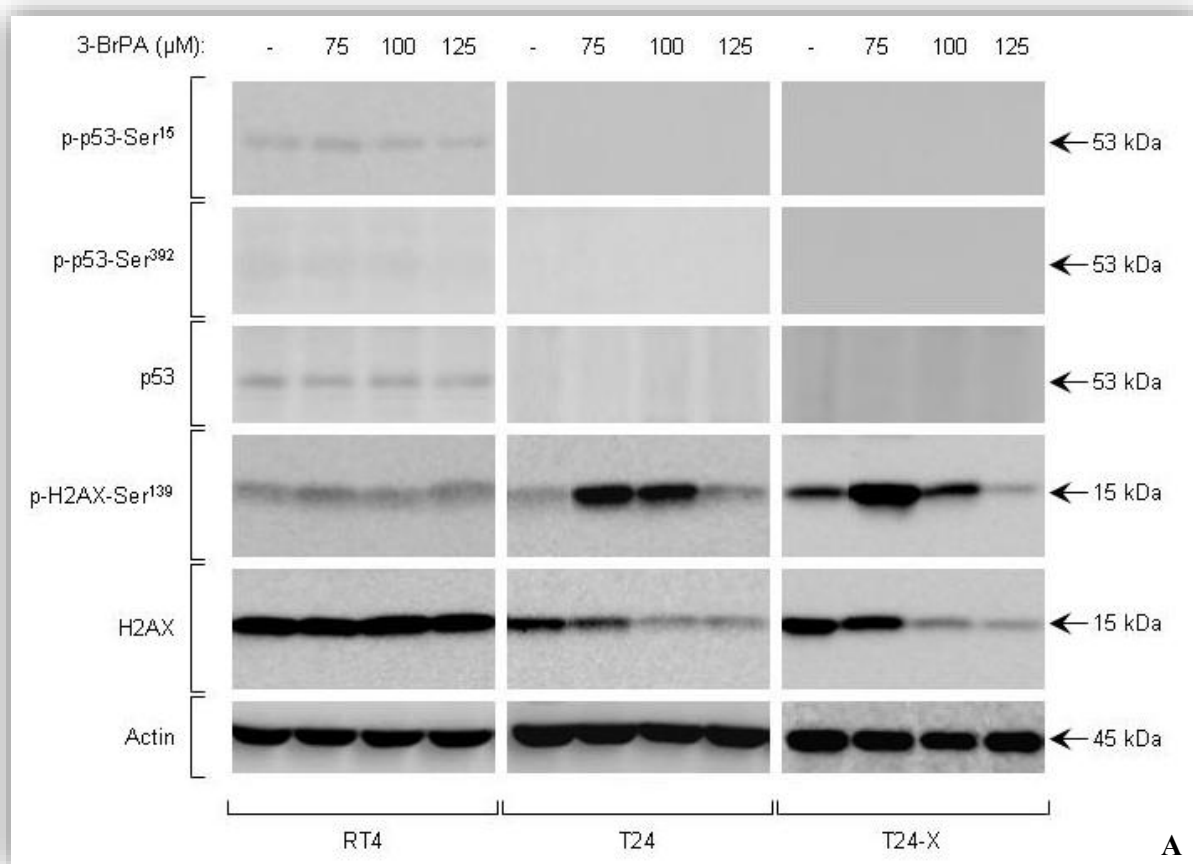


**Εικόνα 3.33** Κατάρρευση της σηματοδοτικής ακεραιότητας των T24 και T24-X ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (~60% κυτταρικής πυκνότητας) μετά από 24ωρη χορήγηση 3-BrPA, όπως αποδεικνύεται δια μέσου ανοσο-στυπώματος Western. (Α και Β) IGF-IR / Akt σηματοδοτικός άξονας, (Γ) MAPK και AMPK σηματοδοτικοί άξονες και (Δ) mTOR / S6 και eIF2α σηματοδοτικοί άξονες. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε- δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) (\*) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. *p*:- φωσφορυλίωση, *Tyr*: Τυροσίνη, *Thr*: Θρεονίνη, *Ser*: Σερίνη, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### 3.3.6 Το 3-BrPA επάγει γενοτοξικές αποκρίσεις σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης χωρίς τη συμμετοχή του p53 μεταγραφικού παράγοντα – κυτταροτοξική συνέργεια των 3-BrPA και PRIMA-1

Αν και ο p53 μεταγραφικός παράγοντας είναι ευρέως γνωστός για τις λειτουργίες του σε απάντηση στην καταστροφή του πυρηνικού DNA και την απόπτωση, συνιστά, επίσης, έναν σημαντικό ρυθμιστή του μεταβολισμού, ενώ ως απόκριση στο στρες δύναται να καταστέλλει τα μονοπάτια IGF-IR/Akt και mTOR, καθώς επίσης και να περιορίζει τη συχνότητα λαθών κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης [174, 183, 191, 458, 464, 465]. Από την άλλη πλευρά, δίκλιωνα θραύσματα στο πυρηνικό DNA συνιστούν σοβαρές δομικές αλλοιώσεις οι οποίες συνεισφέρουν στην γονιδιωματική αστάθεια (*genomic instability*), αλλά και στη θεραπεία του καρκίνου, ενώ μπορούν να προκαλούν τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX ( $\gamma$ H2AX), ενός κρίσιμου ρυθμιστή στη διαδικασία επιδιόρθωσης του κατεστραμμένου DNA [466]. Ως εκ τούτου, καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) επώαστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις 3-BrPA και τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία μέσω ανοσο-στυπώματος Western, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα πρωτογενή αντισώματα έναντι των p53 και H2AX πρωτεϊνών, καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.34A**, παρά την αδυναμία της p53 να επάγεται και να φωσφορυλιώνεται -στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 15 και 392- και στους τρεις κυτταρικούς τύπους παρουσία φαρμάκου, η H2AX επιδεικνύει ισχυρή φωσφορυλίωση στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 139, στις δόσεις 75 και 100  $\mu$ M στα T24 κύτταρα, και στη συγκέντρωση 75  $\mu$ M στα T24-X, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο την δόσο-ειδική επαγωγή δίκλωνων θραυσμάτων πυρηνικού DNA στα T24 και T24-X, αλλά όχι στα RT4 κύτταρα. Σε αντίθεση με τα RT4, τα επεξεργασμένα με 3-BrPA T24 και T24-X κύτταρα παρουσιάζουν μία δόσο-εξαρτώμενη μείωση της έκφρασης της ολικής H2AX πρωτεΐνης, πιθανώς ενδεικνύοντας την ικανότητα του εν λόγω φαρμάκου να προκαλεί βλάβες στα DNA επιδιορθωτικά συστήματα (*repair systems*). Κατ' ανάλογο τρόπο, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της p-H2AX-Ser<sup>139</sup> μορφής στα T24-X κύτταρα στη συγκέντρωση 100  $\mu$ M 3-BrPA πιθανότατα αντανακλούν την αδυναμία επιδιορθωτικής ανταπόκρισης των

κυττάρων αυτών στην καταστροφή του πυρηνικού τους DNA και την γενικευμένη αποτυχία αποτελεσματικής επιδιόρθωσης των γονιδιωματικών αλλοιώσεων. Σε αντιδιαστολή με το 3-BrPA, η 24ωρη επώαση με Doxorubicin (Δοξορουβικίνη), ενός σημαντικού παράγοντα στη χημειοθεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης [33], αποδείχθηκε ικανή να επάγει ισχυρά τόσο την ολική όσο και την φωσφορυλιωμένη -στο κατάλοιπο σερίνη 15- p53 πρωτεΐνη στα RT4 κύτταρα, στις δόσεις 1 και 10  $\mu\text{g/ml}$  του εν λόγω χημειοθεραπευτικού παράγοντα, με την p-p53-Ser<sup>392</sup> να παρουσιάζει ισχυρή αυξορρύθμιση στις δύο χορηγούμενες δόσεις. Τουναντίον, στα T24 και T24-X κύτταρα η p53 δύναται μόνο οριακά (και με μεγάλη δυσκολία) να ενεργοποιείται παρουσία Doxorubicin, πιθανότατα εξαιτίας της κυρίαρχης μεταλλαγμένης μορφής αυτών ΔY<sup>126</sup> (απώλεια της τυροσίνης 126), η οποία αποδεικνύεται ότι πολύ δύσκολα ανταποκρίνεται στην διαμεσολαβούμενη από την Doxorubicin καταστροφή του πυρηνικού DNA. Από την άλλη πλευρά, όμως, η H2AX ιστόνη παρουσιάζει ισχυρή φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνη και στις τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές που εκτέθηκαν στο φάρμακο (σε συγκεντρώσεις 1 και 10  $\mu\text{g/ml}$ ), υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τον φαρμακο-επαγόμενο σχηματισμό δίκλωνων θραυσμάτων στο ουροθηλιακό πυρηνικό DNA. Όσον αφορά στα ολικά επίπεδα έκφρασης της H2AX πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μία δόσο-εξαρτώμενη και κυτταρο-ειδική μειορρύθμιση ως απόκριση στη δράση της Doxorubicin (**Εικόνα 3.34B**). Διαφαίνεται, λοιπόν, ότι αν και το 3-BrPA και η Doxorubicin είναι ικανά να προάγουν ισχυρά τον σχηματισμό δίκλωνων θραυσμάτων DNA σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, εντούτοις διαφέρουν σημαντικά στην εξειδίκευση της κυτταρικής στόχευσης, στην έκταση της γενοτοξικότητας (*genotoxicity*), καθώς και στην ικανότητα ενεργοποίησης της p53 πρωτεΐνης.



**Εικόνα 3.34** Φαρμακο-ειδικές και p53-ανεξάρτητες γενετοξικές αποκρίσεις ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου (~60% κυτταρικής πυκνότητας) στην 24ωρη δράση του 3-BrPA (**A**) και της Doxorubicin (**B**), όπως αποκαλύπτεται δια μέσου του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. *p*-: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Actin*: Ακτίνη, *Doxorubicin*: Δοξορουβικίνη και  $\mu M - \mu g/ml$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Τα RT4 χαρακτηρίζονται από φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη, ενώ τα T24 κύτταρα φέρουν μία μεταλλαγμένη μορφή αυτής ( $\Delta Y^{126}$ ), ενδεχομένως μη-ικανή να ανταποκρίνεται αποτελεσματικά σε εξωτερικές προσβολές (**Εικόνα 3.34B**) και ανήμπορη να προστατεύει την δομική ακεραιότητα του κακοήθους ουροθηλιακού γονιδιώματος. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να είναι η μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη ο υπεύθυνος ρυθμιστής για τη μετατροπή των T24 σε ευαίσθητα στη δράση του 3-BrPA κύτταρα και η φυσικού τύπου p53 αυτή που διατηρεί τα RT4 κύτταρα ανεπηρέαστα στο φάρμακο. Για να εξετάσουμε, λοιπόν, τον ρόλο της p53 στην κυτταροτοξικότητα του 3-BrPA, T24 κύτταρα υπέστησαν παροδική διαμόλυνση (*transient transfection*), για 48 ώρες, με έναν μάρτυρα -κενό- φορέα (πλασμιδίο αναφοράς) (*T24-CMV*) ή με πλασμιδιακό φορέα ο οποίος υπερ-εκφράζει την φυσικού τύπου ανθρώπινη p53 πρωτεΐνη (*T24-CMV-p53*) και έπειτα από 24ωρη επώαση με το 3-BrPA τα κύτταρα υποβλήθηκαν στις διαδικασίες ανοσο-στυπώματος Western και MTT. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.35A** (άνω πλαίσια), η έκθεση των T24-CMV-p53 κυττάρων στο 3-BrPA είχε ως αποτέλεσμα μία δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση των επιπέδων της -συστατικώς εκφραζόμενης- ολικής και φωσφορυλιωμένης -στο κατάλοιπο σερίνη 15- πρωτεΐνης p53, αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την αδυναμία του 3-BrPA να ενεργοποιεί την φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη. Αντιθέτως, τα T24-CMV-p53 κύτταρα παρουσιάζουν εντυπωσιακή υπερ-έκφραση των επιπέδων των p-p53-Ser<sup>15</sup> και ολικής p53 πρωτεϊνών ως απάντηση στην 24ωρη επώαση με 1  $\mu g/ml$  Doxorubicin, παρέχοντας έτσι ισχυρότατη απόδειξη για την λειτουργική ικανότητα και επάρκεια της παροδικά διαμολυσμένης φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης στο περιβάλλον της T24 καρκινικής κυτταρικής σειράς. Παρά τα υψηλά επίπεδα απόδοσης της παροδικής διαμόλυνσης (τα οποία εκτιμώνται και από

τον φορέα αναφοράς pEGFP-N1), τα T24-CMV-p53 κύτταρα, εν συγκρίσει με τα T24-CMV κύτταρα αναφοράς (μάρτυρες), δεν δύνανται, έστω και μερικώς, να διασωθούν από την κυτταροτοξική (24ωρη) δυναμική του 3-BrPA σε οποιαδήποτε χορηγούμενη δόση (**Εικόνα 3.35A**, κάτω πλαίσια), διαχωρίζοντας έτσι τη συμμετοχή της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης από την ικανότητα απόκτησης ανθεκτικότητας έναντι της επαγόμενης από το 3-BrPA τοξικότητας και θανάτου σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

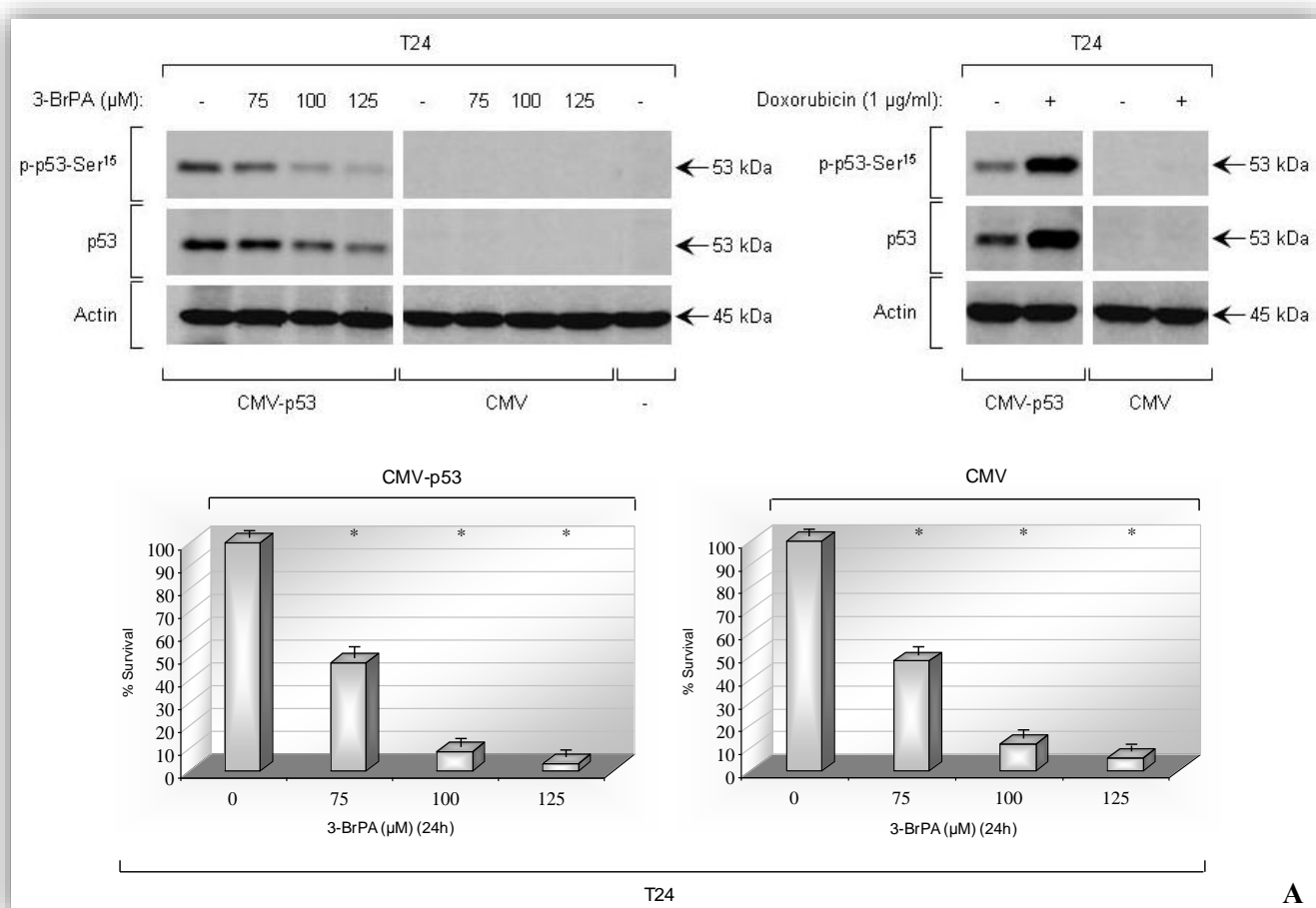
Προς την ίδια κατεύθυνση και με στόχο να αναλυθεί περαιτέρω η σημασία της p53 και σε ένα άλλο και ανεξάρτητο κυτταρικό υπόβαθρο, μελετήθηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western και διαδικασίας MTT οι ανθρώπινες ισογονιδιακές καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HCT116-p53<sup>+/+</sup> και HCT116-p53<sup>-/-</sup> (~60% κυτταρική πυκνότητα) έπειτα από 24ωρη έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3-BrPA. Η συστατικώς εκφραζόμενη φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη και οι ισχνά φωσφορυλιωμένες -στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 15 και 392- μορφές αυτής δεν αυξορρυθμίστηκαν παρουσία του φαρμάκου, αλλά παρέμειναν ανεπηρέαστες στα HCT116-p53<sup>+/+</sup> κύτταρα σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις. Σε αντιδιαστολή, η Doxorubicin (1 και 10 μg/ml για 24 ώρες) αποδείχθηκε ότι μπορεί να επάγει πολύ ισχυρά τα επίπεδα έκφρασης τόσο της ολικής όσο και της φωσφορυλιωμένης -στο κατάλοιπο σερίνη 15- p53 πρωτεΐνης, ενώ τα επίπεδα της p-p53-Ser<sup>392</sup> δύνανται να αυξάνονται σημαντικά στη δόση 1 μg/ml, προβάλλοντας έτσι την ικανότητα φαρμακο-ειδικής ενεργοποίησης της ενδογενούς p53 πρωτεΐνης στο κυτταρικό περιβάλλον παχέος εντέρου των HCT116-p53<sup>+/+</sup> (**Εικόνα 3.35B**, άνω πλαίσια). Προς μεγάλη έκπληξη και ενδιαφέρον, τα HCT116-p53<sup>+/+</sup> εμφανίστηκαν πολύ πιο ευαίσθητα σε σύγκριση με τα HCT116-p53<sup>-/-</sup> στην κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA, κυρίως στις μεγάλες συγκεντρώσεις αυτού (**Εικόνα 3.35B**, κάτω πλαίσια), συμπεραίνοντας, ως εκ τούτου, ότι η φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη δεν είναι ικανή να προστατεύει τα εν λόγω καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου από τον επαγόμενο από το 3-BrPA κυτταρικό θάνατο. Συνολικά, φαίνεται πως ο φυσικού τύπου p53 μεταγραφικός παράγοντας δεν συμμετέχει καθοριστικά [ή διαδραματίζει πλεονάζοντα (*redundant*) ρόλο] στην κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA, αλλά είναι το εκάστοτε συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον (στον καρκίνο ουροδόχου κύστης ή παχέος εντέρου) αυτό που ελέγχει (πλήρως ή μερικώς) την ευαισθησία [T24

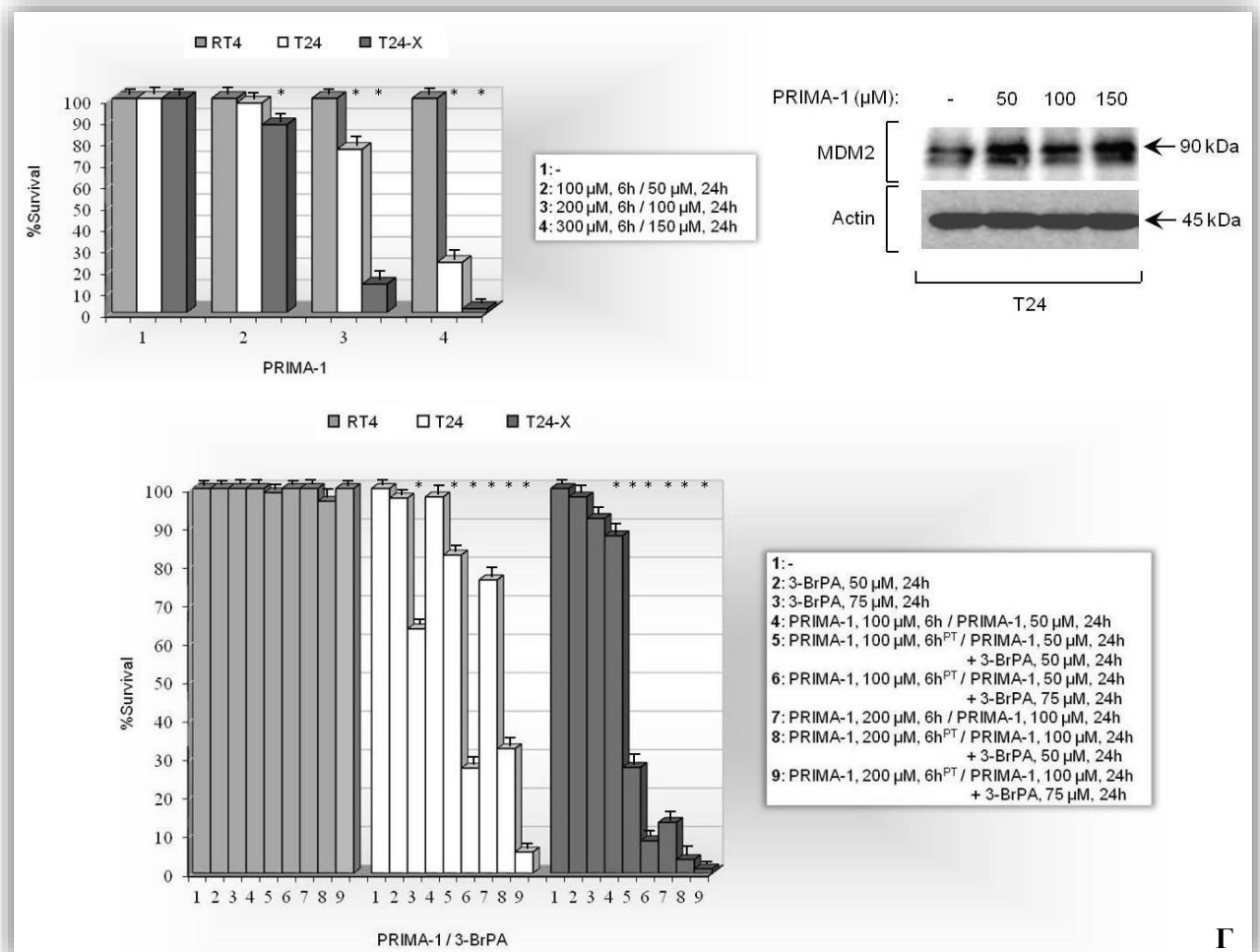
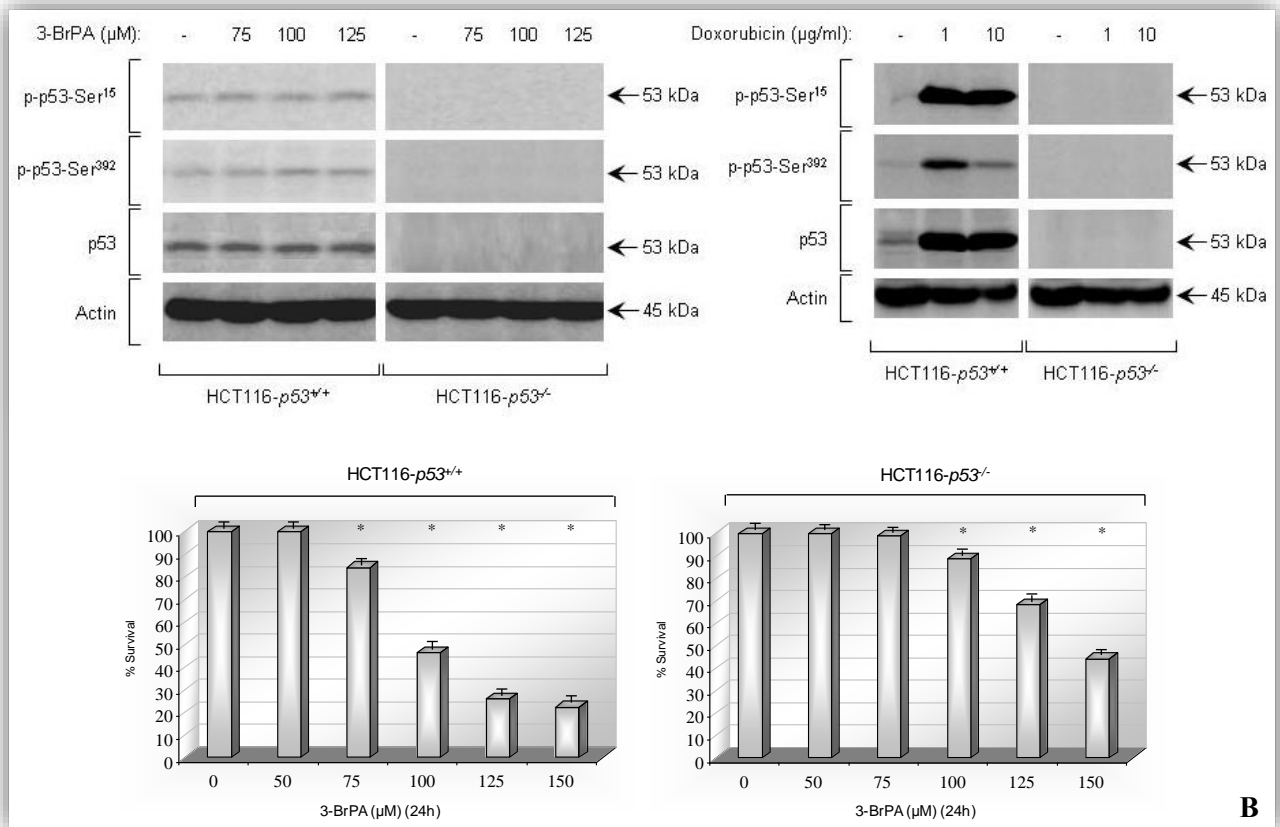
(μεταλλαγμένη p53) και HCT116-p53<sup>+/+</sup>] ή ανοχή [RT4 (φυσικού τύπου p53) και HCT116-p53<sup>-/-</sup>] στο εν λόγω φάρμακο.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε το ενδεχόμενο το 3-BrPA να εμφανίζει συνεργιστική (*synergistic*) δράση με ειδικούς μοριακούς τροποποιητές οι οποίοι στοχεύουν την μεταλλαγμένη και όχι την φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη. Καθώς ο χαμηλού μοριακού βάρους παράγοντας PRIMA-1 είναι σε θέση να μετατρέπει αρκετές μεταλλαγμένες μορφές της p53 σε φυσικού τύπου διαμόρφωση, επαναφέροντας με τον τρόπο αυτό την ογκο-κατασταλτική τους ενεργότητα [467], και οι τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις PRIMA-1, απουσία ή παρουσία επιλεγμένων δόσεων 3-BrPA και οι κυτταροτοξικές αντιδράσεις εκτιμήθηκαν μέσω της MTT δοκιμασίας. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.35Γ** (άνω πλαίσιο), σε αντιδιαστολή με τα RT4 (φυσικού τύπου p53), τα οποία παραμένουν αμετάβλητα, τα T24 και T24-X κύτταρα (μεταλλαγμένη p53) επιδεικνύουν μία δοσο-εξαρτώμενη ισχυρή μείωση του βαθμού επιβίωσης ως απόκριση στο PRIMA-1 (100, 200 και 300  $\mu\text{M}$  για 6 ώρες, ακολουθούμενη από 50, 100 και 150  $\mu\text{M}$  για 24 ώρες, αντίστοιχα), με τα T24 να προβάλλονται αξιοσημείωτα πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα T24-X κύτταρα στο φάρμακο. Προ-επώαση των υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (κυτταρικής πυκνότητας ~60%) με 100 ή 200  $\mu\text{M}$  PRIMA-1 για 6 ώρες και διαδοχική έκθεσή τους σε 50  $\mu\text{M}$  (B50) ή 75  $\mu\text{M}$  (B75) 3-BrPA για 24 ώρες, παρουσία PRIMA-1 [50  $\mu\text{M}$  (P50) ή 100  $\mu\text{M}$  (P100), αντίστοιχα], είχε ως αποτέλεσμα την καταφανή κυτταροτοξική συνέργεια των δύο αυτών παραγόντων, δεδομένου ότι τα B50-P50, B75-P50, B50-P100 και B75-P100 «κοκτέιλ» φαρμάκων αποδείχθηκαν σημαντικά πιο δραστικά στο να προκαλούν θάνατο στα T24 και T24-X κύτταρα (αλλά όχι στα RT4) σε σύγκριση με τα υπό μορφής μονο-σχημάτων φάρμακα B50, B75, P50 και P100 (**Εικόνα 3.35Γ**, κάτω πλαίσιο). Αντιθέτως, ο συνδυασμός χαμηλών δόσεων 3-BrPA με άλλους αντι-καρκινικούς παράγοντες, όπως η Doxorubicin και η Taxol δεν οδήγησε σε συνεργατική δράση των αντίστοιχων φαρμάκων και αυξημένο θάνατο των T24 κυττάρων (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα). Όπως αποκαλύπτεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western, η πρωτεΐνη MDM2 φαίνεται να υπερ-εκφράζεται έντονα στα T24 κύτταρα παρουσία όλων των συγκεντρώσεων PRIMA-1 (50, 100 και 150  $\mu\text{M}$  για 24 ώρες), υποδεικνύοντας, ως εκ τούτου, την εξαρτώμενη από το PRIMA-1 μετατροπή της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης στην φυσικού τύπου μορφή αυτής, η



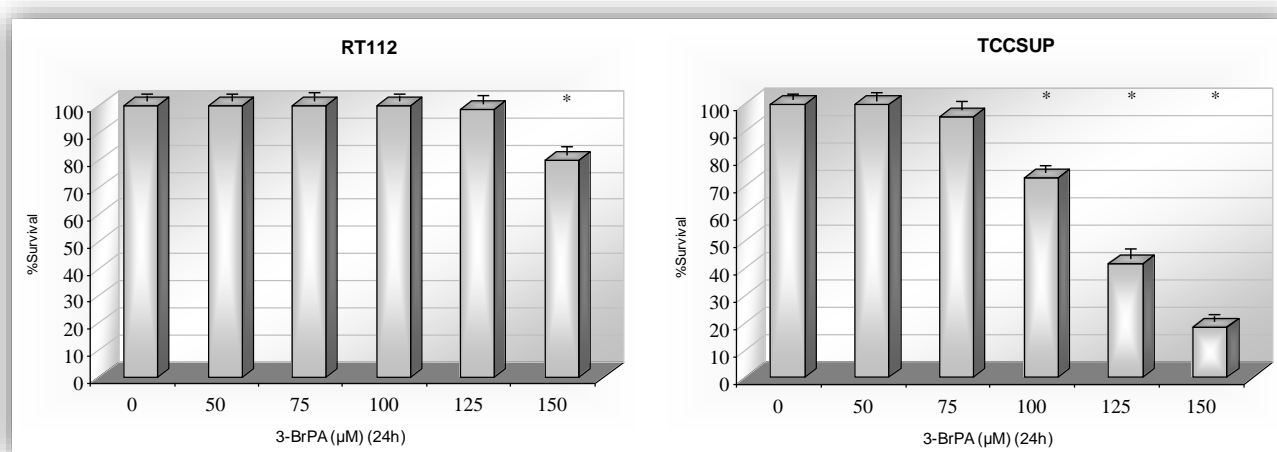
οποία δύναται να ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο στόχο της *MDM2* (Εικόνα 3.35Γ, άνω πλαίσιο) [174, 183, 464]. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει, όμως, την πιθανή εμπλοκή άλλων p53-ανεξάρτητων αποκρίσεων των T24 κυττάρων έπειτα από έκθεσή τους στο PRIMA-1 [467]. Φαίνεται πως παρά την απουσία συσχέτισης της δράσης του 3-BrPA με το p53 γενετικό υπόβαθρο (*genetic background*), η λειτουργική αποκατάσταση της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης παρέχει στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης το θεραπευτικό πλεονέκτημα του να γίνονται σαφώς πιο ευάλωτα στην τοξική δράση του 3-BrPA.





**Εικόνα 3.35** Η παρουσία της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης αδυνατεί να διασώσει τόσο τα T24 κύτταρα ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου (**A**) όσο και τα HCT116 κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου παχέος εντέρου (**B**) (~60% κυτταρικής πυκνότητας) από την 24ωρη επίδραση του 3-BrPA, ενώ η δια μέσου του PRIMA-1 στοχευμένη ενεργοποίηση της μεταλλαγμένης p53 μορφής ενισχύει την κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA στα T24 και T24-X κύτταρα (**Γ**). (**A**, άνω πλαίσιο) εικόνες ανοσο-στυπώματος Western συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων T24 παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων (CMV ή CMV-p53 cDNA) μετά από 24ωρη επώαση με 3-BrPA (αριστερό πλαίσιο) ή Doxorubicin (δεξιό πλαίσιο), (**A**, κάτω πλαίσιο) MTT δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας T24 παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων (CMV ή CMV-p53 cDNA) μετά από 24ωρη επίδραση του 3-BrPA, (**B**, άνω πλαίσιο) εικόνες ανοσο-στυπώματος Western συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων HCT116-p53<sup>+/+</sup> και HCT116-p53<sup>-/-</sup> κυττάρων μετά από 24ωρη επώαση με 3-BrPA (αριστερό πλαίσιο) ή Doxorubicin (δεξιό πλαίσιο), (**B**, κάτω πλαίσιο) MTT δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας HCT116-p53<sup>+/+</sup> και HCT116-p53<sup>-/-</sup> κυττάρων (~60% κυτταρικής πυκνότητας) στην 24ωρη χορήγηση 3-BrPA και (**Γ**) MTT δοκιμασίες κυτταροτοξικής συνέργειας 3-BrPA και PRIMA-1 στα T24 και T24-X κύτταρα (~60% κυτταρικής πυκνότητας), καθώς και ανοσο-στυπώμα Western συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων T24 κυττάρων επωασμένων για 24 ώρες με PRIMA-1. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας ανοσο-στυπώματος Western αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (καθώς και των αντίστοιχων φωσφορυλιωμένων τους μορφών), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά τους βάρη σε “kDa”. Κάθε συγκέντρωση (ή συνδυασμός) φαρμάκου(ων), σε ότι αφορά στην MTT δοκιμασία, ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *p*:- φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Actin*: Ακτίνη, *Doxorubicin*: Δοξορουβικίνη, *Survival*: Επιβίωση, *h*: ώρες, *PT (Pre-treatment)*: Προ-επώαση και  $\mu M - \mu g/ml$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

Εκτός από το διαφορετικό γενετικό προφίλ της p53, υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός των RT4 και T24 κυττάρων, με τα RT4 να χαρακτηρίζονται ως βαθμού κακοήθειας I και τα T24 ως βαθμού κακοήθειας III καρκινικά κύτταρα. Έτσι, σε μία προσπάθεια συσχέτισης του βαθμού κακοήθειας των κυττάρων του ουροθηλιακού όγκου με την ευαισθησία στο 3-BrPA, μελετήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν, μέσω της MTT δοκιμασίας, οι κυτταροτοξικές αποκρίσεις διαφορετικών δόσεων του 3-BrPA (50, 75, 100, 125 και 150  $\mu\text{M}$  για 24 ώρες) στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος  $\sim 60\%$ ) RT112 [βαθμός κακοήθειας I-II (*grade I-II*)] και TCCSUP [βαθμός κακοήθειας IV (*grade IV*)]. Αν και τα RT112 κύτταρα εμφανίζονται με ισχυρή ανθεκτικότητα στην καταστρεπτική δράση του 3-BrPA, με εξαίρεση την ελαφρά κυτταροτοξικότητα ( $\sim 20\%$ ) που παρατηρείται μόνο στα 150  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, τα TCCSUP παρουσιάζονται με μία δοσο-εξαρτώμενη ισχυρή μειορρύθμιση του βαθμού επιβίωσης, με το  $\sim 80\%$  των κυττάρων να καταστρέφονται στη συγκέντρωση 150  $\mu\text{M}$  του 3-BrPA (Εικόνα 3.36). Συμπερασματικά, πιθανώς να είναι ο υψηλός βαθμός κακοήθειας (T24, T24-X και TCCSUP) υπαίτιος για τη μεταστροφή των κυττάρων σε ευαίσθητα στην κυτταροτοξική ενεργότητα του 3-BrPA, ενώ ένα περιβάλλον χαμηλού βαθμού κακοήθειας (RT4 και RT112) ενδεχομένως να προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης από την φαρμακο-επαγόμενη τοξική προσβολή.



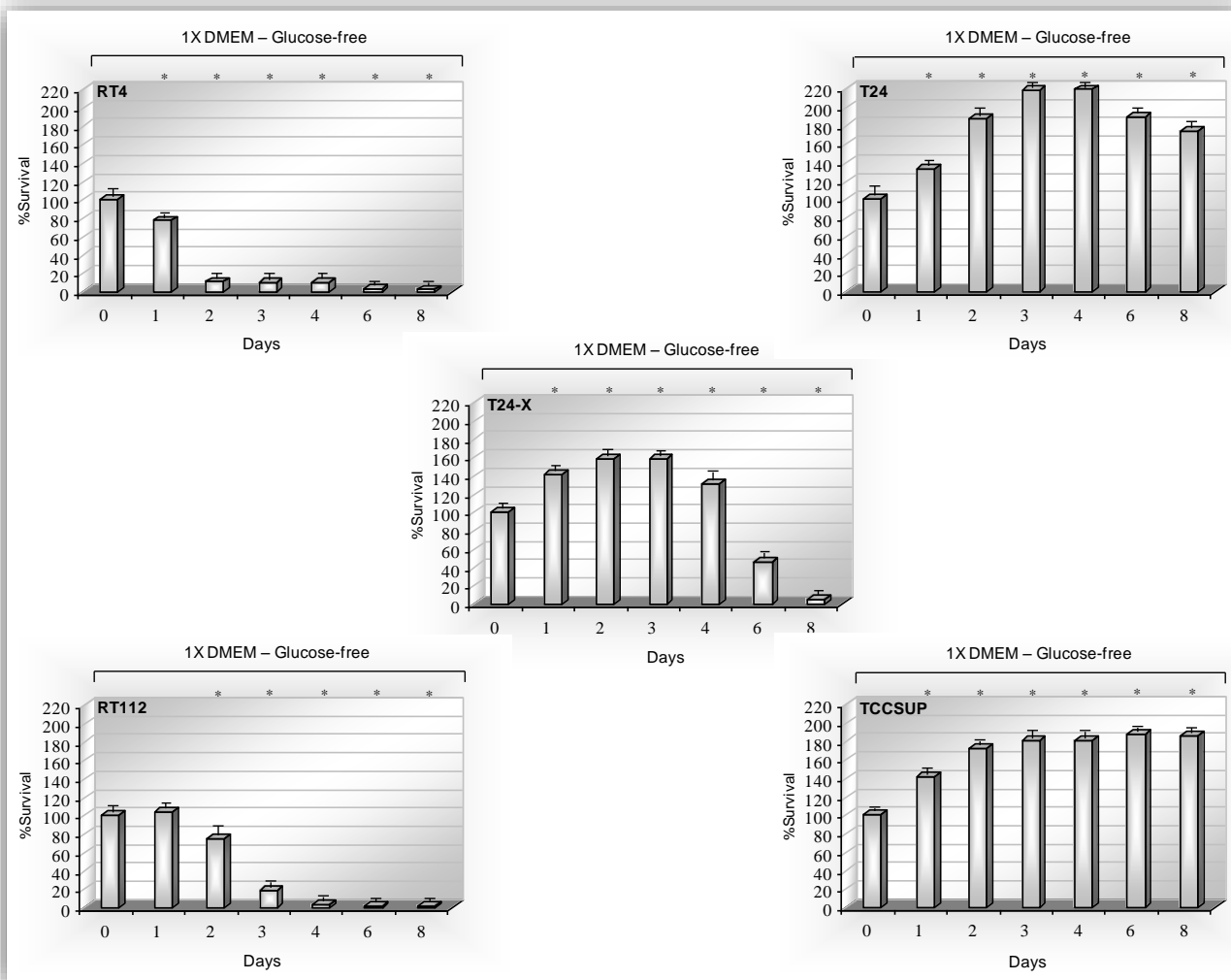
**Εικόνα 3.36** Εμπλοκή του διαφορετικού βαθμού κακοήθειας των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT112 (*grade I-II*) και TCCSUP (*grade IV*) ( $\sim 60\%$  κυτταρικής πυκνότητας) στην επαγόμενη από το 3-BrPA (24 ώρες) κυτταρική τοξικότητα, όπως αποδεικνύεται δια μέσου της MTT δοκιμασίας. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική

διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *grade*: βαθμός κακοήθειας, *h*: ώρες και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

### 3.3.7 Μειορρύθμιση καθοριστικών στοιχείων της ομοιόστασης της γλυκόζης μετά από έκθεση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA – φαρμακο-εξαρτώμενη επαγωγή της αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου (*exon splicing silencing*) του *GLUT4* γονιδίου

Έχει σχετικά πρόσφατα αναφερθεί από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Bert Vogelstein στο Κέντρο Καρκίνου του Αμερικάνικου Πανεπιστημίου Johns Hopkins ότι σε αντίθεση με τους φυσικού τύπου «ισογονιδιακούς» (*isogenic*) κυτταρικούς πληθυσμούς καρκίνου του παχέος εντέρου, οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες μορφές αυτών που φέρουν τις μεταλλαγές G13D (γλυκίνη σε ασπαρτικό οξύ, στο κωδικόνιο 13) και V600E [βαλίνη σε γλουταμι(νικό οξύ στο κωδικόνιο 600] στα γονίδια *K-Ras* και *B-Raf*, αντίστοιχα, μπορούν να επιβιώνουν σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ η ανάπτυξή τους καταστέλλεται από το 3-BrPA [468]. Ως εκ τούτου, και οι πέντε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) καλλιεργήθηκαν για 8 διαδοχικές ημέρες σε θρεπτικό υλικό DMEM 1X απουσία γλυκόζης (άλλα πλήρες ως προς τα υπόλοιπα συστατικά) και μέσω της MTT δοκιμασίας υπολογίστηκαν τα ποσοστά επιβίωσης κάθε μίας εξ αυτών. Τα T24 και TCCSUP κύτταρα αποδείχθηκαν ικανά να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται αποτελεσματικά σε περιβάλλοντα ελεύθερα από γλυκόζη (*glucose free*) και για τις 8 συνεχόμενες ημέρες, ενώ τα T24-X υπέστησαν σοβαρές βλάβες την 6<sup>η</sup> ημέρα και καταστράφηκαν τελείως την 8<sup>η</sup> ημέρα, σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης στο καλλιεργητικό μέσο. Από την άλλη, τα RT4 και RT112 κύτταρα εμφανίστηκαν με υψηλή ευαισθησία στην απουσία γλυκόζης, με τα RT4 να πεθαίνουν ακόμα και από την 1<sup>η</sup> ημέρα επώασής τους σε αναπτυξιακό περιβάλλον στέρησης γλυκόζης (Εικόνα 3.37). Η DNA αλληλούχιση (DNA

*sequencing*) των PCR προϊόντων (δια μέσου της χρήσης γονιδιωματικού τύπου DNA ολιγο-εκκινητών), προερχόμενων από τους *K-Ras* και *B-Raf* γονιδιακούς τόπους, τα οποία περιέχουν τα αντίστοιχα κωδικόνια της γλυκίνης (G) 13 (εξώνιο 2) και της βαλίνης (V) 600 (εξώνιο 15) (**Πίνακας 3.4**) και η επακόλουθη σύγκριση των αποκτώμενων DNA νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τα δημοσίως διαθέσιμα συγκεντρωτικά γονιδιώματα της Εταιρείας Γονιδιωματικής Πληροφόρησης και Αναφοράς (*Genome Reference Consortium*) απέδειξε ότι και οι πέντε κυτταρικοί τύποι (RT4, T24, T24-X, RT112 και TCCSUP) δεν φέρουν τις μεταλλάξεις G13D και V600E στα *K-Ras* και *B-Raf* αντίστοιχα αλληλόμορφα γονίδια. Επομένως, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου [468], η ανεκτικότητα (για την συγκεκριμένη πειραματική περίοδο) στην απώλεια γλυκόζης και (αντιστρόφως) η ευαισθησία στο 3-BrPA [T24, T24-X και TCCSUP (**Εικόνες 3.26B, 3.28, 3.36 και 3.37**)] δεν συσχετίζονται με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα *K-Ras*<sup>G13D</sup> και *B-Raf*<sup>V600E</sup> σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (**Πίνακας 3.4**), ενώ οι αντίθετες αποκρίσεις τους (καρκινικών κυττάρων τόσο παχέος εντέρου όσο και ουροδόχου κύστης) στο 3-BrPA και στο στρες προερχόμενο από έλλειψη γλυκόζης (συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.4**) ανακλύπουν ως καινοφανή και σημαντικά θέματα στο μεταβολισμό του καρκίνου, τα οποία χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης. Χορήγηση N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (*N-acetyl-glucosamine, GlcNAc*) σε αιμοποιητικά κύτταρα που αναπτύσσονται υπό συνθήκες έλλειψης γλυκόζης (*glucose starvation*) είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της κυτταρικής επιβίωσης και ανάπτυξης, μέσω της προώθησης της εξαρτώμενης από την ιντερλευκίνη-3 πρόσληψης και μεταβολισμού της γλουταμίνης ως εναλλακτική πηγή ενέργειας [469]. Για τον λόγο αυτό, τα RT4 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες απουσίας γλυκόζης, παρουσία όμως υψηλών συγκεντρώσεων GlcNAc (10 και 20 mM) για 4 ημέρες, ενώ τα T24, έπειτα από προ-επάση με GlcNAc για 2 (ή περισσότερες) ημέρες, εκτέθηκαν διαδοχικά στο 3-BrPA (75 και 100 μM) για 24 ώρες και ο βαθμός επιβίωσής τους ποσοτικοποιήθηκε μέσω της MTT δοκιμασίας. Δυστυχώς, ούτε η απουσία γλυκόζης ούτε η κυτταροτοξική ενεργότητα του 3-BrPA στα RT4 και T24 κύτταρα, αντίστοιχα, ήταν δυνατόν να ξεπεραστούν, έστω και μερικώς, μέσω χορήγησης GlcNAc (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), υποδηλώνοντας ως εκ τούτου τον θεμελιώδη ρόλο της γλυκόζης - αλλά όχι της γλουταμίνης- ως το καθοριστικότερο βιο-ενεργητικό υπόστρωμα (*bioenergetic substrate*) των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.



**Εικόνα 3.37** Βαθμο-εξαρτώμενη διαφορετική ανθεκτικότητα ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου [RT4 (*grade I*), RT112 (*grade I-II*), T24 (*grade III*), T24-X (*grade ≥III*) και TCCSUP (*grade IV*)] (~60% κυτταρικής πυκνότητας) στην απουσία γλυκόζης, η οποία χαρακτηρίζεται ως μία «αντίστροφη» απόκριση από αυτή της ευαισθησίας στην 24ωρη έκθεση στο 3-BrPA, όπως αποκαλύπτεται μέσω της MTT δοκιμασίας (βλέπε Εικόνες 3.26, 3.28 και 3.36). Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *Glucose-free*: Απουσία γλυκόζης, *grade*: βαθμός κακοήθειας, *Days*: ημέρες και  $\mu M$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

**Πίνακας 3.4** Οι εξαρτώμενες από τον βαθμό κακοήθειας διαφορετικές αποκρίσεις των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης RT4, RT112, T24, T24-X και TCCSUP στην απουσία γλυκόζης ή στην παρουσία 3-BrPA δεν σχετίζονται με το γενετικό υπόβαθρο των *K-Ras* και *B-Raf* γονιδιακών τόπων. *Bladder Cancer*: Καρκίνος Ουροδόχου Κύστης, *System*: Σύστημα, *Gene Product*: Γονιδιακό Προϊόν, *Response to Stress*: Απόκριση στο Στρες, *Cell Type*: Κυτταρικός Τύπος, *Malignancy Grade*: Βαθμός Κακοήθειας, *Tolerance to Glucose Deprivation*: Ανεκτικότητα στη Στέρηση Γλυκόζης, *Resistance to*: Ανθεκτικότητα σε, *wild-type*: φυσικός τύπος, *predictable*: προβλέψιμο, *less tolerant than*: λιγότερο ανεκτικό από, *more resistant than*: περισσότερο ανθεκτικό από, *G*: Γλυκίνη, *D*: Ασπαρτικό οξύ, *V*: Βαλίνη και *E*: Γλουταμ(ιν)ικό οξύ.

Bladder Cancer					
System		Gene Product		Response to Stress	
Cell Type	Malignancy Grade <sup>(I-IV)</sup>	K-Ras <sup>(G13D)</sup>	B-Raf <sup>(V600E)</sup>	Tolerance to Glucose Deprivation	Resistance to 3-BrPA
RT4	I	wild-type	wild-type	-	+
T24	III	wild-type	wild-type	+	-
T24-X	≥III <sup>1</sup>	wild-type	wild-type	+ <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>
RT112	I-II	wild-type	wild-type	-	+
TCCSUP	IV	wild-type	wild-type	+	-

<sup>1</sup>: *predictable*; <sup>2</sup>: *less tolerant than T24*; <sup>3</sup>: *more resistant than T24*

Καθώς έχει αναφερθεί ότι το 3-BrPA μπορεί και στοχεύει τα γλυκολυτικά ένζυμα HK2 και GAPDH [386, 406, 409, 411, 470], τα καρκινικά κύτταρα RT4, T24 και T24-X (κυτταρικής πυκνότητας ~60%) εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις 3-BrPA για 24 ώρες και τα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν στη διαδικασία του ανοσο-στυπώματος Western χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα πρωτογενή αντισώματα για τις μεταβολικές πρωτεΐνες HK2 και GAPDH. Σε αντίθεση με τα RT4 που παρέμειναν ανεπηρέαστα, τα T24 κύτταρα

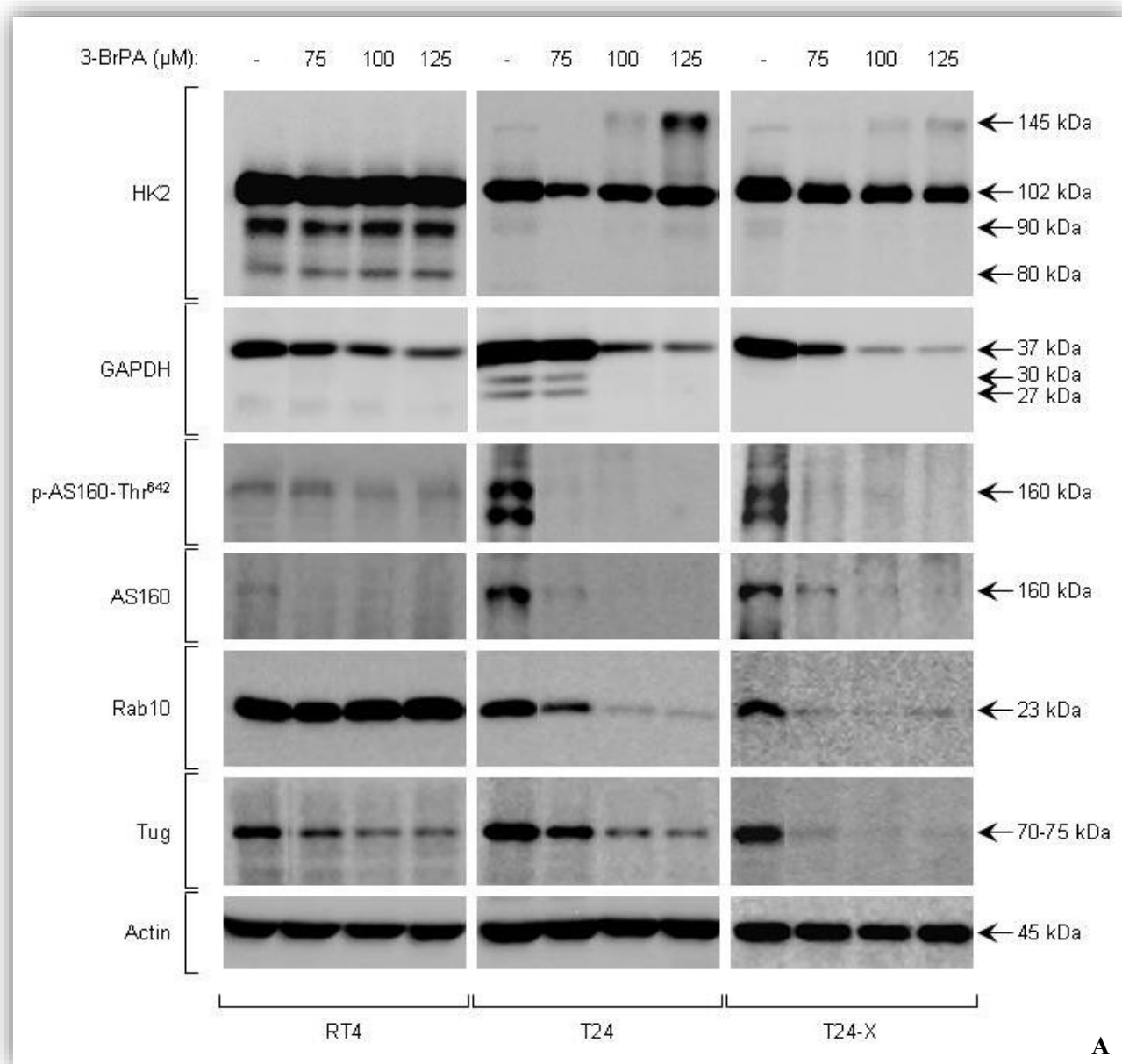


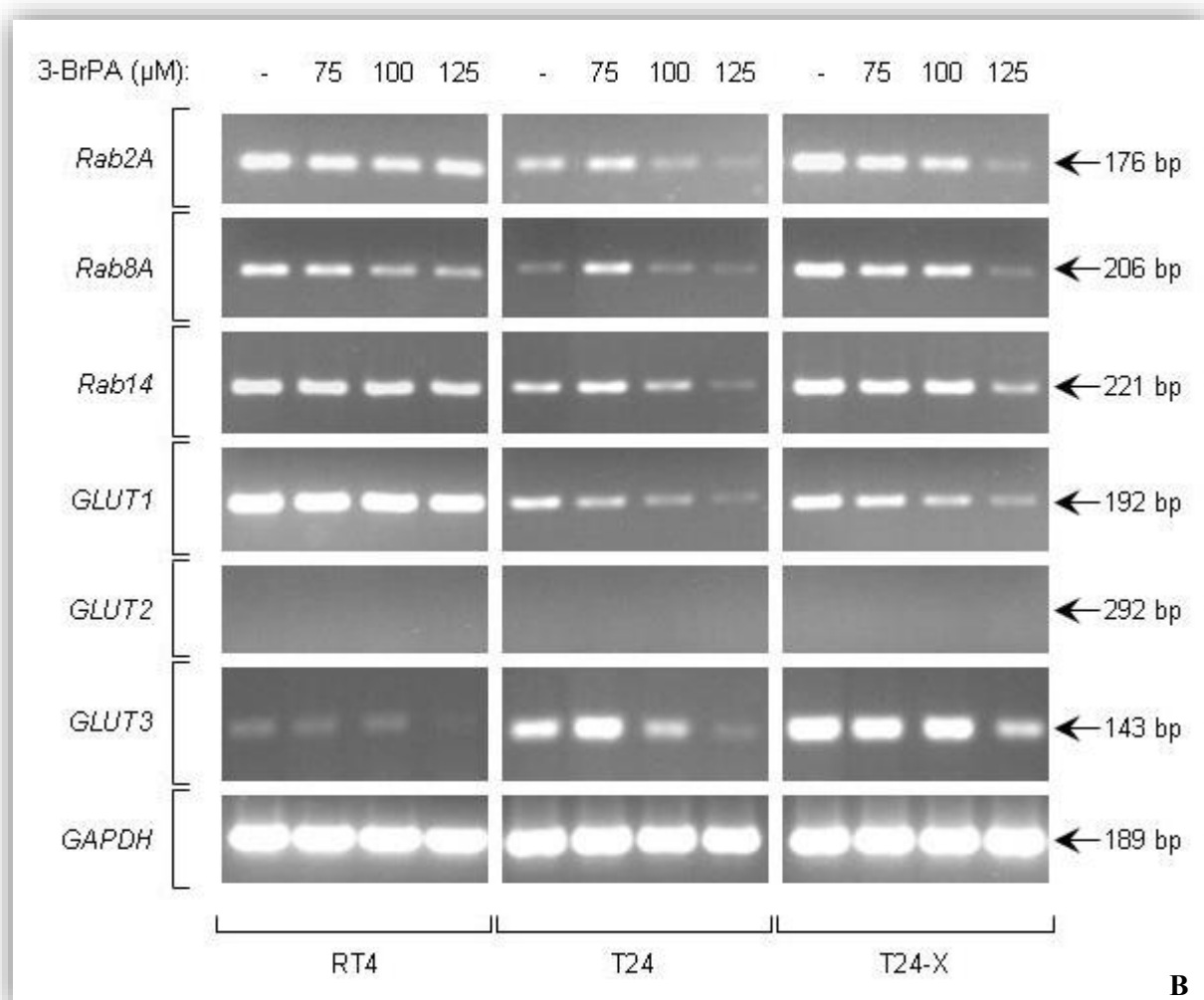
επέδειξαν αξιοσημείωτη μείωση της HK2 πρωτεΐνης στα 75  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου και δοσο-εξαρτώμενη ανάκτηση των επιπέδων αυτής (συγκριτικά με τα 75  $\mu\text{M}$ ) στις συγκεντρώσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$ . Όμως, χορήγηση 3-BrPA στα T24-X κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της HK2 πρωτεΐνης, με την μέγιστη επίδραση να εντοπίζεται στα 125  $\mu\text{M}$ . Οι υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίζονται στα T24 και T24-X κύτταρα ως απόκριση στα 100 και κυρίως στα 125  $\mu\text{M}$  3-BrPA ενδεχομένως αντιπροσωπεύουν μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες [για παράδειγμα πυρουβυλιωμένες (*pyrrounylated*)] ή διαφορεικά ματισμένες (*alternatively spliced*) μορφές του HK2 μεταβολικού ενζύμου, με εξασθενημένες γλυκολυτικές ενεργότητες. Εναλλακτικά, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί και ένα σενάριο λειτουργικώς ανενεργών ετερο-διμερών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Από την άλλη, οι χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται συστατικώς στην RT4 κυτταρική σειρά, θα μπορούσαν πιθανώς να φέρουν τέτοιες ενζυμικές λειτουργίες που να συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών έναντι της κυτταροτοξικής δυναμικής του 3-BrPA (**Εικόνα 3.38A**). Αρνητικά φαίνεται πως επηρεάζεται και η GAPDH πρωτεΐνη μετά από έκθεση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στο εν λόγω φάρμακο. T24 και T24-X κύτταρα, στα οποία έχει χορηγηθεί 3-BrPA, χαρακτηρίζονται από δραστική ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της GAPDH πρωτεΐνης στις δόσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$ , ενώ τα T24 προβάλλονται σημαντικά πιο ανθεκτικά στη συγκέντρωση 75  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου συγκριτικά με τα T24-X κύτταρα. Προς μεγάλο ενδιαφέρον, τα RT4 εμφανίζονται, επίσης, με μία δοσο-εξαρτώμενη και σημαντική μειορρύθμιση της GAPDH ως απόκριση στο φάρμακο (**Εικόνα 3.38A**). Διαφαίνεται, λοιπόν, ότι το 3-BrPA δύναται να στοχεύει και ίσως να βλάπτει τα δύο υπό μελέτη γλυκολυτικά ένζυμα με διαφορετικούς μηχανισμούς. Ενώ η HK2 πιθανόν υπόκειται σε λειτουργικά επιβλαβείς μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [για παράδειγμα πυρουβυλίωση (*pyrrounylation*)], η GAPDH καταστρέφεται δομικά και αποικοδομείται έπειτα από έκθεση των υπό εξέταση καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA.

Αν και η GLUT4 πρωτεΐνη-μεταφορέας (γονίδιο *GLUT4* ή *SLC2A4*) ρυθμίζει κυρίως την πρόσληψη γλυκόζης στο λιπώδη ιστό και σκελετικό μυ, η παράτυπη (έκτροπη) έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης σε διαφορετικούς όγκους δύναται να παρέχει στα κακοήθη κύτταρα σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά στο

μεταβολισμό και στην επιβίωσή τους [196, 471]. Η στρατολόγηση της GLUT4 στην κυτταρική μεμβράνη απαιτεί αναστολή (μέσω φωσφορυλίωσης) της AS160 GTPάσης, κρίσιμο υπόστρωμα στόχος των Akt και AMPK κινασών σερίνης/θρεονίνης, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση των Rab2A, Rab8A, Rab10 και Rab14 πρωτεϊνών που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο ως οργανωτές της διακίνησης συστατικών στο ενδοκυτταρικό μεμβρανικό δίκτυο [471]. Έτσι, RT4, T24 και T24-X κύτταρα υπό την παρουσία ή απουσία 3-BrPA επεξεργάστηκαν και μελετήθηκαν μέσω ανοσο-στυπώματος Western χρησιμοποιώντας ειδικά πρωτογενή αντισώματα. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.38Α**, τόσο η ολική όσο και η συστατικώς φωσφορυλιωμένη -στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνη στη θέση 642- AS160 πρωτεΐνη μειορρυθμίστηκαν δραστικά και στους δύο κυτταρικούς τύπους T24 και T24-X σε όλες τις δόσεις φαρμάκου. Τα RT4 εμφανίζονται με ισχνά επίπεδα έκφρασης ολικής και φωσφορυλιωμένης AS160 πρωτεΐνης, τα οποία υπόκεινται σε δοσο-εξαρτώμενη, αλλά μέτρια, ελάττωση σε απάντηση στο 3-BrPA. Η πρωτεΐνη Rab10, σε αντίθεση με τα RT4 στα οποία παραμένει αμετάβλητη, βλάπτεται σοβαρά έπειτα από έκθεση στο φάρμακο (100 και 125  $\mu\text{M}$ ) στα T24 και T24-X κύτταρα, με τα T24 να παρουσιάζονται σχετικά πιο ανθεκτικά, εν συγκρίσει με τα T24-X, στη συγκέντρωση 75  $\mu\text{M}$ . Η πρωτεΐνη Tug, κρίσιμος ρυθμιστής της πρόσδεσης της GLUT4 στα ενδοκυτταρικά κυστίδια (*vesicles*) [471], αποδείχθηκε ότι ακολουθεί ένα πρότυπο δοσο-εξαρτώμενης μειορρύθμισης και στις τρεις κυτταρικές σειρές καρκίνου ουροδόχου κύστης, με τα T24-X να προκύπτουν σχετικά πιο ευάλωτα από τα T24 στο 3-BrPA. Τα συστατικώς υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών GAPDH, AS160, p-AS160-Thr<sup>642</sup> και Tug στα T24 (και στα T24-X), συγκριτικά με τα RT4 κύτταρα (**Εικόνα 3.38Α**), υποδηλώνουν ότι τα υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης έχουν δημιουργήσει αποτελεσματικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, ενισχύοντας σε μεγάλο βαθμό την πρόσληψη και τον καταβολισμό αυτής, εφόσον και όταν απαιτείται. Για την περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας του 3-BrPA να καταστέλλει την γονιδιακή ενεργότητα άλλων μελών της *Rab* οικογένειας (2A, 8A και 14), απομονώθηκε ολικό RNA από τα υπό μελέτη καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης έπειτα από χορήγηση 3-BrPA και πραγματοποιήθηκαν ημι-ποσοτικές αντιδράσεις sqRT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς, για τα εν λόγω γονίδια, cDNA ολιγο-εκκινητές. Το 3-BrPA (24 ώρες επώαση) αποδείχθηκε ικανό να επάγει ισχυρή

μείωση των μεταγραφικών επιπέδων των *Rab2A*, *Rab8A* και *Rab14* στη συγκέντρωση 125  $\mu\text{M}$  στα T24 και T24-X κύτταρα (~60% κυτταρική πυκνότητα), ενώ μία αξιοπρόσεκτη αυξορρύθμιση και των τριών γονιδιακών ενεργοτήτων παρατηρήθηκε στα T24 στη δόση 75  $\mu\text{M}$  του 3-BrPA. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα T24-X κύτταρα εμφανίζουν συγκριτικά με τα T24 υψηλότερη συστατική έκφραση των *Rab2A*, *Rab8A* και *Rab14* μεταγράφων, υποδεικνύοντας ως εκ τούτου τις αυξημένες απαιτήσεις των εν λόγω κυττάρων για γλυκόζη. Αν και τα γονίδια *Rab2A* και *Rab14* παραμένουν πρακτικά ανεπηρέαστα στα RT4, το *Rab8A* ακολουθεί ένα προφίλ αξιοσημείωτης μειορρύθμισης σε απόκριση στο 3-BrPA. Παρομοίως, οι μεταγραφικές ενεργότητες των γονιδίων *GLUT1* και *GLUT3* [471] φάνηκε να μειώνονται σθεναρά στη δόση 125  $\mu\text{M}$  3-BrPA στα T24 και T24-X κύτταρα, με τα T24-X να αποκαλύπτονται συγκριτικά περισσότερο ανθεκτικά στο φάρμακο. Στα RT4, το *GLUT1* γονίδιο παραμένει αμετάβλητο σε όλες τις δόσεις 3-BrPA, ενώ το *GLUT3*, αν και πολύ ισχνά εκφραζόμενο καταστέλλεται ισχυρά στη συγκέντρωση 125  $\mu\text{M}$ . Το γονίδιο *GLUT2* εμφανίζεται μεταγραφικά ανενεργό και στις τρεις υπό εξέταση καρκινικές κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 3.38B**). Η ισχυρή έκφραση του *GLUT1* στα RT4 και του *GLUT3* στα T24 (και T24-X) πιθανώς αντανάκλα τις διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες των υπό μελέτη κυτταρικών τύπων για επιτυχή επιβίωση και ανάπτυξη. Συνολικά, το 3-BrPA φαίνεται να ασκεί την κυτταροτοξική του δράση στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μέσω εντυπωσιακών μειορρυθμίσεων ποικίλων γλυκολυτικών ρυθμιστών, οι οποίοι ελέγχουν καθοριστικά, κυρίως, την είσοδο και το μεταβολισμό της γλυκόζης.





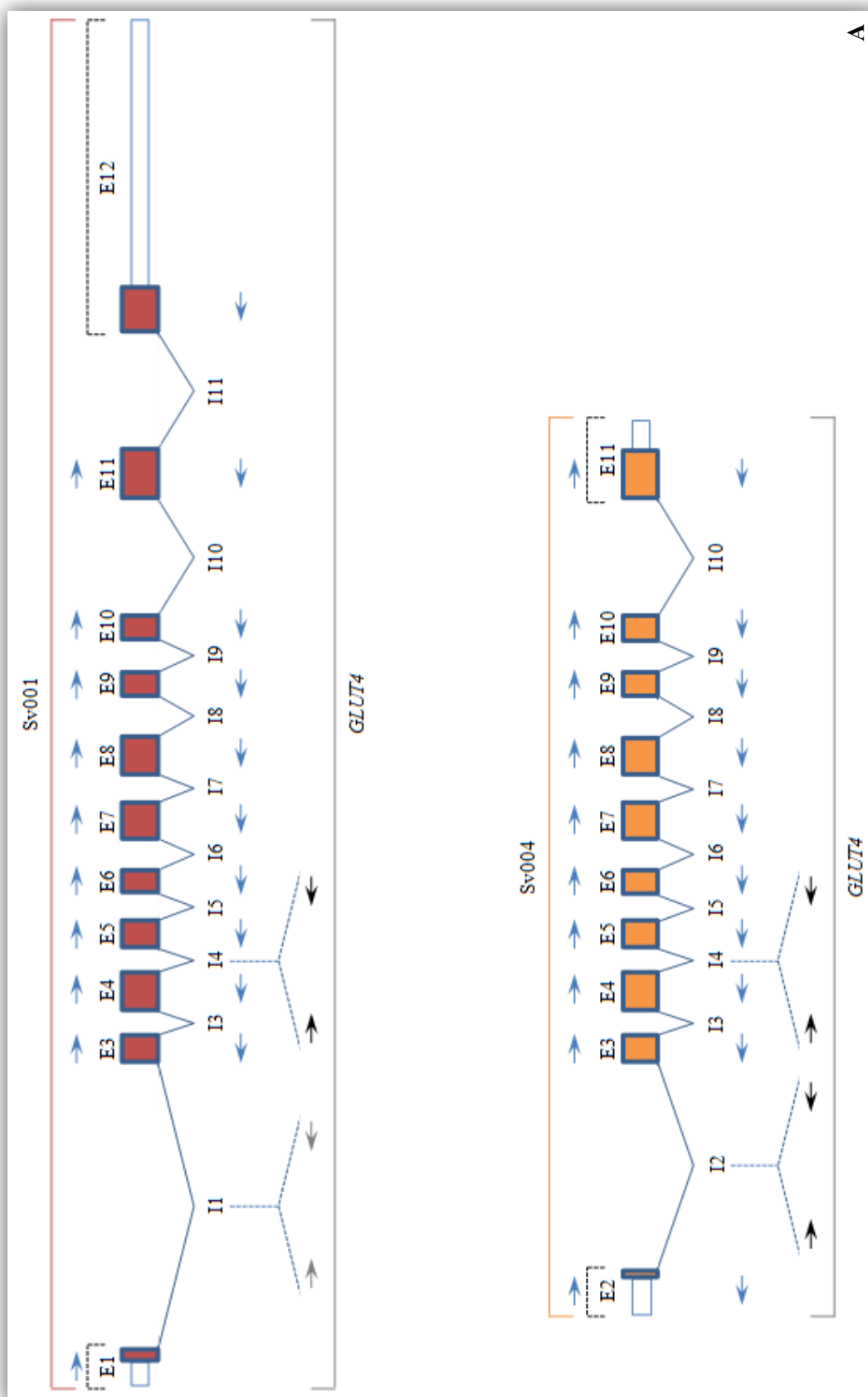
**Εικόνα 3.38** Κυτταρο-ειδική μειορύθμιση κρίσιμων καθοριστών της ομοιόστασης της γλυκόζης μετά από έκθεση ανθρώπινων κυττάρων καοήθους ουροθηλίου (~60% κυτταρικής πυκνότητας) στην 24ωρη έκθεση στο 3-BrPA, όπως διαφαίνεται μέσω ανοσο-στυπώματος Western (A) και ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας (B). Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών (A) και γονιδίων (B), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” της εκάστοτε πρόδρομης και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) πρωτεϊνικής μορφής, αν και όπου υπάρχει (A) και τα μοριακά μεγέθη σε bp των υπό εξέταση γονιδιακών PCR προϊόντων (B). *p*-: φωσφορυλίωση, *Thr*: Θρεονίνη, *Actin*: Ακτίνη, *bp* (*base pair*): ζεύγος βάσεων και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Προς μεγάλη έκπληξη, δια μέσου της ίδιας προσέγγισης, της ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας και της χρήσης ειδικών ολιγο-εκκινητών για το γονίδιο

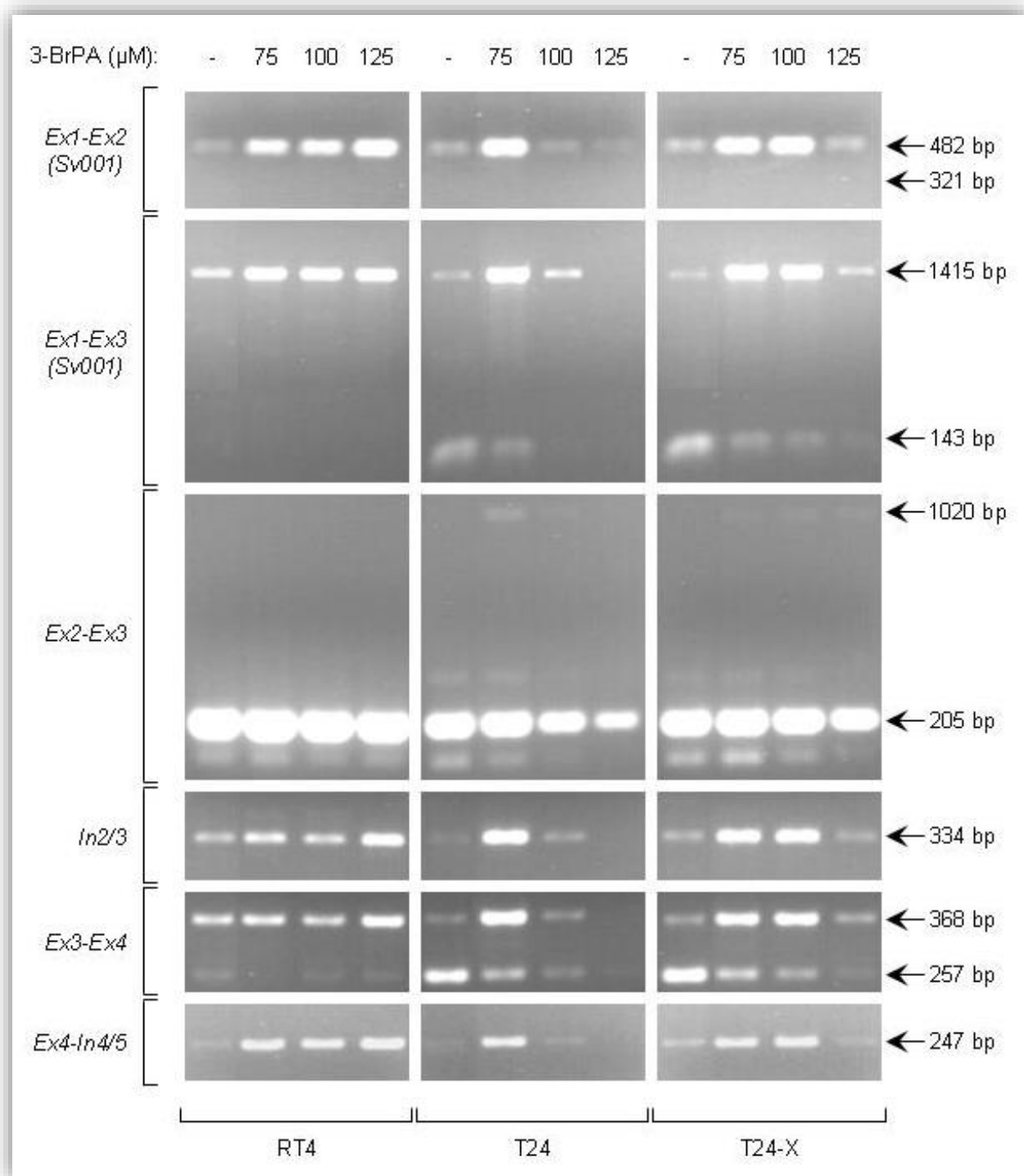
*GLUT4/SLC2A4*, οι οποίοι στοχεύουν τις δύο κύριες RNA ισομορφές ματίσματος (*splicing variants*) Sv001 και Sv004 (**Εικόνα 3.39A**) [οι ισομορφές Sv002 και Sv005 υποβάλλονται σε διαδικασία διάσπασης mRNA φέρον πρόιμο(α) κωδικόνιο(α) λήξης (*NMD, nonsense-mediated mRNA decay*) [472], ενώ η Sv003 αντιπροσωπεύει ένα «χμιαρικό» (*chimeric*) μετάγραφο των μορφών Sv001 και Sv004 ([http://useast.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://useast.ensembl.org/Homo_sapiens))], το 3-BrPA αποδεικνύεται ικανό να επάγει ισχυρά την αποσιώπηση ματίσματος των εξωνίου (*ESS: exon splicing silencing*) των *GLUT4* παραγόμενων RNA μεταγράφων, με τρόπο κυτταρο-ειδικό και δοσο-εξαρτώμενο. Δεδομένου ότι κάθε ζεύγος ολιγο-εκκινητών δύναται να ενισχύει τμήμα διαδοχικών εξωνίων (*Ex: Exon*) και των αντίστοιχων ενδιάμεσων εσωνίων (*In: Intron*), είναι εφικτό να διαχωρίζονται ξεκάθαρα οι ματισμένες (επεξεργασμένες) (*spliced*) [απουσία εσωνίου (*intron absence*)] και μη-ματισμένες (*unspliced*) [παρουσία εσωνίου (*intron presence*)] μορφές RNA μεταγράφων ως απόκριση στο 3-BrPA. Σε αντίθεση, οι ολιγο-εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν να αναδιατάσσονται (υβριδοποιούνται) μέσα στις αλληλουχίες του εκάστοτε εσωνίου (*In*) είναι σε θέση να ενισχύουν αποκλειστικά και μόνο τα μη-ματισμένα (μη-επεξεργασμένα) RNA προϊόντα της μεταγραφής του *GLUT4* γονιδίου (**Πίνακας 3.3**). Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.39B**, τα T24 και T24-X κύτταρα (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) παρουσιάζονται με ισχυρώς αυξημένα μη-ματισμένα (μη-επεξεργασμένα) *GLUT4* RNA μετάγραφα, ως απόκριση στο 3-BrPA (24 ώρες), για σχεδόν όλα τα υπό μελέτη ζεύγη ολιγο-εκκινητών [*Ex1-Ex2* (Sv001-ειδικό), *Ex1-Ex3* (Sv001-ειδικό), *Ex2-Ex3* (ισχνό ESS), *Ex3-Ex4*, *Ex4-Ex5*, *Ex5-Ex7*, *Ex7-Ex8*, *Ex8-Ex9*, *Ex9-Ex10*, *Ex10-Ex11*, *Ex10-Ex11* (Sv004-ειδικό) και *Ex11-Ex12* (Sv001-ειδικό), με τα *Ex1-Ex2*, *Ex1-Ex3*, *Ex3-Ex4*, *Ex7-Ex8*, *Ex9-Ex10* και *Ex10-Ex11* να εμφανίζουν την μεγαλύτερη επίδραση. Τα T24-X φαίνεται να ανταποκρίνονται περισσότερο από τα T24 στο φάρμακο, καθώς ενώ ο φαινότυπος ESS παρατηρείται μόνο στα 75 μM για τα T24, ανιχνεύεται τόσο στα 75 όσο και στα 100 μM του 3-BrPA για τα T24-X κύτταρα σε όλες τις ημι-ποσοτικές sqRT-PCR αντιδράσεις που διεξήχθησαν. Τα RT4 κύτταρα, έπειτα από τη δράση του φαρμάκου, χαρακτηρίζονται από μία δοσο-εξαρτώμενη και ισχυρή υπερ-έκφραση σχεδόν όλων των μη-ματισμένων (μη-επεξεργασμένων) RNA μεταγράφων του *GLUT4* γονιδίου, με τη συγκέντρωση 125 μM να επιδεικνύει την πιο έντονη ESS απόκριση. Είναι ενδιαφέρον ότι η φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμιση των *GLUT4* μη-ματισμένων (μη-επεξεργασμένων) μορφών

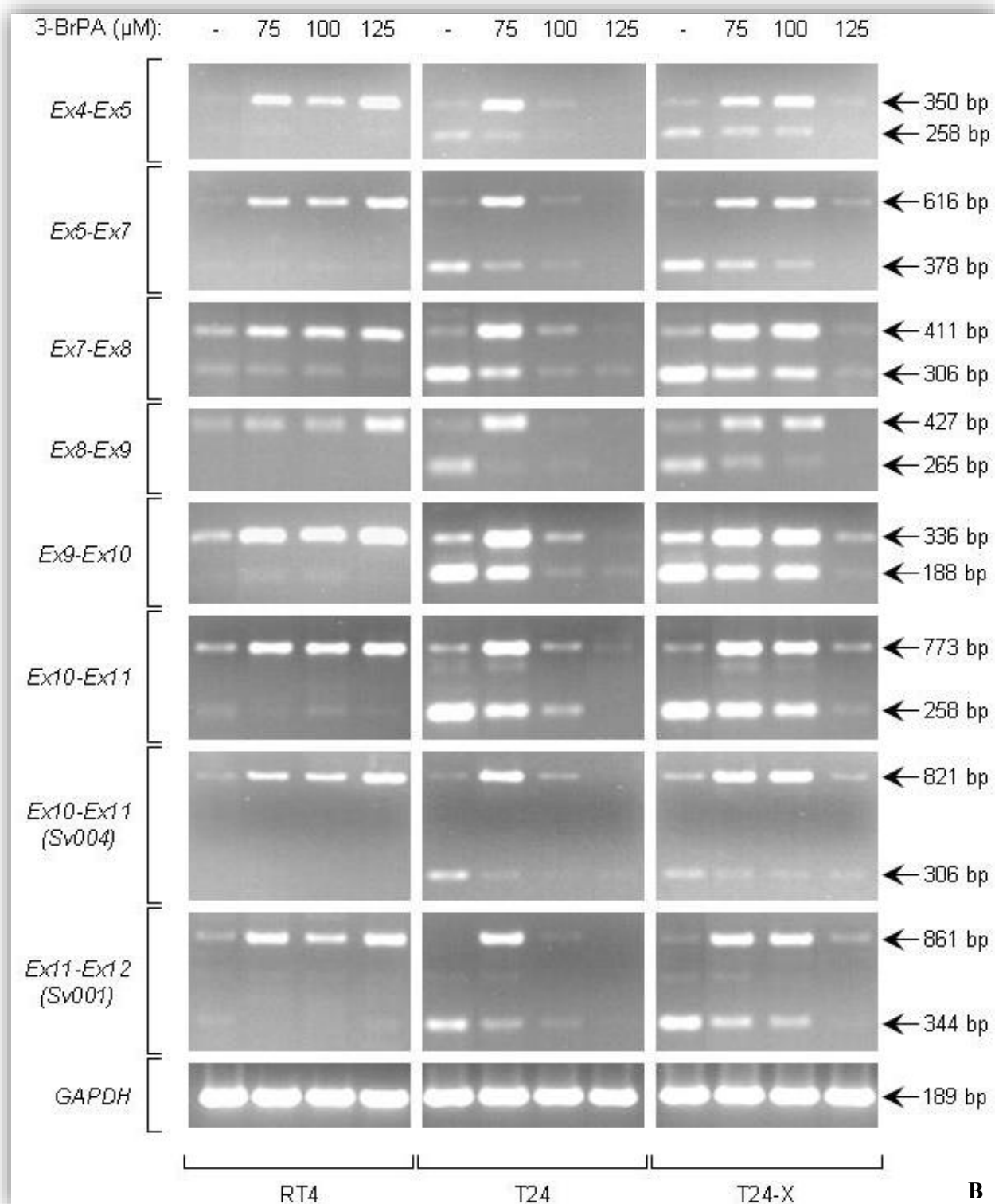
(άνω ζώνες) συνδέεται άρρηκτα με την ταυτόχρονη μειορρύθμιση των συστατικώς ματισμένων (επεξεργασμένων) RNA προϊόντων (κάτω ζώνες) στους κυτταρικούς τύπους T24 και T24-X. Εντούτοις, με εξαίρεση τα *Ex2-Ex3* προϊόντα ματίσματος, τα RT4 προβάλλονται με μη-ανιχνεύσιμα ή ισχνά ανιχνεύσιμα -συστατικώς- ματισμένα (επεξεργασμένα) *GLUT4* RNA μετάγραφα, υποδεικνύοντας ως εκ τούτου ότι η *GLUT4* πρωτεΐνη ίσως κωδικοποιείται από παράτυπα (έκτροπα) RNAs, τα οποία πιθανώς περιλαμβάνουν μόνο τις *Ex2-Ex3* επεξεργασμένες και ώριμες μεταγραφικές αλληλουχίες. Παρόμοια *GLUT4* πρότυπα ESS, σε απάντηση στο 3-BrPA, και για τις τρεις κυτταρικές σειρές, διακρίνονται για τα ζεύγη ολιγο-εκκινητών των περιοχών *In2/3* και *Ex4-In4/5*, τα οποία ενισχύουν επιλεκτικά τις αντίστοιχες αλληλουχίες στο εσώνιο 2/3 (*In2/3*), καθώς επίσης και στο εξώνιο 4 (*Ex4*) και εσώνιο 4/5 (*In4/5*) (**Εικόνα 3.39B**). Επιπροσθέτως, τα μη-ματισμένα (μη-επεξεργασμένα) προϊόντα (άνω ζώνες) των *Ex7-Ex8* και *Ex9-Ex10* περιοχών, τα οποία δημιουργούνται μετά από έκθεση των T24 κυττάρων σε 75  $\mu$ M 3-BrPA, απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν και, μέσω της τεχνικής DNA Sequencing (Αλληλούχισης) τεχνολογίας, διαβάστηκε η πρωτοταγής νουκλεοτιδική αλληλουχία τους. Σύγκριση των αποκτώμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τα διαθέσιμα συγκεντρωτικά γονιδιώματα της Εταιρείας Γονιδιωματικής Πληροφόρησης και Αναφοράς (*Genome Reference Consortium*) απέδειξε την παρουσία των εσωνίων 7/8 και 9/10 ανάμεσα από τα αντίστοιχα εξώνια 7-8 και 9-10 (**Εικόνα 3.39Γ**), επιβεβαιώνοντας αναμφίβολα την ικανότητα του 3-BrPA να επάγει έναν ισχυρό ESS φαινότυπο σε όλο το μήκος του *GLUT4* ανεπεξέργαστου (πρόδρομου) RNA μεταγράφου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης. Επιπλέον, φαίνεται πως εκτός από τη δυνατότητα να ενεργοποιεί *GLUT4*-ειδικούς ESS μηχανισμούς στα RT4, T24 και T24-X κύτταρα, το εν λόγω φάρμακο οδηγεί και σε έντονη μεταγραφική υπερ-έκφραση του *GLUT4* γονιδίου στα RT4 κύτταρα (**Εικόνα 3.39B**). Η φαρμακο-επαγόμενη διατήρηση των εσωνίων του ανεπεξέργαστου (πρόδρομου) RNA του *GLUT4* γονιδίου δημιουργεί πρώιμα κωδικόνια λήξης (*PTC, premature termination codons*) (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), τα οποία συνήθως ενεργοποιούν NMD αποκρίσεις για την στοχευμένη αποικοδόμηση παράτυπων και τοξικών RNA μεταγράφων [472]. Επομένως, το μη-ματισμένο (μη-επεξεργασμένο) *GLUT4* RNA θα μπορούσε να περιέχει αλληλουχίες ικανές να επιφέρουν ανθεκτικότητα στο μηχανισμό NMD και

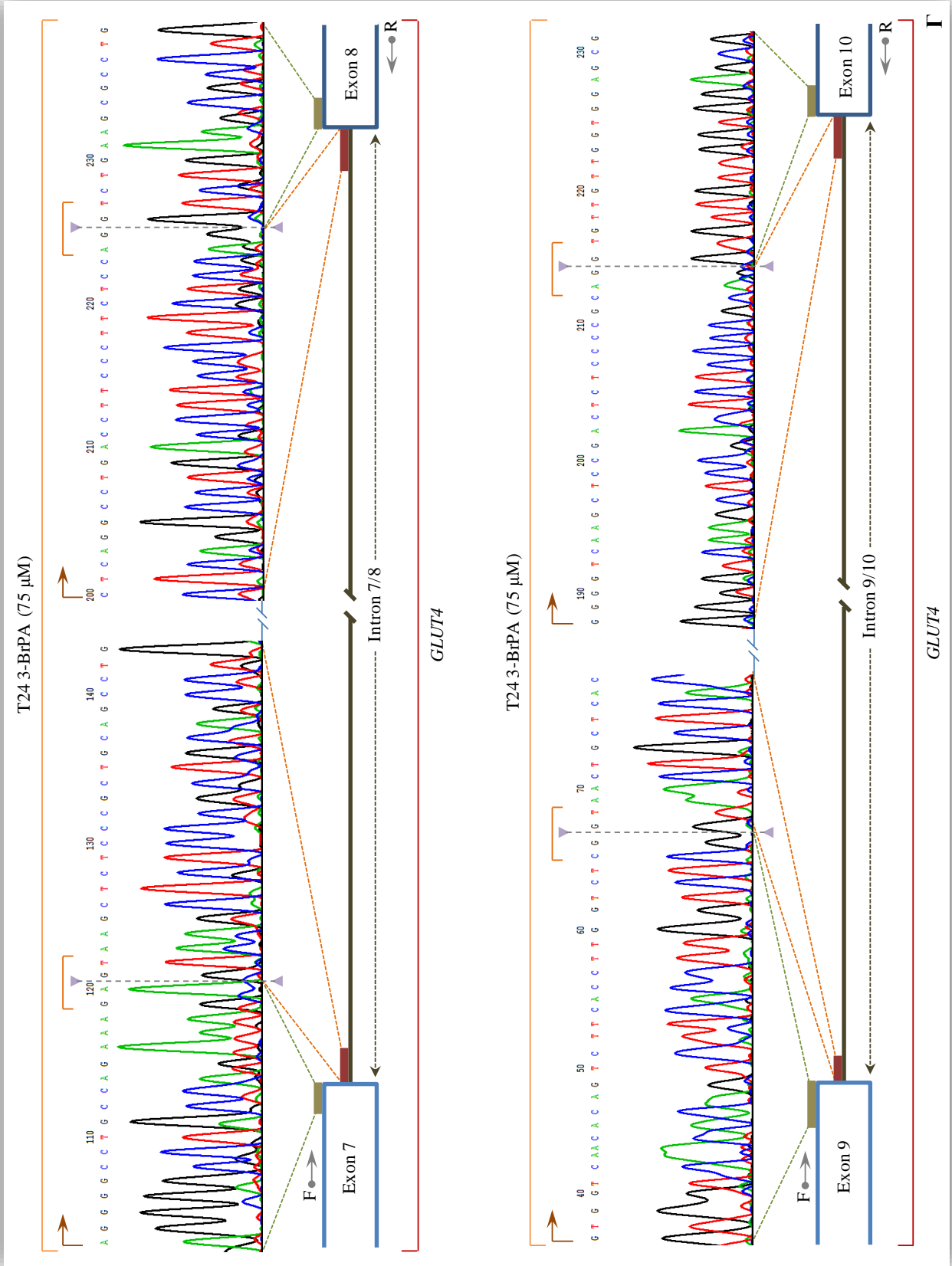
αυξημένη σταθερότητα στο εν λόγω RNA μετάγραφο, όπως έχει αναφερθεί και για το μη-ματισμένο (μη-επεξεργασμένο) RNA του ιού RSV (*Rous Sarcoma Virus*) [473].









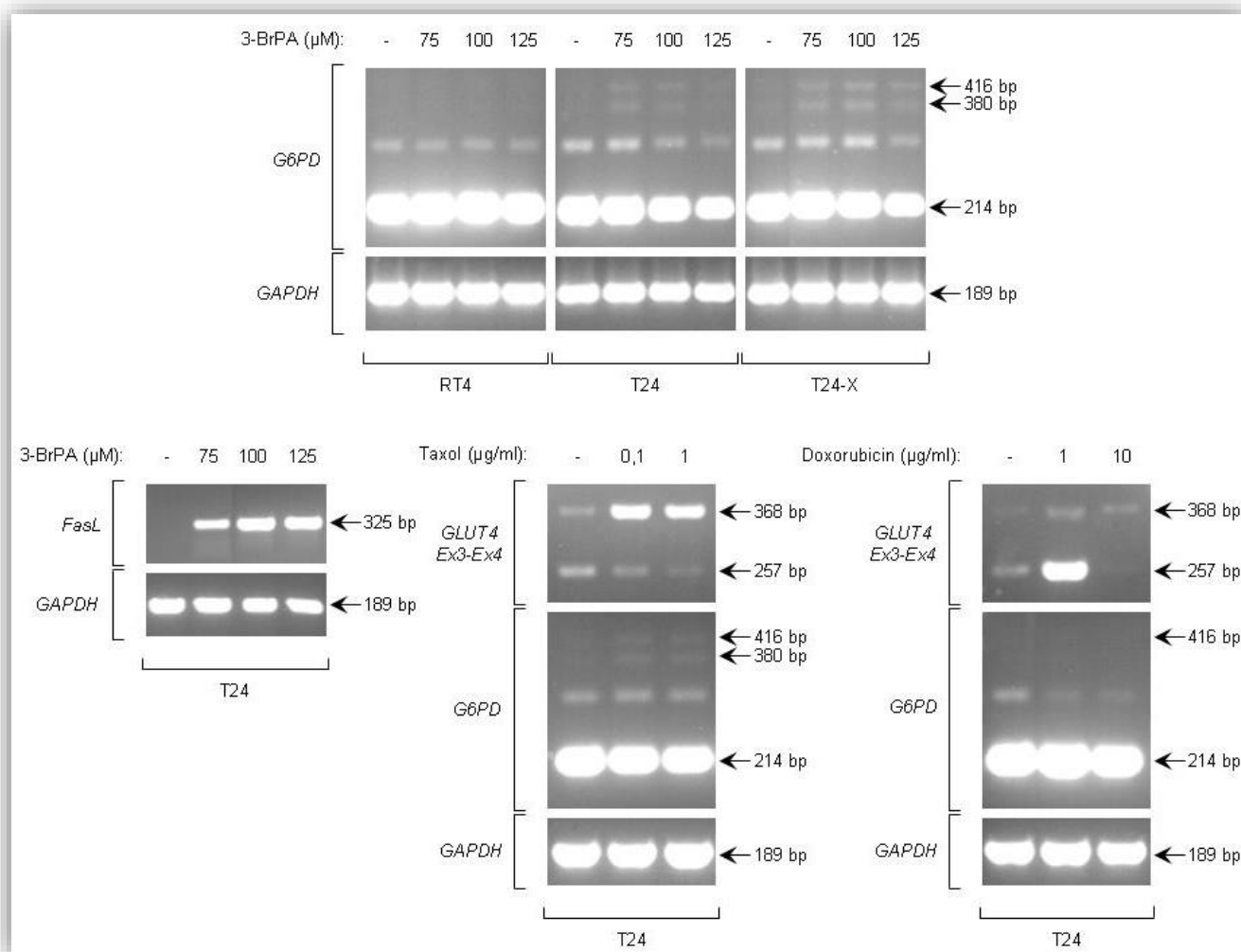


**Εικόνα 3.39** 3-BrPA-εξαρτώμενη επαγωγή του μηχανισμού αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου (*ESS*) του γονιδίου *GLUT4* σε ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου (RT4, T24 και T24-X) (~60% κυτταρικής πυκνότητας), όπως αποκαλύπτεται δια μέσου της ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας (**B**) και DNA αλληλούχισης (**Γ**). (**A**) Σχηματική απεικόνιση των δύο κύριων RNA ισομορφών ματίσματος (*Sv001* και *Sv004*) του γονιδίου *GLUT4* ([http://useast.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://useast.ensembl.org/Homo_sapiens)), όπου με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις σχεδιασμού των χρησιμοποιούμενων oligo-εκκινητών. *E* (*Exon*): Εξώνιο και *I* (*Intron*): Εσώνιο. (**B**) Γονιδιακό προφίλ δοσο-εξαρτώμενου σχηματισμού ανεπεξέργαστων μεταγράφων, στη μορφή αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου (*ESS*), στα RT4, T24 και T24-X κύτταρα ως απόκριση στην 24ωρη έκθεση στο 3-BrPA. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη εξωνίων (αλλά και επιλεγμένων εσωνίων) των δύο RNA ισομορφών (*Sv001* και *Sv004*) του γονιδίου *GLUT4*, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά μεγέθη σε bp των παραγόμενων γονιδιακών PCR προϊόντων. *Ex* (*Exon*): Εξώνιο, *In* (*Intron*): Εσώνιο, *Sv* (*Splicing variant*): Ισομορφή ματίσματος, *bp* (*base pair*): ζεύγος βάσεων και  $\mu M$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. (**Γ**) DNA αλληλούχιση ανεπεξέργαστων εξωνίων, με εμφανή τη διατήρηση του αντίστοιχου ενδιάμεσου εσωνίου (7/8 και 9/10) επιλεγμένων τμημάτων RNA *GLUT4* μεταγράφων, η οποία επιβεβαιώνει το μηχανισμό *ESS*. *ESS* (*Exon Splicing Silencing*): Αποσιώπηση Ματίσματος Εξωνίου, *Exon*: Εξώνιο, *Intron*: Εσώνιο, *F* (*Forward*): Πρόσθιος, *R* (*Reverse*): Ανάστροφος και  $\mu M$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

Καθώς ένας καταστολέας του μηχανισμού ματίσματος εξωνίου (*exonic splicing silencer*) έχει ήδη περιγραφεί στο εξώνιο 12 του γονιδίου *G6PD* [474], ολικό RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης, έπειτα από χορήγηση 3-BrPA, συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε ημι-ποσοτική sqRT-PCR χρησιμοποιώντας ζεύγη oligo-εκκινητών εξειδικευμένα για τα εξώνια 11 και 13 (αμφοτερόπλευρα του εξωνίου 12) του *G6PD* γονιδίου. Σε αντιδιαστολή με τα RT4, τα T24 και T24-X κύτταρα (~60% κυτταρική πυκνότητα), κατόπιν 24ωρης έκθεσης στο 3-BrPA παρουσίασαν μία δοσο-εξαρτώμενη -μικρή αλλά ανιχνεύσιμη- αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του μη-ματισμένου (μη-επεξεργασμένου) *G6PD* RNA, όπως τεκμηριώνεται από τον σχηματισμό μίας ζώνης 416 bp (*base pair*, ζεύγος βάσεων), η

οποία περιέχει, εκτός από τμήμα των εξωνίων 11 και 13, το εξώνιο 12, καθώς και τα αντίστοιχα αμφοτερόπλευρα εσώνια 11/12 και 12/13, με τα T24-X να ανταποκρίνονται περισσότερο από τα T24 κύτταρα στο φάρμακο. Η δεύτερη φαρμακο-επαγόμενη ζώνη των ~380 bp αντιπροσωπεύει ένα νέο παράτυπο RNA μετάγραφο, το οποίον πιθανώς έχει δημιουργηθεί μέσω μίας παρόμοιας ESS διαδικασίας (**Εικόνα 3.40**, άνω πλαίσιο). Παρά την πληθώρα των γονιδιακών RNA μεταγράφων που εξετάστηκαν (**Εικόνες 3.31B, 3.38B** και μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), μόνο τα γονίδια *GLUT4* και *G6PD* αποδείχθηκε πως υπόκεινται στη διαδικασία ESS, ως απόκριση των υπό μελέτη καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στο 3-BrPA. Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *FasL*, η αντίστοιχη πρωτεΐνη του οποίου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα του κυτταρικού θανάτου, συνιστά το μοναδικό εκ των εξετασθέντων γονιδίων, το οποίο ενεργοποιείται ισχυρά, με πλήρως ματισμένα (επεξεργασμένα) RNA μετάγραφα, σε όλες τις δόσεις του 3-BrPA (24ωρη έκθεση) στα T24 κύτταρα (~60% κυτταρική πυκνότητα) (**Εικόνα 3.40**, κάτω πλαίσιο), υποδηλώνοντας έτσι την ξεχωριστή ικανότητα του 3-BrPA να διεγείρει την γονιδιο-ειδική μεταγραφή χωρίς επαγωγή της καταστολής ματίσματος εξωνίου τύπου ESS. Έμφαση δίνεται, επίσης, στον κρίσιμο ρόλο του *FasL* στον επαγόμενο από το 3-BrPA θάνατο των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης (**Εικόνες 3.26-3.31**). Προς μεγάλη έκπληξη, η Taxol (*Ταξόλη*, 0,1 και 1 μg/ml για 24 ώρες), ένας σημαντικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας που σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (*microtubules*) και καταστρέφει τη δυναμική τους για αποσυγκρότηση, αποκαλύπτεται ικανή να επάγει ισχυρά την γονιδιακή έκφραση του *GLUT4* και να ενεργοποιεί, επίσης, έντονα τον ESS μηχανισμό στα παραγόμενα μη-επεξεργασμένα RNA μετάγραφα αυτού, όπως αποδεικνύεται από τον σχηματισμό του μη-ματισμένου (μη-επεξεργασμένου) προϊόντος των 368 bp (*Ex3-In3/4-Ex4*) και στις δύο χορηγούμενες δόσεις στα T24 κύτταρα (~60% κυτταρική πυκνότητα). Επιπλέον, παρατηρήθηκε, αν και σε χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα, η επαγόμενη από την Taxol αποσιώπηση/καταστολή ματίσματος του *G6PD* RNA μεταγράφου (αμφοτερόπλευρα του εξωνίου 12), ενώ η Doxorubicin (*Δοξορουβικίνη*, 1 και 10 μg/ml για 24 ώρες) εμφανίστηκε ανίκανη να προκαλεί ESS του *G6PD* RNA μεταγράφου στα T24 κύτταρα (κυτταρικής πυκνότητας ~60%). Ωστόσο, ανιχνεύθηκε μία ισχυρή επαγωγή της *GLUT4* γονιδιακής έκφρασης, με δημιουργία πλήρως

ματισμένου (επεξεργασμένου) μεταγράφου (*Ex3-Ex4*) στην χαμηλή δόση χορήγησης Doxorubicin στα T24 κύτταρα (Εικόνα 3.40, κάτω πλαίσιο).



**Εικόνα 3.40** Φαρμακο-εξαρτώμενη και γονιδιο-ειδική ενεργοποίηση του μηχανισμού αποσιώπησης εξωνίου (*ESS*) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~60% κυτταρικής πυκνότητας), όπως αποδεικνύεται δια μέσου της ημι-ποσοτικής (sq)RT-PCR τεχνολογίας. Στο αριστερό τμήμα της κάθε Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη γονιδίων (αλλά και επιλεγμένων εξωνίων αυτών, αν και όπου απαιτείται), ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά μεγέθη σε bp των παραγόμενων γονιδιακών PCR προϊόντων. *ESS* (*Exon Splicing Silencing*): Αποσιώπηση Ματίσματος Εξωνίου, *Taxol*: Ταξόλη, *Doxorubicin*: Δοξορουβικίνη, *Ex* (*Exon*): Εξώνιο, *bp* (*base pair*): ζεύγος βάσεων και  $\mu\text{M}$  –  $\mu\text{g/ml}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου (24ωρης δράσης).

Συνολικά, αποδεικνύεται ότι το 3-BrPA, η Taxol και η Doxorubicin δύνανται να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την μεταγραφική ενεργοποίηση του *GLUT4* γονιδίου (Taxol και Doxorubicin) και τη δυναμική του ESS μηχανισμού (3-BrPA και Taxol), ενώ η ρύθμιση των *GLUT4*, *G6PD* και *FasL* γονιδίων καθίσταται επίσης διαφορετική όσον αφορά στα επίπεδα της μεταγραφικής [*FasL* (ισχυρή)] ή της ESS [*GLUT4* (ισχυρή) και *G6PD* (ισχνή)] επαγωγής, υπό τη δράση του 3-BrPA, στα T24 καρκινικά κύτταρα (Πίνακας 3.5).

**Πίνακας 3.5** Γονιδιο-ειδική ρύθμιση του μηχανισμού αποσιώπησης ματίσματος (*ESS*) στα T24 ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου (~60% κυτταρικής πυκνότητας) μετά από 24ωρη έκθεση στο 3-BrPA ή στην Taxol ή στην Doxorubicin. *Cells*: Κύτταρα, *Transcriptional Activation (TA)*: Μεταγραφική Ενεργοποίηση, *Exon Splicing Silencing (ESS)*: Αποσιώπηση Ματίσματος Εξωνίου, *Response Strength*: Δυναμική Απόκρισης, *Genes*: Γονίδια, *Strong*: Ισχυρή, *Weak*: Ασθενής, *Taxol*: Ταξόλη, *Doxorubicin*: Δοξορουβικίνη, *Drugs*: Φάρμακα, *data not shown*: μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα και *manuscript in preparation*: άρθρο υπό προετοιμασία υποβολής για δημοσίευση.

T24 Cells					
		Transcriptional Activation (TA)	Exon Splicing Silencing (ESS)	Response Strength	
Genes	<i>GLUT4</i>	-	+	Strong	3-BrPA
		+	+	Strong	Taxol
		+	-	Strong	Doxorubicin
	<i>G6PD</i>	-	+	Weak	3-BrPA
		-	+	Weak	Taxol
		-	-	-	Doxorubicin
	<i>FasL</i>	+	-	Strong	3-BrPA
		+	-	Strong	Taxol <sup>1</sup>
		+	-	Strong	Doxorubicin <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: data not shown (manuscript in preparation); <sup>2</sup>: Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG et al., *Int J Oncol*. 2009 Jan;34(1):137-60

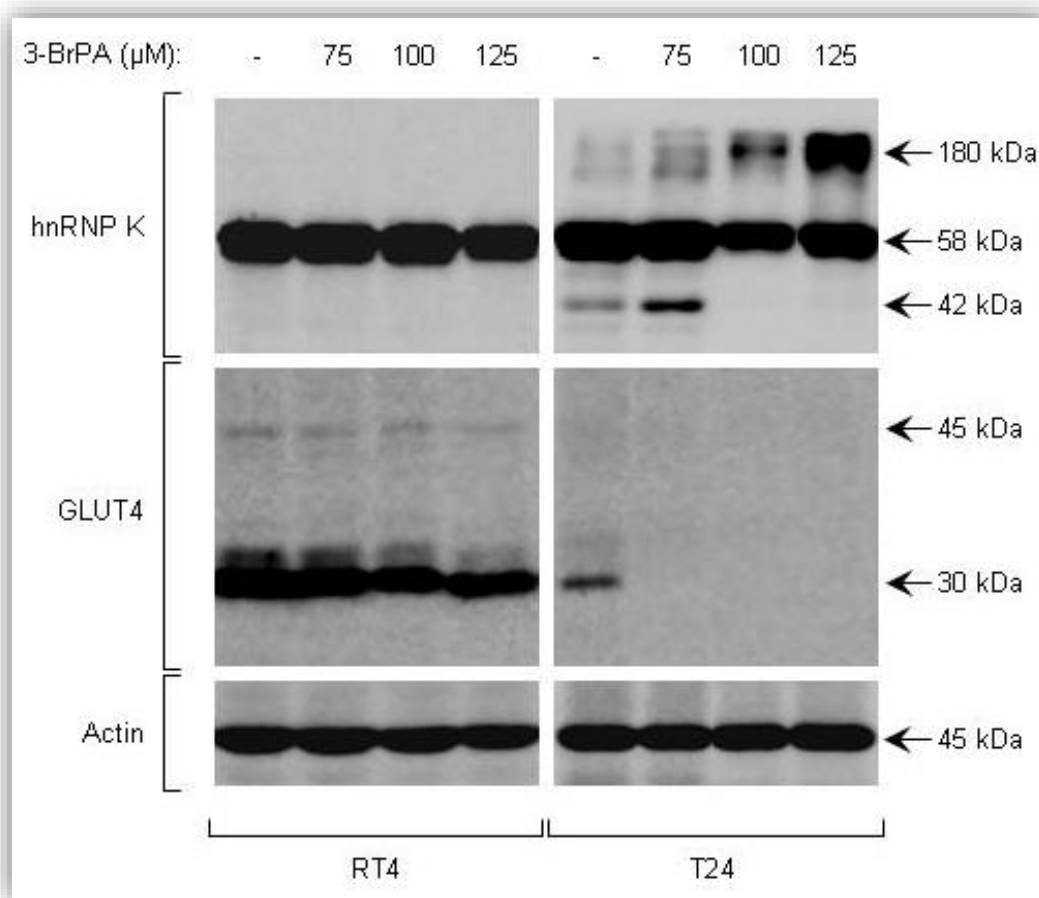
Έμφαση δίνεται στο γεγονός ότι το 3-BrPA είναι ικανό να καταστέλλει το μηχανισμό ματίσματος όλου (από 5' άκρη σε 3' άκρη) του πρόδρομου *GLUT4* ανεπεξέργαστου RNA μεταγράφου και όχι «απλά» κάποιων τμημάτων των εσωνίων ή εξωνίων που αυτό περιέχει, υποδεικνύοντας ως εκ τούτου την φαρμακο-ρυθμιζόμενη λειτουργία ενός δυναμικού μηχανισμού αποσιώπησης/καταστολής της διαδικασίας του ματίσματος, ο οποίος είναι στενά συνδεδεμένος με το μεταβολισμό του(ων) *GLUT4* RNA(s).

Καθώς η πρωτεΐνη hnRNP K έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει ποικίλες πλευρές της βιογένεσης και του μεταβολισμού του mRNA, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής μεταγραφής και της αποσιώπησης/καταστολής του ματίσματος [474, 475], RT4 και T24 κύτταρα (~60% κυτταρικής πυκνότητας) συλλέχθηκαν έπειτα από 24ωρη επώαση στο 3-BrPA και υποβλήθηκαν στη διαδικασία ανοσο-στυπώματος Western χρησιμοποιώντας ειδικό, για την εν λόγω πρωτεΐνη, πρωτογενές αντίσωμα. Εν αντιθέσει με τα RT4, τα οποία παραμένουν αμετάβλητα, τα T24 κύτταρα επιδεικνύουν μέτρια ελάττωση των ολικών επιπέδων της hnRNP K πρωτεΐνης στα 100  $\mu$ M 3-BrPA και, ταυτόχρονα, δοσο-εξαρτώμενη παραγωγή μίας υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνικής ζώνης ως απόκριση στο φάρμακο, με τη δόση 125  $\mu$ M να εμφανίζει την εντονότερη επίδραση (Εικόνα 3.41). Η εν λόγω ζώνη (~180 kDa) θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα ολιγο-πρωτεϊνικό σύμπλοκο προερχόμενο από ομοιοπολικές σταυρωτές διασυνδέσεις ομοειδών (τριμερών) ή ετεροειδών συστατικών (ενδεχομένως εξαιτίας πυρουβυλίωσης) ή μία διαφορετικώς ματισμένη ισομορφή της hnRNP K, η οποία φέρει επιβλαβείς ή εξασθενημένες λειτουργίες. Εναλλακτικά, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί και το σενάριο εκτενών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (για παράδειγμα, πυρουβυλίωση) οι οποίες θα μπορούσαν να καταστέλλουν την ενεργότητα της hnRNP K πρωτεΐνης. Παρά τα διαφορετικά πρότυπα απόκρισης στις δόσεις του φαρμάκου, η ~180 kDa hnRNP K-προσομοιάζουσα πρωτεΐνη (ή σύμπλοκο) πιθανότατα εμπλέκεται στη διαδικασία ESS του *GLUT4* RNA, σύμφωνα και με προηγούμενες αναφορές οι οποίες παρουσιάζουν την hnRNP K να συνδέεται σε εξωνικό καταστολέα ματίσματος (*exonic splicing silencer*) του *G6PD* RNA [474].

Προς μεγάλη έκπληξη, και οι δύο κυτταρικοί τύποι RT4 και T24 αποδεικνύεται να περιέχουν ακρωτηριασμένη μορφή της πρωτεΐνης *GLUT4* (~30 kDa), η οποία ενδεχομένως κωδικοποιείται από παράτυπα ή μη-ματισμένα (μη-



επεξεργασμένα) RNA μετάγραφα που προκύπτουν μέσω της ESS διαδικασίας (Εικόνα 3.39B). Σε απάντηση στην 24ωρη δράση του 3-BrPA, η GLUT4 παραμένει πρακτικά ανεπηρέαστη στα RT4 κύτταρα, ενώ στα T24 εξαφανίζεται παντελώς παρουσία φαρμάκου (από τη δόση κιόλας 75  $\mu$ M) (Εικόνα 3.41). Αν και η λειτουργική ενεργότητα της ακρωτηριασμένης αυτής μορφής (~30 kDa) της GLUT4 πρωτεΐνης ως μεταφορέας γλυκόζης παραμένει άγνωστη, τα υψηλά (στα RT4) και χαμηλά (στα T24) επίπεδα έκφρασης της πιθανότατα αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές απαιτήσεις σε γλυκόζη και το διακριτό μεταβολικό περιβάλλον των δύο αυτών διαφορετικού βαθμού κακοήθειας καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης.



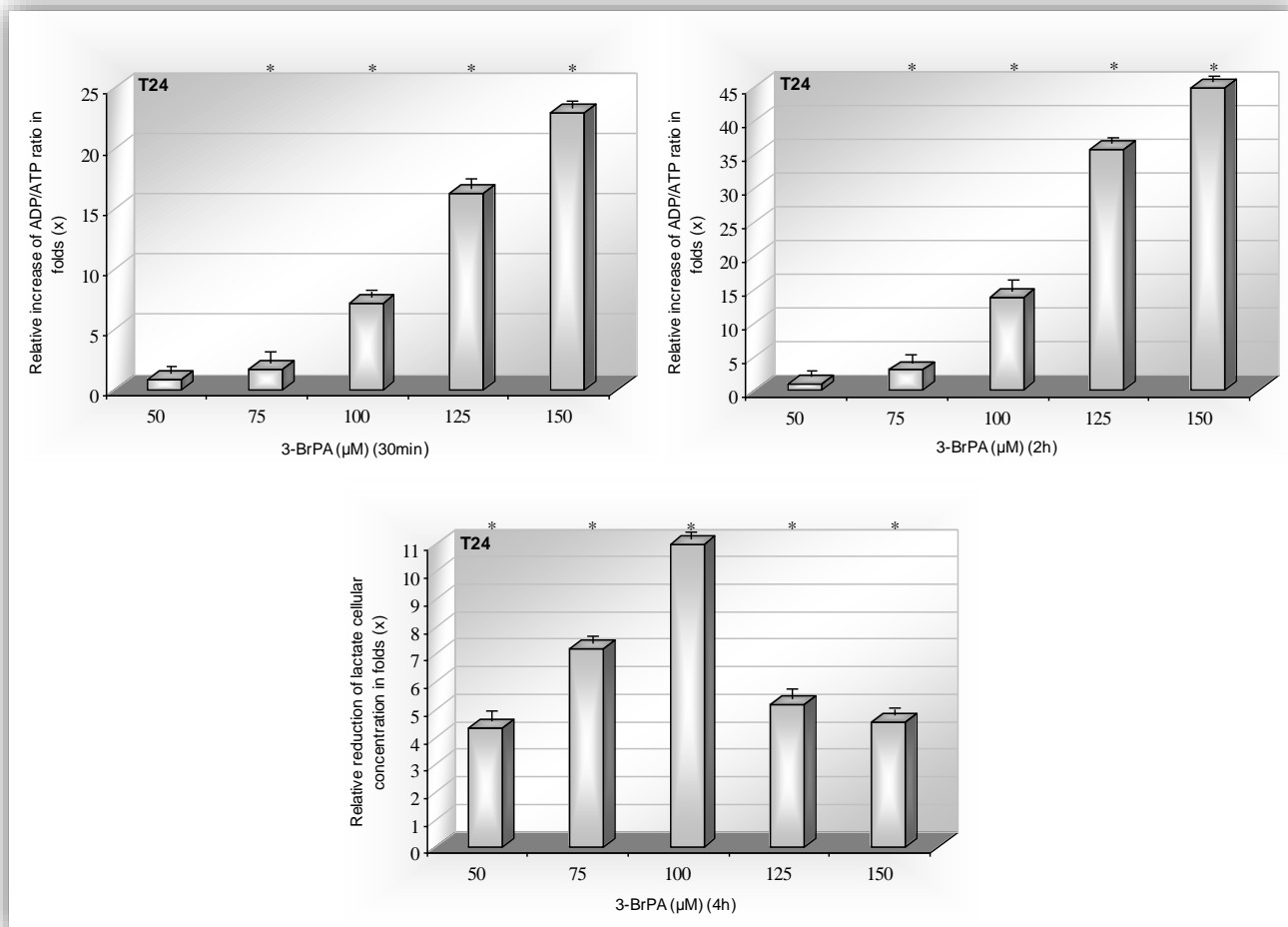
**Εικόνα 3.41** Ρύθμιση κρίσιμων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μηχανισμό αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου (ESS) και στην πρόσληψη γλυκόζης υπό την 24ωρη επίδραση του 3-BrPA στα ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου RT4 και T24 (~60% κυτταρικής πυκνότητας), όπως αποδεικνύεται μέσω του ανοσο-στυπώματος Western. Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε- δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης)

αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. *ESS (Exon Splicing Silencing)*: Αποσιώπηση Ματίσματος Εξωνίου, *Actin*: Ακτίνη και *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.

### **3.3.8 Το 3-BrPA μειώνει δραματικά τα επίπεδα ATP σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, ενώ η κυτταροτοξική του ενεργότητα αποδυναμώνεται από την λειτουργική παρεμπόδιση της Akt- και p44/42 MAPK-εξαρτώμενης σηματοδότησης**

Δεδομένου ότι ακόμα και ισχνή διαταραχή της αναλογίας ADP/ATP δύναται να αποβεί επιβλαβής για την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, ενώ ισχυρή ελάττωση της παραγωγής ATP ωθεί τα κύτταρα στον νεκρωτικό θάνατο [9, 12, 21, 25, 27, 29, 50], η T24 κυτταρική σειρά (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) επώαστηκε με διαφορετικές δόσεις (50, 75, 100, 125 και 150  $\mu\text{M}$ ) 3-BrPA για 30 λεπτά και για 2 ώρες και τα επίπεδα ADP/ATP ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο επιλεγμένο πρωτόκολλο βασισμένο στη βιο-φωταύγεια. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.42** (άνω πλαίσιο), το 3-BrPA είναι ικανό να επάγει ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της αναλογίας ADP/ATP και στις δύο χρονικές στιγμές πειραματικής μέτρησης, με τις μέσες τιμές επαγωγής να αγγίζουν τις 23 (23x) και 45 (45x) φορές επάνω, μετά από επώαση 30 λεπτών και 2 ωρών στη συγκέντρωση 150  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, αντίστοιχα. Πέραν της δραματικής μείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP, αποδεικνύεται ότι η ποσότητα του λακτικού οξέος (τελικό προϊόν της γλυκόλυσης) ελαττώνεται σημαντικά έπειτα από την χορήγηση 3-BrPA (4 ώρες) στα T24 κύτταρα (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%) με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, επιτυγχάνοντας ~11 φορές (11x) μείωση αυτής στη δόση 100  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, υποδηλώνοντας ως εκ τούτου την ικανότητα του 3-BrPA να παρεμποδίζει ισχυρά την αερόβια γλυκόλυση (*aerobic glycolysis*) σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (**Εικόνα 3.42**, κάτω πλαίσιο). Ωστόσο, ένας μηχανισμός αντιστάθμισης (*counterbalance*) μέσω της γλουταμινόλυσης (*glutaminolysis*) και/ή σερινόλυσης (*serinolysis*) (διάσπαση του αντίστοιχου αμινοξέος προς παραγωγή λακτικού οξέος) [476] θα μπορούσε να ενεργοποιείται στις συγκεντρώσεις 125 και 150  $\mu\text{M}$  του φαρμάκου, εξηγώντας με τον τρόπο αυτόν την μικρότερη μείωση στα επίπεδα του λακτικού οξέος που παρατηρείται. Φαίνεται πως

το 3-BrPA ασκεί την κυτταροτοξική του δυναμική σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μέσω αναστολής της διαδικασίας της γλυκόλυσης, καθώς και ταχείας και ισχυρής παρεμπόδισης της παραγωγής ATP, η οποία συνεισφέρει καθοριστικά στην προγραμματισμένη νέκρωση των εν λόγω κυττάρων.

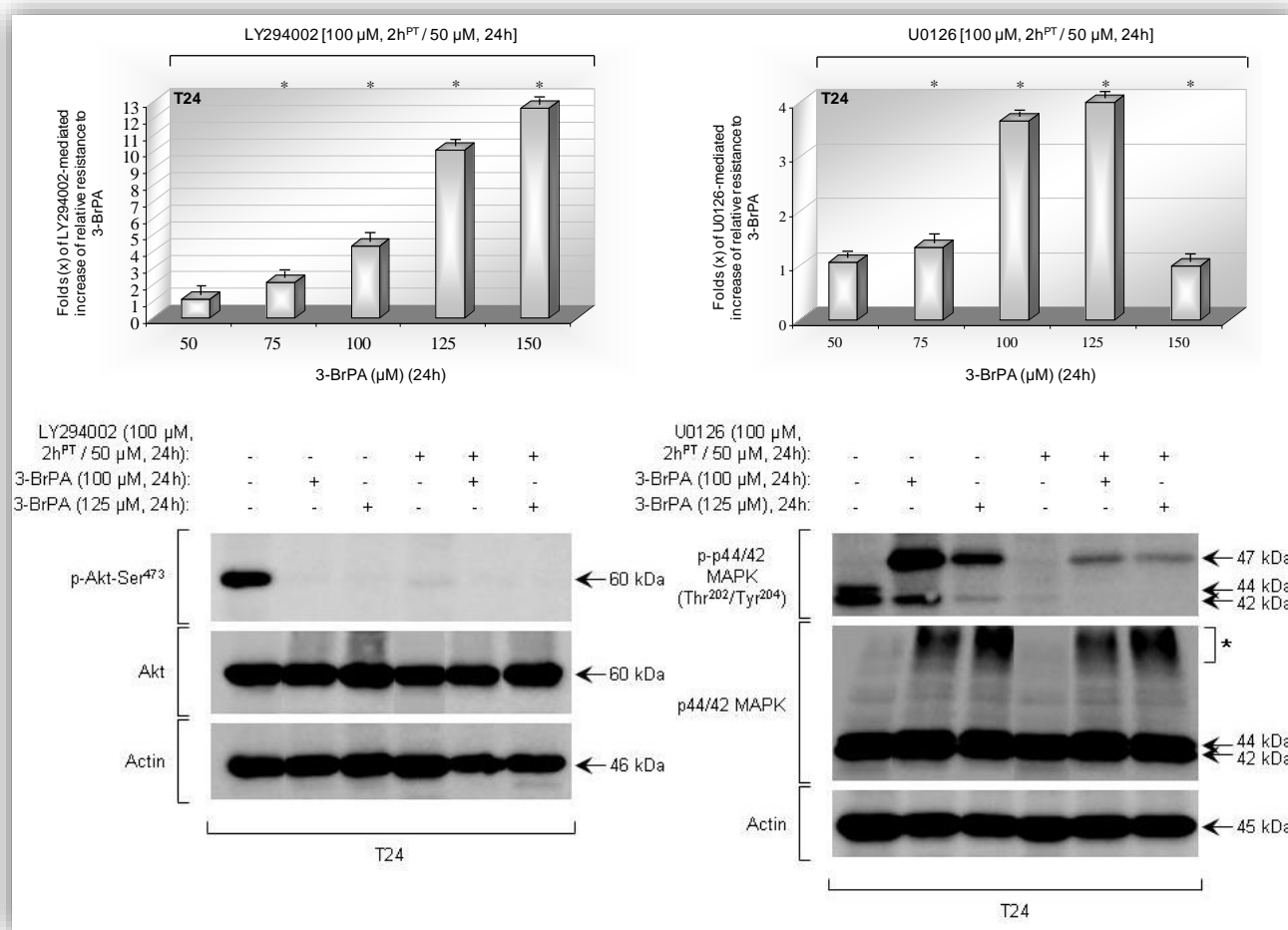


**Εικόνα 3.42** Δραματική ελάττωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP (άνω πλαίσιο) και λακτικού οξέος (κάτω πλαίσιο) ως απόκριση σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης στο 3-BrPA στα T24 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~60% κυτταρικής πυκνότητας), όπως αποδεικνύεται μέσω της χρήσης της τυποποιημένης συσκευασίας βιο-φωταύγειας ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς το δυναμικό πρόκλησης βιο-ενεργειακής κρίσης σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Relative increase of ADP/ATP ratio in folds (x)*: Σχετική αύξηση της ADP/ATP αναλογίας σε «φορές» της κλίμακας «1-50», *Relative reduction of lactate cellular concentration in folds (x)*: Σχετική μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης λακτικού οξέος σε «φορές» της κλίμακας «1-

20», *h*: ώρες, *min*: λεπτά και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (*2D*) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιο-ενεργειακής κρίσης σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

Η υψηλή διαφορική ευαισθησία των RT4 και T24 καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης στην ικανότητα επαγωγής προγραμματισμένης νέκρωσης από το 3-BrPA (**Εικόνα 3.26**) θα μπορούσε να συσχετίζεται με την ισχυρή συστατική ενεργότητα των κινασών Akt (*p-Akt-Ser<sup>473</sup>*) και p44/42 MAPK (*p-p44/42 MAPK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>*) στα T24 αλλά όχι στα RT4 κύτταρα (**Εικόνα 3.33**). Για τον λόγο αυτό, T24 κύτταρα (πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~30% για υπερ-ευαισθητοποίηση στο 3-BrPA) επώαστηκαν με 100  $\mu\text{M}$  LY294002 (ειδικός αναστολέας της PI3K κινάσης σερίνης/θρεονίνης) [477] ή με 100  $\mu\text{M}$  U0126 (ειδικός αναστολέας των MEK1/2 κινασών σερίνης/θρεονίνης) [477] για 2 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε χορήγηση διαφορετικών δόσεων 3-BrPA (50, 75, 100, 125 και 150  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες, παρουσία 50  $\mu\text{M}$  των αντίστοιχων αναστολέων κινασών. Ο βαθμός επιβίωσης των εν λόγω κυττάρων ποσοτικοποιήθηκε μέσω της MTT δοκιμασίας, ενώ οι ενεργότητες των υπό μελέτη κινασών αξιολογήθηκαν δια μέσου ανοσο-στυλώματος Western, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τις φωσφορυλιωμένες (ενεργοποιημένες) μορφές αυτών. Στην **Εικόνα 3.43** (άνω πλαίσια) αποκαλύπτεται η ικανότητα των LY294002 και U0126 αναστολέων να προσδίδουν στα T24 κύτταρα σημαντικά πλεονεκτήματα επιβίωσης, αντίστοιχα, ενάντι του κυτταροτοξικού - νεκρωτικού- δυναμικού του 3-BrPA. Πράγματι, παρατηρείται μία ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη αύξηση της σχετικής ανθεκτικότητας στο φάρμακο κατόπιν χρήσης του κάθε αναστολέα, με τους LY294002 και U0126 να εμφανίζουν την μέγιστη ικανότητα «διάσωσης» των T24 κυττάρων στα 150  $\mu\text{M}$  [~12 φορές επάνω (12x)] και 125  $\mu\text{M}$  [~4 φορές επάνω (4x)] του 3-BrPA, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, οι LY294002 και U0126 αναστολείς αποδεικνύονται ικανοί να καταστέλλουν ισχυρά την συστατική φωσφορυλίωση, και συνεπώς ενεργότητα, της Akt (*Ser<sup>473</sup>*) κινάσης (κατωροϊκός μεσολαβητής σηματοδότησης της PI3K) [148, 191, 209, 456, 458, 461, 464, 477] και των p44/42 MAPK (*Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>*) κινασών (κατωροϊκοί μεσολαβητές σηματοδότησης των MEK1/2 κινασών) [136, 456, 477], αντίστοιχα, στα T24 κύτταρα, με τον U0126 να μειορρυθμίζει έντονα και την φαρμακο-επαγόμενη p44/42

MAPK-προσομοιάζουσα φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη των ~47 kDa (Εικόνα 3.43, κάτω πλαίσια). Φαίνεται ότι η λειτουργική παρεμπόδιση των Akt και p44/42 MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών συμβάλλει ουσιαστικά στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης έναντι του νεκρωτικού δυναμικού 3-BrPA, επηρεάζοντας πιθανότατα, μεταξύ άλλων, κρίσιμους(α) ρυθμιστές εισροής/εκροής, βιομόρια στόχους (για παράδειγμα μεταβολικά ένζυμα) γλυκόλυσης και παράγοντες απενεργοποίησης -αποτοξίνωσης- του εν λόγω φαρμάκου.

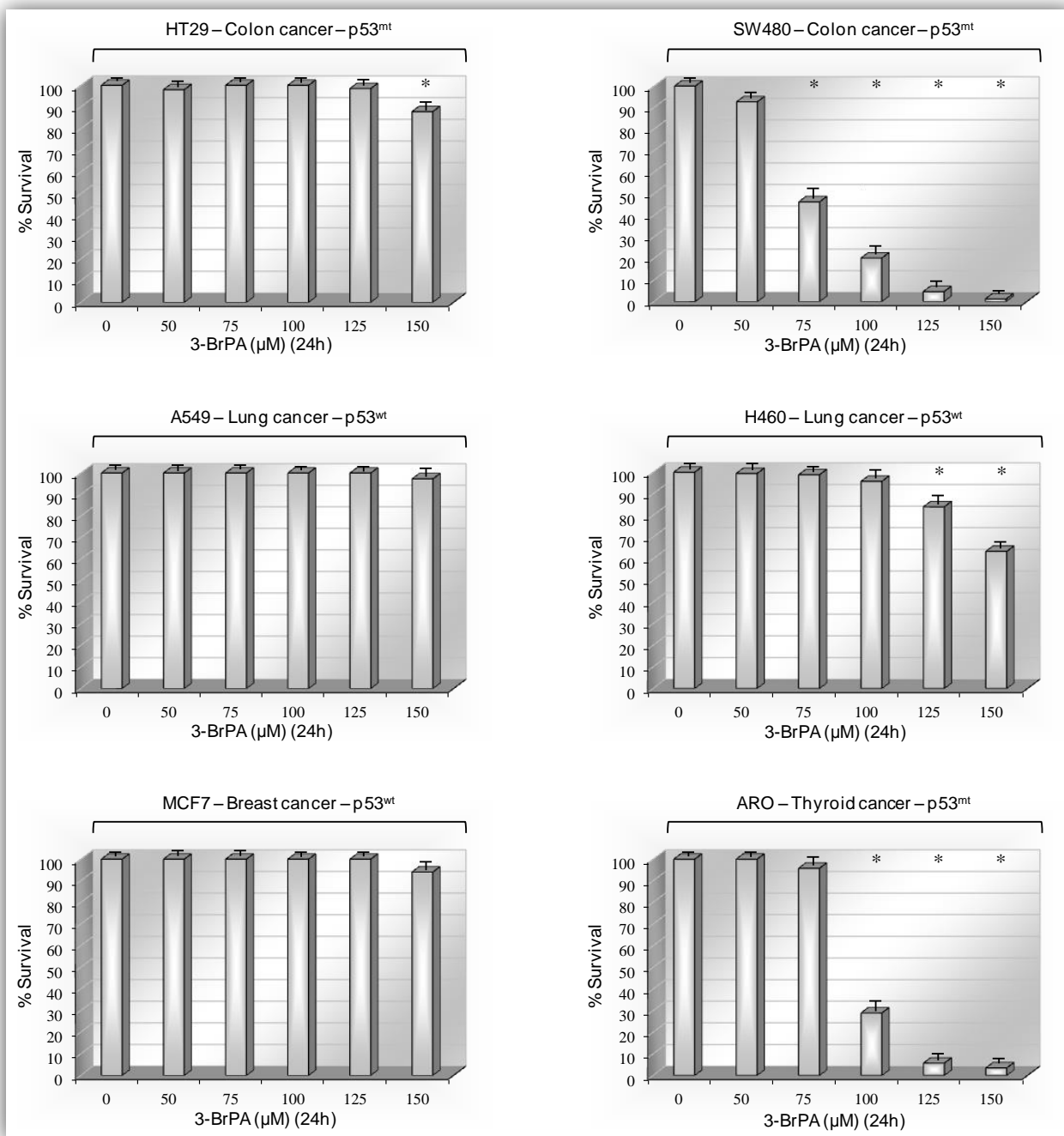


**Εικόνα 3.43** Η λειτουργική παρεμπόδιση των Akt (χρήση του LY294002 αναστολέα) και p44/42 MAPK (χρήση του U0126 αναστολέα) -συστατικώς- ενεργοποιημένων κινασών οδηγεί σε ισχυρή αποδυνάμωση του κυτταροτοξικού δυναμικού του 3-BrPA (24 ώρες επώαση) στα T24 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (~30% κυτταρικής πυκνότητας), όπως αποδεικνύεται μέσω της MTT δοκιμασίας (άνω πλαίσιο) και του ανοσο-στυπώματος Western (κάτω πλαίσιο). (Άνω πλαίσιο) Κάθε συγκέντρωση και συνδυασμός φαρμάκων ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση σε τρία ανεξάρτητα μικρο-βοθρία (*wells*), ενώ

κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Folds (x) of LY294002- / U0126-mediated increase of relative resistance to: LY294002- / U0126-διαμεσολαβούμενη αύξηση σχετικής ανθεκτικότητας σε «φορές» της κλίμακας «1-20» στο, PT (Pre-treatment): Προ-επώαση, h: ώρες και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών (αυξημένης) βιωσιμότητας (σχετικής ανθεκτικότητας) σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς.  $P < 0,05$ . (Κάτω πλαίσιο) Στο αριστερό τμήμα της Εικόνας αναγράφονται τα ονόματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών καθώς και των φωσφορυλιωμένων τους μορφών, ενώ στο δεξιό τμήμα αυτής τα μοριακά βάρη σε “kDa” τόσο της -εκάστοτε- δομικά απρόσβλητης όσο και της μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης (ή εναλλακτικά ματισμένης) (\*) αντίστοιχης μορφής, αν και όπου εμφανίζεται. *p-*: φωσφορυλίωση, *Ser*: Σερίνη, *Thr*: Θρεονίνη, *Tyr*: Τυροσίνη, *Actin*: Ακτίνη, *PT (Pre-treatment)*: Προ-επώαση, *h*: ώρες και  $\mu\text{M}$ : συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου.*

### 3.3.9 Κυτταροτοξική δυναμική του 3-BrPA στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του θυρεοειδούς αδένου: μία p53-ανεξάρτητη διεργασία

Στην κατεύθυνση θεματικής διεύρυνσης της δυναμικής του 3-BrPA να επάγει ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά περιβάλλοντα διαφορετικά από αυτό του κακοήθους ουροθηλίου, έξι (6) κυτταρικές καρκινικές σειρές παχέος εντέρου, πνεύμονα, μαστού και θυρεοειδούς αδένου επωάστηκαν, σε συνθήκες πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος ~60%, με 50, 75, 100, 125 και 150  $\mu\text{M}$  3-BrPA για 24 ώρες, ενώ ο βαθμός επιβίωσης αυτών στη δράση του φαρμάκου ποσοτικοποιήθηκε μέσω της MTT δοκιμασίας. Όπως αποκαλύπτεται στην **Εικόνα 3.44**, το 3-BrPA αποδεικνύεται ικανό να εξοντώνει με αυστηρά κυτταρο-ειδικό τρόπο τα SW480 και ARO καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και θυρεοειδούς αδένου, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα HT29 (παχέος εντέρου), A549 (πνεύμονα), H460 (πνεύμονα) και MCF7 (μαστού) καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται ουσιαστικά ανθεκτικά στη δράση του φαρμάκου, με εξαίρεση τα H460 που επιδεικνύουν μία βιολογικά αξιοπρόσεκτη μείωση του βαθμού επιβίωσης στην μεγαλύτερη δόση (150  $\mu\text{M}$ ) του 3-BrPA.



**Εικόνα 3.44** Κυτταροτοξικές επιδράσεις του 3-BrPA στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HT29, SW480, A549, H460, MCF7 και ARO, όπως αποκαλύπτεται μέσω της MTT δοκιμασίας. Κάθε συγκέντρωση φαρμάκου ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξική της δράση σε τρία ανεξάρτητα μικροβιοθρία (*wells*), ενώ κάθε πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. *Survival*: Επιβίωση, *h*: ώρες, *μM*: συγκέντρωση χορηγούμενης δόσης φαρμάκου, *Colon*: Παχύ έντερο, *Lung*: Πνεύμονας, *Breast*: Μαστός, *Thyroid*: Θυροειδής αδένας, *Cancer*: Καρκίνος, *mt* (*mutant*): μεταλλαγμένος τύπος και *wt* (*wild-type*): φυσικός τύπος. Οι δύο διαστάσεων (2D) ράβδοι

αναπαριστούν τις τιμές τυπικής απόκλισης (*standard deviation*), ενώ οι αστερίσκοι (\*) υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των ποσοστών βιωσιμότητας σε σχέση με το(α) δείγμα(τα) αναφοράς.  $P < 0,05$ .

Συνεκτιμώντας τα ποσοστά φαρμακο-επαγόμενης τοξικότητας, βαθμού κακοήθειας, «ιστολογικού» τύπου καρκίνου και *p53* γενετικού περιεχομένου, συνάγεται το ασφαλές συμπέρασμα ότι το 3-BiPA μπορεί να θανατώνει καρκινικά κύτταρα ανεξάρτητα από το *p53* γενετικό υπόβαθρο και είδος όγκου (δεν περιορίζεται μόνο στο κακόηθες ουροθήλιο), αλλά με τρόπο που να σχετίζεται με το εκάστοτε διακριτό κυτταρικό περιβάλλον και τον βαθμό απο-διαφοροποίησης και μεταστατικότητας αυτών (**Εικόνα 3.44** και **Πίνακας 3.6**). Ως εκ τούτου, διαφαίνεται ότι το 3-BiPA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με το κατά περίπτωση κυτταρο-βιολογικό προφίλ του όγκου, για την χημειοθεραπευτική αντιμετώπιση ενός ευρέος φάσματος ανθρώπινων κακοηθειών στη μορφή φαρμακολογικού μονο-σχήματος.



**Πίνακας 3.6** Συγκεντρωτική παράθεση των κρίσιμων κυτταροβιολογικών χαρακτηριστικών που αφορούν στην τοξική απόκριση των MCF7, HT29, SW480, A549, H460 και ARO καρκινικών κυττάρων στη δράση του 3-BrPA. *Cancer Cell Line Sensitivity to 3-BrPA*: Ευαισθησία καρκινικής κυτταρικής σειράς στο 3-BrPA, *Name*: Όνομα, *Tissue*: Ιστός, *Malignancy Feature*: Χαρακτηριστικό Κακοήθειας, *Status*: Υπόβαθρο, *Sensitivity*: Ευαισθησία, *Breast*: Μαστός, *Colon*: Παχύ έντερο, *Lung*: Πνεύμονας, *Thyroid*: Θυρεοειδής αδένας, *Grade*: Βαθμός κακοήθειας, *Low*: Χαμηλός, *Anaplastic*: Α(να)πλαστικός, *ND (Non-Determined)*: Μη-καθορισμένος, *Wild-type*: φυσικός τύπος και *Mutant*: μεταλλαγμένος τύπος.

Cancer Cell Line Sensitivity to 3-BrPA				
Name	Tissue	Malignancy Feature	p53 Status	Sensitivity to 3-BrPA
MCF7	Breast	Low Grade	Wild-type	-
HT29	Colon	Grade I / II	Mutant <sup>R273H</sup>	-
SW480	Colon	Grade III / IV	Mutant <sup>R273H / P309S</sup>	+
A549	Lung	ND*	Wild-type	-
H460	Lung	ND*	Wild-type	-
ARO	Thyroid	Anaplastic	Mutant <sup>R273H</sup>	+
*ND: Non-Determined				

*Συζήτηση*

## 4. Συζήτηση

### 4.1 Cisplatin (Σισπλατίνη)

Μεγάλο εμπόδιο στην επιτυχημένη χημειοθεραπεία έναντι του καρκίνου αποτελεί, η συχνά παρατηρούμενη, ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην έκθεση στο εκάστοτε φάρμακο, η οποία προσδίδει στους καρκινικούς κυτταρικούς πληθυσμούς αντοχή στους υπό χορήγηση παράγοντες, οδηγώντας τελικά στην υποτροπή της ασθένειας. Αυτό συνιστά και ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της δράσης της Cisplatin, γεγονός το οποίο όμως δεν παρεμποδίζει σε μεγάλο βαθμό την κυτταροτοξική της δυναμική, όπως επιβεβαιώνεται από το ότι η Cisplatin αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα από τα πλέον σημαντικά συστατικά συνδυαστικών σχημάτων θεραπείας (κοκτέιλ) για πολλούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου.

Σύμφωνα με τα πειράματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, η έκθεση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στη Cisplatin οδηγεί στη δημιουργία πρωτεολυμένων Κασπάσης-8, Κασπάσης-9, Κασπάσης-3, PARP και Lamin A/C πρωτεϊνών, αποδεικνύοντας αδιαμφισβήτητα την ενεργοποίηση ενός ισχυρού αποπτωτικού μηχανισμού. Τα αποπτωτικά μονοπάτια τόσο μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου («εξωγενές» μονοπάτι) όσο και δια μέσου των μιτοχονδρίων («ενδογενές» μονοπάτι), φαίνεται ότι εμπλέκονται με βαθμο-ειδικό τρόπο στην φαρμακο-επαγόμενη εξόντωση του καρκινικού ουροθηλίου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εντοπίζεται στο αποτέλεσμα της σύγκρισης των αντίστοιχων λόγων C/P (*C: cleaved, P: precursor form*), βάσει της οποίας τα T24 αποδεικνύονται σημαντικά πιο ανθεκτικά στη χορήγηση Cisplatin, σε σχέση με τα RT4 κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ως εκ τούτου την διαφορετική τους κυτταροτοξική απόκριση, όπως αυτή αποτυπώνεται από τη μέθοδο MTT. Την εκτίμηση αυτή ενισχύει και το διαφορικό πρωτεολυτικό προφίλ της Κασπάσης-8, η οποία στα RT4 κύτταρα ενεργοποιείται ακόμα και στην χαμηλή δόση Cisplatin, ενώ παρατηρείται και η σύγχρονη παρουσία του μικρού πρωτεϊνικού θραύσματος της τάξης των 18 kDa, γεγονός το οποίο αδιαμφισβήτητα επιβεβαιώνει την αυξημένη ευαισθησία τους στο φάρμακο. Αντίθετα, τα T24 κύτταρα δεν εμφανίζουν αντίστοιχη απόκριση, ενώ απουσιάζει και το πρωτεϊνικό θραύσμα των 18 kDa, πιθανότατα υποδηλώνοντας

αδυναμία σχηματισμού του ώριμου και πλήρως ενεργού τετραμερούς της Κασπάσης-8, καθώς και εξασθένηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα οποία αυτή εμπλέκεται. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά, πρωτεολυτική επεξεργασία και ενεργοποίηση εναρκτήριων και τελεστών Κασπασών, έπειτα από χορήγηση Cisplatin, έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες στο παρελθόν σε Jurkat T κύτταρα λευχαιμίας, MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού και κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (*HOS*) [309, 478-480]. Ανάλογα με το κυτταρικό σύστημα που κατά περίπτωση μελετάται, η επαγόμενη από τη Cisplatin απόπτωση θα μπορούσε πιθανόν να περιλαμβάνει και άλλα, ανεξάρτητα από τις Κασπάσες, μονοπάτια, όπως έχει αποκαλυφθεί σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών και σε εγγύς κύτταρα νεφρικών σωληναρίων (*RPTC*) [309, 481, 482]. Συνολικά, από τα πειράματα αυτά αποκαλύπτεται ότι κλινικά συμβατές δόσεις Cisplatin δύνανται να επάγουν τη διαδικασία της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης δια μέσου ενεργοποίησης Κασπασών, ενώ η ανοχή στο φάρμακο μπορεί να προκύψει εξαιτίας της μειορρύθμισης (*downregulation*) των αποπτωτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς θανάτου.

Η p53 συνιστά μία βασική ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο σε σειρά βιολογικών διαδικασιών, όπως στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης σε απόκριση στο κυτταρικό στρες [309, 483]. Η ευαισθησία στη Cisplatin, σε μελέτη που διεξήχθη από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (*NCI, National Cancer Institute*) σε συνολικά 60 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, δείχθηκε να συνδέεται ισχυρά με την παρουσία της φυσικού τύπου p53 ενεργότητας πρωτεΐνης [309, 484]. Επιπλέον, καρκινικά κύτταρα, τα οποία στερούνταν λειτουργικής p53 πρωτεΐνης εμφανίστηκαν πιο ανθεκτικά στη Cisplatin, σε σύγκριση με κύτταρα τα οποία περιελάμβαναν τη φυσικού τύπου μορφή, αλλά μπορούσαν κι εκείνα να ευαισθητοποιηθούν έπειτα από εισαγωγή/επαναφορά της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης [309, 485-487]. Ωστόσο, σε συγκεκριμένα κυτταρικά συστήματα υπήρξε είτε αρνητική είτε απουσία συσχέτισης μεταξύ του γενετικού υποβάθρου της p53 και της απόκρισης στη Cisplatin. Για παράδειγμα, στα κύτταρα οστεοσαρκώματος SaOS-2, η δράση της p53 συνδέθηκε ισχυρά με την αυξημένη ανθεκτικότητα στη Cisplatin υπό συνθήκες χαμηλών επιπέδων ορού στο θρεπτικό υλικό, ενώ η απουσία της p53 πρωτεΐνης σε ορχικά κύτταρα τερατο-καρκινώματος δεν επηρέασε την ευαισθησία τους στο εν λόγω

φάρμακο [309, 488, 489]. Από τα πειράματά μας, αποκαλύπτεται ότι η βαθμο-ειδική κυτταροτοξική και αποπτωτική απόκριση των RT4 και T24 κυττάρων σχετίζεται στενά με τις φαρμακο-επαγόμενες λειτουργικές δράσεις της p53 πρωτεΐνης. Φαίνεται πως η απώλεια της κρίσιμης τυροσίνης (Y<sup>126</sup>) επηρεάζει δραματικά την μοριακή φυσιολογία της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης, παρεμποδίζοντας ως εκ τούτου την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται σε κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης στις θέσεις 15 (*Ser*<sup>15</sup>) και 392 (*Ser*<sup>392</sup>) μετά από έκθεση των T24 κυττάρων στη Cisplatin. Ενδιαφέρον είναι ότι συγκεκριμένες φυσικές μεταλλαγές της p53 πρωτεΐνης σε ανθρώπινους καρκίνους, οι οποίοι φέρουν αλλαγές σε κατάλοιπα άλλα από αυτά της σερίνης, όπως για παράδειγμα [He<sup>237</sup>]p53 και [Ala<sup>143</sup>]p53, εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα φωσφορυλίωσης στις θέσεις *Ser*<sup>15</sup> και *Ser*<sup>392</sup> [490]. Στα RT4 κύτταρα, η επαγόμενη από τη Cisplatin φωσφορυλίωση στη σερίνη 15 (*Ser*<sup>15</sup>) έχει ως αποτέλεσμα την δομική σταθεροποίηση και ενδοκυτταρική συσσώρευση της p53 πρωτεΐνης, πιθανότατα καταστρέφοντας την αλληλεπίδραση με τον αρνητικό της ρυθμιστή MDM2, ο οποίος υπό διαφορετικές συνθήκες στοχεύει την p53 μέσω ουμπικουϊτίνωσης για αποικοδόμηση. Η, εξαρτώμενη από τα στρεσογόνα σήματα, εν λόγω αύξηση του χρόνου ημιζωής της p53 πρωτεΐνης από λεπτά σε ώρες προάγει κρίσιμα μεταγραφικά προγράμματα που ρυθμίζουν την απόπτωση [55, 182, 426, 438, 491, 492]. Εναλλακτικά, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 15 (*Ser*<sup>15</sup>), ενδεχομένως, προωθεί την αλληλεπίδραση της p53 με τη B56γ-PP2A φωσφατάση, οδηγώντας ως εκ τούτου στην απο-φωσφορυλίωση (στη θέση θρεονίνη 55, *Thr*<sup>55</sup>) και επακόλουθη επαγωγή της σταθεροποίησης της p53 πρωτεΐνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω [493]. Από την άλλη πλευρά, η επαγόμενη από τη Cisplatin φωσφορυλίωση της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης στη θέση σερίνη 392 (*Ser*<sup>392</sup>), αποκλειστικά παρατηρούμενη στα RT4 κύτταρα, θα μπορούσε να ενισχύει την ικανότητα πρόσδεσής της στο DNA μέσω ενός πιθανού μηχανισμού σταθεροποίησης της τετραμερούς μορφής αυτής [426, 494]. Καθώς το MDM2 συνιστά ένα bona fide γονίδιο στόχο της p53 [182, 426, 438], η προοδευτική συσσώρευση της λειτουργικής p53 πρωτεΐνης, έπειτα από έκθεση στη Cisplatin, θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την υπερ-παραγωγή της MDM2 πρωτεΐνης, η οποία δρα ως λιγάση ουμπικουϊτίνης για την επιτυχή αποικοδόμηση της p53 στο πρωτεάσωμα, δικαιολογώντας πιθανόν με αυτόν τον τρόπο τις ανιχνεύσιμες πρωτεολυμένες μορφές της p53 στην υψηλότερη δόση του φαρμάκου [55, 182, 491].

Αν και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, στα RT4 κύτταρα, μία (ή περισσότερες) από τις ATM, ATR και DNA-PK κινάσες είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην επαγόμενη από τη Cisplatin φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης στη θέση σερίνη 15 (*Ser*<sup>15</sup>), ενώ η αντίστοιχη φωσφορυλίωση στη θέση σερίνη 392 (*Ser*<sup>392</sup>) ενδεχομένως πραγματοποιείται από (μία ή περισσότερες) διακριτές κινάσες, όπως οι p38 MAPK, CDK9 (*Cyclin-dependent kinase 9*) και CK2 (*Casein kinase 2*) [494-496]. Σε προηγούμενες μελέτες που αφορούν νεφρικά κύτταρα, έπειτα από χορήγηση Cisplatin, αποκαλύφθηκε ο ρόλος της ATR/Chk2 αξονικής σηματοδότησης στην ενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης και επακόλουθης απόπτωσης διευκρινίζοντας περαιτέρω τους μηχανισμούς φαρμακο-επαγόμενης νεφροτοξικότητας [427]. Η ATR πρωτεϊνική κινάση περιέχει μία θέση πιθανής φωσφορυλίωσης από την Akt κινάση (RRRLSS) και ως εκ τούτου η δραστηριότητά της δύναται να ρυθμίζεται ισχυρά από την ενεργοποιημένη Akt κινάση [424]. Όντως, σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, η παρεμπόδιση της λειτουργικής Akt κινάσης είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ολικών και φωσφορυλιωμένων επιπέδων της p53 πρωτεΐνης, έπειτα από χορήγηση Cisplatin, ενώ η ενεργοποίησή της (Akt) κατέστειλε την φαρμακο-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της p53 [424]. Ως εκ τούτου, ενδεχομένως, διαφαίνεται ένας (έμμεσος) ανασταλτικός ρόλος της ενεργοποιημένης Akt κινάσης στη φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης [κυρίως όταν η τελευταία είναι μεταλλαγμένη (για παράδειγμα, στα T24 κύτταρα)] σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης υπό την επίδραση της Cisplatin. Η σχετική ευαισθησία των RT4 κυττάρων στη Cisplatin δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην παρατηρούμενη φωσφορυλίωση της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης στις θέσεις *Ser*<sup>15</sup> και *Ser*<sup>392</sup>, αλλά επιπρόσθετοι καθοριστικοί παράγοντες απαιτούνται για την επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, έπειτα από τη δράση του εν λόγω χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Το σενάριο αυτό υποστηρίζεται σθεναρά: (Α) από την ικανότητα των T24 κυττάρων να οδηγούνται σε απόπτωση, αν και σε σχετικά μικρότερο συγκριτικά βαθμό, μετά από έκθεση στο φάρμακο, παρά την απουσία λειτουργικής p53 πρωτεΐνης και, αντιστρόφως, (Β) από την ανικανότητα της φωσφορυλιωμένης p53 να επάγει ισχυρή απόπτωση των RT4 κυττάρων στην χαμηλή συγκέντρωση Cisplatin (1 μg/ml), σε σχέση με την αντίστοιχη απόκριση αυτών στην υψηλότερη δόση φαρμάκου (10 μg/ml). Παρ' όλα αυτά, όταν η ολική και φωσφορυλιωμένη p53 πρωτεΐνη, καθώς και οι αντίστοιχες πρωτεολυμένες μορφές αυτής, φαίνεται να υπερβαίνουν κάποια

κρίσιμα και καθοριστικά όρια ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης [όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, στην υψηλότερη δόση Cisplatin (10  $\mu\text{g/ml}$ )], μία ενισχυμένη αποπτωτική διαδικασία φαίνεται να λαμβάνει χώρα και να κινητοποιείται ισχυρά.

Ποικίλες παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η Akt κινάση δύναται να προστατεύει τα κύτταρα από τον αποπτωτικό θάνατο που επάγεται εξαιτίας πληθώρας στρεσογόνων ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένης της Cisplatin [309, 497]. Απενεργοποίηση της Akt μέσω έκτοπης έκφρασης του αρνητικού ρυθμιστή αυτής PTEN σε καρκινικά κύτταρα ενισχύει την φαρμακο-επαγόμενη απόπτωση, ενώ διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων πνεύμονα με συστατικώς ενεργοποιημένη Akt έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα ποσοστά αποπτωτικού θανάτου, έπειτα από επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα Topotecan (Τοποτεκάνη) [497, 498]. Επιπλέον, ινοβλάστες που υπερ-εκφράζουν την Akt πρωτεΐνη αποδεικνύονται ανθεκτικοί στις αποπτωτικές δράσεις της Staurosporine (Σταυροσπορίνης) και Etoposide (Ετοποσίδης) [497, 499, 500]. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του όγκου η Akt μπορεί να ενεργοποιείται από πλήθος μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της μειορρύθμισης της PTEN φωσφατάσης (διπλής εξειδίκευσης), της υπερ-ενεργοποίησης της PI3K κινάσης, η οποία αποτελεί ανωροϊκό (θετικό) σηματοδοτικό ρυθμιστή αυτής (Akt), της γονιδιακής επέκτασης (*gene amplification*) του Akt γονιδίου και της απόκτησης σωματικών μεταλλαγών σε κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα της Akt πρωτεΐνης, όπως την υποκατάσταση του γλουταμι(νι)κού οξέος (*glutamic acid*) από λυσίνη (*lysine*) στην αμινοξική θέση 17 (*E17K*), η οποία προάγει τον κυτταρικό μετασχηματισμό και επάγει τη λευχαιμία σε ποντικούς [497, 501]. Ως εκ τούτου, η συστατικώς φωσφορυλιωμένη στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 473 (*Ser<sup>473</sup>*) και πιθανότατα ενεργή, Akt μορφή, ενδεχομένως συμμετέχει καθοριστικά στην φυσιολογία των υψηλής κακοήθειας T24 κυττάρων και στην μερική ανθεκτικότητα αυτών στην αποπτωτική δράση της Cisplatin. Αντιθέτως, η απουσία (συστατικώς) λειτουργικής Akt από τα RT4 κύτταρα, πιθανότατα, συνδέεται στενά με τον χαμηλό βαθμό ογκογόνου δράσης τους και την ενισχυμένη ευαισθησία τους στο εν λόγω φάρμακο. Ενδιαφέρον είναι ότι σε προηγούμενη μελέτη έχει αναφερθεί η στενή σχέση της φωσφορυλιωμένης Akt κινάσης με την διεισδυτική ικανότητα κυτταρικών σειρών κακοήθους ουροθηλίου [477]. Σε αντιδιαστολή με τα RT4, τα υψηλής διηθητικότητας T24 κύτταρα φέρουν μία παρερμηνεύσιμη σημειακή μεταλλαγή στο κωδικό(νιο) 48 [υποκατάσταση της ισολευκίνης (*Ile*) από ασπαραγίνη

(*Asn*)] στην, κρίσιμη για την ενζυματική δράση, α2 έλικα της PTEN φωσφατάσης (διπλής εξειδίκευσης) [502]. Έτσι, πιθανή μείωση της Akt απο-φωσφορυλίωσης εξαιτίας λειτουργικής βλάβης της PTEN φωσφατάσης [502], σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα καταλυτικής ενεργότητας της PI3K κινάσης, όπως αξιολογείται σε άλλη μελέτη με τον ειδικό αναστολέα LY294002 [477], θα μπορούσαν να δικαιολογούν την ισχυρή και συστατική έκφραση της φωσφορυλιωμένης στη θέση σερίνη 473 (*Ser*<sup>473</sup>), και συνεπώς ενεργοποιημένης Akt πρωτεΐνης, κρίσιμο ρυθμιστή της απόπτωσης, αποκλειστικά στα T24 κύτταρα.

Αν και τα RT4 κύτταρα δεν εκφράζουν την φωσφορυλιωμένη μορφή της Akt στη σερίνη 473, η παραγωγή Akt και XIAP πρωτεϊνικών θραυσμάτων πιθανότατα συμβάλλει στην φαρμακο-επαγόμενη απόπτωση που παρατηρείται στην υψηλότερη δόση Cisplatin (10 μg/ml). Σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, η XIAP πρωτεΐνη δύναται να φωσφορυλιώνεται από την Akt κινάση στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 87 (*Ser*<sup>87</sup>) και ως εκ τούτου να σταθεροποιείται μέσω παρεμπόδισης τόσο της αυτο-ουμπικουϊτινίωσής της όσο και δια μέσου της Cisplatin διακριτών δράσεων ουμπικουϊτινίωσης [309, 430]. Φαίνεται πως η αποικοδόμηση της XIAP πρωτεΐνης είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για τη ρύθμιση της σταθερής κατάστασης των ενδοκυτταρικών της λειτουργικών επιπέδων και για τον καθορισμό της κυτταρικής ευαισθησίας στη Cisplatin. Η αντι-αποπτωτική δράση του XIAP παράγοντα ασκείται μέσω τόσο της άμεσης καταστολής της Κασπάσης-3 και Κασπάσης-7, όσο και της ρύθμισης του Bax/κυτοχρώματος *c*-εξαρτώμενου μονοπατιού που παρεμποδίζει την Κασπάση-9 [423, 503]. Σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, η υπερ-έκφραση του XIAP αναστολέα συσχετίζεται με την μειωμένη, έπειτα από τη δράση της Cisplatin, ενεργότητα της Κασπάσης-3 και της απόπτωσης, ενώ η μειορρύθμιση αυτού (XIAP) θεωρείται ως ένας αποτελεσματικός τρόπος για να αντιμετωπιστεί η χημειο-ανθεκτικότητα στα ίδια κύτταρα που εκφράζουν είτε την ενδογενή είτε την ανασυσταθείσα φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη [309, 425, 430, 503, 504]. Φαίνεται ότι οι RT4 και T24 κυτταρικές σειρές εμπλέκουν διακριτούς μηχανισμούς ρύθμισης της XIAP πρωτεΐνης ως απόκριση στη Cisplatin. Υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης του εν λόγω φαρμάκου (10 μg/ml), τα RT4 χαρακτηρίζονται από πρωτεολυμένες μορφές XIAP (πρωτεολυτικό πρότυπο), ενώ τα T24 κύτταρα από σημαντική μείωση της ανεπεξέργαστης μορφής (πρότυπο αποικοδόμησης). Καθώς ένα παρόμοιο βαθμο-ειδικό προφίλ παρατηρείται και για την Akt κινάση είναι πιθανό και εύλογο στα



καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης να υιοθετείται ένας μηχανισμός Akt-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης του XIAP παράγοντα αποτρέποντας έτσι την πρωτεόλυσή του, έπειτα από χορήγηση Cisplatin [309, 430]. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται πως η συστατικώς ενεργή Akt μορφή που παρατηρείται στα T24 κύτταρα δεν μπορεί να προστατέψει την XIAP πρωτεΐνη από αποικοδόμηση, η οποία χαρακτηρίζεται - κυρίως- από απουσία πρωτεολυτικών θραυσμάτων, καθώς και από φαρμακο-ειδική και δόσο-εξαρτώμενη ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της εν λόγω ανεπεξέργαστης (*unprocessed*) πρωτεΐνης. Έτσι, η XIAP πρωτεΐνη διαδραματίζει ενδεχομένως κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο στην επαγόμενη από τη Cisplatin απόπτωση στα T24 κύτταρα. Όταν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του XIAP αναστολέα πέφτουν κάτω από μία συγκεκριμένη ουδό, τότε το ρεπερτόριο των Κασπασών δεν δύναται να παρεμποδίζεται αποτελεσματικά και έτσι ενεργοποιείται άμεσα η αποπτωτική διαδικασία [503, 504]. Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεολυμένες XIAP ισομορφές, που παρατηρούνται στα RT4 κύτταρα έπειτα από τη δράση του φαρμάκου, δεν καταργούν απλά το αντι-αποπτωτικό δυναμικό του XIAP, αλλά πιθανόν λειτουργούν και ως αρνητικοί (ή αντίθετα θετικοί) ρυθμιστές κρίσιμων σηματοδοτικών διαμεσολαβητών που καταστέλλουν (ή αντίθετα προωθούν) τον κυτταρικό θάνατο, όπως για παράδειγμα η Akt κινάση. Το RT4-ειδικό πρωτεολυτικό πρότυπο του XIAP θα μπορούσε να προκύπτει είτε εξαιτίας της ουμπικουϊνίνωσης, που πιθανότατα σχετίζεται με την υψηλού μοριακού βάρους ζώνη, αποκλειστικά παρατηρούμενη στα 10 μg/ml Cisplatin, είτε από εξαρτώμενο από την Κασπάση-3 μηχανισμό, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη κατά τη διάρκεια της απόπτωσης που προκαλείται από την επίδραση του Fas αποπτωτικού επαγωγέα [505]. Ενδιαφέρον αποτελεί, σύμφωνα με υπάρχουσες αναφορές, το γεγονός ότι η ενεργή Κασπάση-3 δύναται να πρωτεολύει την Akt κινάση *in vitro* και η επίδραση αυτή μπορεί να παρεμποδίζεται από ειδικό ομοειδή αναστολέα της Κασπάσης-3 [504]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι πρωτεολυμένες μορφές της Akt ενδεχομένως δρουν με αρνητικά επικρατή τρόπο, παρεμποδίζοντας την ενδογενή ενεργότητα της Akt και των υποστρωμάτων αυτής, αποκαλύπτοντας, ως εκ τούτου, έναν κρίσιμο ρόλο για την μη-φωσφορυλιωμένη Akt κινάση στην καταστολή της απόπτωσης στα RT4 κύτταρα. Εναλλακτικά, οι ισομορφές αυτές θα μπορούσαν να λειτουργούν παράτυπα (*illegitimately*) έναντι συγκεκριμένων αποπτωτικών ρυθμιστών, όπως η XIAP πρωτεΐνη, μέσω μίας διαδικασίας τοπολογικής και λειτουργικής «τιτλοδότησης» (“*snubbing*”),

αποκλείοντάς τους, επακολούθως, από το αντι-αποπτωτικό μοριακό δίκτυο και καθιστώντας τους, τελικά, ευάλωτους στην λειτουργική αναστολή ή αποικοδόμηση. Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση της Akt στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στη θέση 473 (*Ser*<sup>473</sup>) φαίνεται πως παρέχει προστασία έναντι της επαγόμενης από τη Cisplatin πρωτεόλυσης τόσο της Akt όσο και του υποστρώματος αυτής XIAP [309, 425, 430], προσφέροντας με αυτόν τον τρόπο στα T24 κύτταρα το συγκριτικό πλεονέκτημα της σχετικής χημειο-ανθεκτικότητας.

Παρόμοια με τα καρκινικά κύτταρα των ωθηκών [425], η λειτουργία της φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνης στα RT4 κύτταρα είναι απολύτως απαραίτητη για την επαγόμενη από τη Cisplatin αποπτωτική δράση στον δομικό ακρωτηριασμό των Akt και XIAP πρωτεϊνών. Στα T24 κύτταρα, όμως, κατόπιν χορήγησης του φαρμάκου, η μειορρύθμιση του XIAP παράγοντα θα μπορούσε μερικώς να αντισταθμιστεί από την μη-λειτουργική p53 πρωτεΐνη και την συστατικώς ενεργή Akt κινάση, προσφέροντας ως εκ τούτου μερική ανθεκτικότητα στην αποπτωτική ισχύ της Cisplatin. Ενδιαφέρον είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα ωθηκών η Akt, ως απόκριση στην ενεργότητα της Cisplatin, είναι ικανή να προκαλεί μείωση συσσώρευσης της μιτοχονδριακής p53 πρωτεΐνης και p53-εξαρτώμενη απελευθέρωση του Smac αποπτωτικού ρυθμιστή (έναν γνωστό «εξουδετερωτή» των IAPs, συμπεριλαμβανομένης και της XIAP πρωτεΐνης [224]) στο κυτοσόλιο, απο-ευαισθητοποιώντας ισχυρά τα κύτταρα από την τοξική δράση του φαρμάκου [431]. Έτσι, η λειτουργική δυναμική της p53 πρωτεΐνης θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ο κύριος καθοριστής της Akt- και XIAP-διαμεσολαβούμενης χημειο-ανθεκτικότητας, η οποία αναπτύσσεται συχνά κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Πέραν της γενοτοξικής δράσης, η Cisplatin διαμορφώνει καθοριστικά τη λειτουργία της Hsp90 μοριακής συνοδού μέσω της άμεσης πρόσδεσής της σε δύο διακριτές περιοχές του μορίου. Ο εν λόγω χημειοθεραπευτικός παράγοντας φαίνεται ικανός να επάγει χωροταξική αναδιαμόρφωση στην αμινοτελική περιοχή της Hsp90 (*Hsp90N*), ενώ δύναται επίσης να παρεμποδίζει την προστατευτική δράση σχηματισμού συσσωματωμάτων (*aggregation prevention activity*) της καρβοξυτελικής περιοχής της Hsp90 πρωτεΐνης (*Hsp90C*) [432, 433, 506]. Δεδομένου του θεμελιώδους ρόλου της Hsp90 ως μοριακής συνοδού στην χωροταξική ωρίμανση και σταθερότητα πληθώρας πρωτεϊνών-«πελατών» (*protein-clients*) αυτής [432, 433], το Hsp90 πρωτεολυτικό θραύσμα των ~65 kDa,

ενδεχομένως, εμπλέκεται καθοριστικά στους επαγόμενους από τη Cisplatin δομικούς ακρωτηριασμούς των p53, Akt και XIAP πρωτεϊνών, όπως παρατηρείται κυρίως στα RT4 κύτταρα έπειτα από χορήγηση του φαρμάκου. Ένα πιθανό σενάριο θα μπορούσε να εμπλέκει την αρνητικά επικρατή λειτουργία του θραύσματος των ~65 kDa, το οποίο θα καταστέλλει την προστατευτική δράση της ανεπεξέργαστης και άθικτης Hsp90 πρωτεΐνης, στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του πρωτεώματος, καθιστώντας έτσι συγκεκριμένες πρωτεΐνες-«πελάτες» ευάλωτες στην πρωτεολυτική σχάση και αποικοδόμηση. Ενδιαφέρον είναι ότι μία διαμεσολαβούμενη από οξειδωτικό στρες θραύση της Hsp90 έχει δειχθεί να συμβαίνει στα K562 κύτταρα, καταστρέφοντας σε μεγάλο βαθμό τη δράση της ως μοριακής συνοδού, και επάγοντας ισχυρά την αποικοδόμηση των Akt και Bcr-Abl πρωτεϊνών (αντιπροσωπευτικοί «πελάτες») οδηγώντας τελικά στην απόπτωση [507]. Καθώς η Hsp90 δύναται να επεξεργαστεί πρωτεολυτικά από συγκεκριμένους παράγοντες που διεγείρουν την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένων της Cisplatin (παρούσα μελέτη), των οξειδωτικών στρεσογόνων παραγόντων, των συστατικών βασισμένων στο αρσενικό και της Doxorubicin [454, 507], θα πρέπει να θεωρηθεί ως ο κεντρικός διαμεσολαβητής κυτταροτοξικών αποκρίσεων σε ποικίλες προσβολές των κυττάρων. Βασιζόμενοι στην αναγνωριστική εξειδίκευση επιτόπου (*epitope*) του μονοκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, το οποίο προσδένεται επιλεκτικά στην καρβοξυτελική περιοχή της Hsp90, η θέση της πρωτεόλυσης θα πρέπει να τοποθετείται πλησίον της αμινοτελικής περιοχής. Ένα παρόμοιο πρωτεολυτικό προφίλ παρατηρήθηκε, επίσης, στα K562 κύτταρα κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες, καθώς και στα RT4 κύτταρα έπειτα από χορήγηση Doxorubicin [454, 507].

Με τη βοήθεια του αλγορίθμου GrabCas, ήταν δυνατόν να ταυτοποιήσουμε μία πιθανή θέση αναγνώρισης και πρωτεόλυσης από την Granzyme B πρωτεάση σερίνης στην αμινοξική αλληλουχία και των δύο μορφών της Hsp90 πρωτεΐνης (α και β), ενώ δεν αναγνωρίστηκε κανένα μοτίβο υψηλής πιθανότητας πρόσδεσης για κάποιο μέλος της οικογένειας των Κασπασών [454]. Σε συμφωνία και με άλλες αναφορές, έκθεση είτε των K562 κυττάρων είτε της ανασυνδυασμένης Hsp90 πρωτεΐνης στην ανθρώπινη Granzyme B πρωτεάση είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή Hsp90 πρωτεολυτικών θραυσμάτων [434, 507], αποδεικνύοντας ως εκ τούτου ότι η Hsp90 αποτελεί *in vitro* ένα γνήσιο (*bona fide*) υπόστρωμα της Granzyme B. Στα RT4 κύτταρα, τα φαρμακο-επαγόμενα πρωτεϊνικά επίπεδα της

Granzyme B φαίνεται να ακολουθούν το ίδιο προφίλ έκφρασης με αυτό του πρωτεολυτικού θραύσματος (~65 kDa) της Hsp90, ενισχύοντας έτσι τον κρίσιμο ρόλο της Granzyme B στην πρωτεόλυση και μειορρύθμιση (*downregulation*) της Hsp90 κατά τη διάρκεια της διαμεσολαβούμενης από τη Cisplatin απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Προς μεγάλο ενδιαφέρον, χορήγηση Granzyme B σε κύτταρα μελανώματος (T1) είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ATM και p38 MAPK κινασών και την επακόλουθη φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνη στις θέσεις 15 (*Ser<sup>15</sup>*) και 37 (*Ser<sup>37</sup>*), προσφέροντας σημαντική γνώση στην λειτουργική σχέση ανάμεσα στην Granzyme B πρωτεάση σερίνης και στην p53 πρωτεΐνη, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διάσπασης και αποσύνθεσης [508]. Ως εκ τούτου, το βαθμο-εξαρτώμενο προφίλ έκφρασης της Granzyme B, ως απόκριση στη δράση της Cisplatin, ενδεχομένως να σχετίζεται λειτουργικά με το γενετικό υπόβαθρο του γονιδίου *p53* στα RT4 και T24 κύτταρα. Έτσι, η υπερ-έκφραση της Granzyme B στα RT4 κύτταρα θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στη συσσώρευση και φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης, ενώ η μειορρύθμισή της στα T24 κύτταρα πιθανόν να εμποδίζει p53-εξαρτώμενες αποκρίσεις (κυρίως όταν η τελευταία είναι μεταλλαγμένη) στη δράση της Cisplatin. Επιπλέον, φαίνεται, πως η μεσολαβούμενη από τη Cisplatin ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της Granzyme B στα T24 κύτταρα επιτρέπει την προστασία της Hsp90 από πρωτεολυτική σχάση, διατηρώντας έτσι την δομική ακεραιότητα πολλών αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών-«πελατών» της (για παράδειγμα της Akt), ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο εν λόγω φάρμακο, και παρέχοντας τελικά κάποιο βαθμό κυτταρικής ανθεκτικότητας σε αυτό. Εάν το *Granzyme B* αποτελεί γονίδιο στόχο της ενεργοποιημένης p53 πρωτεΐνης θα ήταν μία ενδιαφέρουσα υπόθεση, η οποία όμως χρήζει περαιτέρω μελέτης [438].

Οι αποκρίσεις στην καταστροφή του DNA, εκτός από την p53 πρωτεΐνη, περιλαμβάνουν και επιπρόσθετα αποπτωτικά μονοπάτια, τα οποία καθοδηγούνται από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1 [509, 510]. Έπειτα από έκθεση κυττάρων στη Cisplatin, η E2F1 πρωτεΐνη δύναται να σταθεροποιείται ενδοκυτταρικά μέσω κρίσιμων μηχανισμών που περιλαμβάνουν την μεσολαβούμενη από την ATM κινάση φωσφορυλίωση σερίνης, την αυξημένη ενεργότητα της CDK2 κινάσης και, πιθανώς, την επαγόμενη από τον P/CAF συν-ενεργοποιητή (*co-activator*) ακετυλίωση λυσίνης [509, 511-513]. Ενδιαφέρον είναι ότι η συσσώρευση της E2F1 πρωτεΐνης σε

εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών (*MEFs: mouse embryo fibroblasts*), έπειτα από χορήγηση Cisplatin, φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το γενετικό υπόβαθρο του *p53* γονιδίου [511, 512]. Η ενεργοποίηση του E2F1 παράγοντα οδηγεί σε μεταγραφική αυξορρύθμιση σημαντικών προ-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το *Bik* και *Bim*, καθώς και σε μεταγραφική καταστολή χαρακτηριστικών μελών της αντι-αποπτωτικής οικογένειας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το γονίδιο *Bcl-2* [509, 510, 514-518]. Σύμφωνα με αυτά, και εφόσον στην μεγάλη συγκέντρωση Cisplatin και στις δύο κυτταρικές σειρές (RT4 και T24) παρατηρείται ισχυρή επαγωγή των γονιδίων *Bik* και *Bim*, συγχρόνως με μία σημαντική μείωση στο γονίδιο *Bcl-2*, ο E2F1 μεταγραφικός παράγοντας, ενδεχομένως, εμπλέκεται καθοριστικά στην διαμεσολαβούμενη από τη Cisplatin απόπτωση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, με έναν πιθανώς *p53*-ανεξάρτητο τρόπο. Φαίνεται ότι και οι δύο κυτταρικοί τύποι RT4 (βαθμού κακοήθειας I) και T24 (βαθμού κακοήθειας III) μπορούν να οδηγηθούν σε επαγόμενη από τη Cisplatin απόπτωση μέσω μίας E2F1-μεσολαβούμενης λειτουργικής διατάραξης της ενδοκυτταρικής ισορροπίας επιλεγμένων προ-αποπτωτικών (για παράδειγμα *Bik* και *Bim*) και αντι-αποπτωτικών (για παράδειγμα *Bcl-2*) γονιδίων [509]. Ως αποτέλεσμα, η μιτοχονδριακή διαπερατότητα αυξάνεται, επιτρέποντας την εκροή, μεταξύ άλλων, του προ-αποπτωτικού μορίου κυτόχρωμα *c* στο κυτοσόλιο, όπου δύναται να επάγει τον σχηματισμό του «αποπτωσώματος» (“*apoptosome*”), την ωρίμανση του ρεπερτορίου των Κασπασών και τελικά την ενεργοποίηση της απόπτωσης [224, 423, 435, 497]. Ως εκ τούτου, όσον αφορά στη δράση της Cisplatin, ως αποπτωτικό επαγωγέα του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου, φαίνεται πως το «ενδογενές» μιτοχονδριακό μονοπάτι είναι απολύτως απαραίτητο και, επιπλέον, το λειτουργικό του δυναμικό ρυθμίζεται μερικώς από έναν *p53*-ανεξάρτητο μηχανισμό.

Σε αντίθεση με τον E2F1, τα *p53*-εξαρτώμενα πρότυπα μεταγραφικής ενεργοποίησης μπορούν λειτουργικά να συνδυαστούν με την διαφορετική ευαισθησία των RT4 και T24 κυττάρων στη Cisplatin. Χαρακτηριστικά γονίδια στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα *p53*, όπως τα *Fas*, *FasL*, *Puma* και *Caspase-10* [427, 436-439, 519], σημείωσαν μεταγραφική ενεργοποίηση μετά τη χορήγηση του φαρμάκου στα RT4 κύτταρα, τα οποία φέρουν φυσικού τύπου *p53*, αλλά όχι στα T24 κύτταρα, τα οποία περιέχουν μεταλλαγμένη *p53* ( $\Delta Y^{126}$ ), ενώ οι γονιδιακές αποκρίσεις των *Bax* και *Noxa* (γονίδια στόχοι της *p53*), ως απόκριση στο φάρμακο, παρέμειναν ανεπηρέαστες (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), επιτρέποντας έτσι τη συσχέτιση της

συγκριτικής ανθεκτικότητας των T24 κυττάρων στην τοξική δράση της Cisplatin με τις κυτταρικές λειτουργίες επιλεγμένων γονιδίων στόχων του p53 μεταγραφικού παράγοντα. Φαίνεται πως η παρουσία της φυσικού τύπου λειτουργικής p53 πρωτεΐνης συνδέεται στενά με την αποτελεσματική επαγωγή της Fas/FasL-μεσολαβούμενης απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης έπειτα από χορήγηση Cisplatin. Πράγματι, η έκφραση των Fas και FasL στην κυτταρική επιφάνεια δύναται να αυξορρυθμιστεί ισχυρά μετά από έκθεση στη Cisplatin διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών που φέρουν φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη [520, 521], ενώ η μεταλλαγμένη p53 μορφή μπορεί να λειτουργεί ως πιθανός καταστολέας της ενεργότητας του γονιδίου *Fas* [520, 522] παρέχοντας, ως εκ τούτου, στα κύτταρα που φέρουν ανεπαρκή p53 το πλεονέκτημα της χημειο-ανθεκτικότητας. Όπως υποδείχθηκε προηγουμένως, η χημειο-ευαισθησία κυττάρων συμπαγών όγκων ελέγχεται από αποπτωτικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων της εμπλοκής του μονοπατιού Fas/FasL και της ωρίμανσης του ρεπερτορίου των Κασπασών [309, 523]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συγκριτική αντοχή των T24 κυττάρων στη Cisplatin θα μπορούσε να αναπτυχθεί μέσω μίας p53-εξαρτώμενης λειτουργικής εξασθένησης του Fas/FasL σηματοδοτικού μονοπατιού, ένα σενάριο το οποίο ενισχύεται σημαντικά από την απουσία ώριμης και πλήρως λειτουργικής Κασπάσης-8 (καθώς απουσιάζει το μικρό πρωτεολυτικό θραύσμα), έπειτα από έκθεση των T24 στην υψηλή δόση φαρμάκου (10 μg/ml). Ενδιαφέρον είναι ότι απώλεια του μονοπατιού σηματοδότησης που περιλαμβάνει την Κασπάση-8, έχει συσχετισθεί, σε προηγούμενες αναφορές, με την αποκτώμενη ανθεκτικότητα των HEP-2 κυττάρων (ανθρώπινου λαρυγγικού καρκίνου) στην διαμεσολαβούμενη από τη Cisplatin απόπτωση [524].

Επιπροσθέτως, η απουσία μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου *TRAIL* και η σχετική έλλειψη ανταπόκρισης του γονιδίου *Κασπάση-10* στη Cisplatin αποδεικνύουν ότι, εκτός από το Fas/FasL, το επιπλέον σύστημα διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου TRAIL/DR4/DR5/Κασπάση-8/Κασπάση-10 φαίνεται λειτουργικά να εξασθενεί, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην κυτταρο-ειδική -μερική- ανθεκτικότητα των T24 στην αποπτωτική ισχύ της Cisplatin. Σύμφωνα με αυτό, τα T24, συγκρινόμενα με τα RT4 κύτταρα, μπορούν και επιδεικνύουν σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση και, μάλιστα, με Akt-εξαρτώμενο τρόπο [525]. Αν και τα *DR4* και *DR5* γονίδια (των οποίων οι ομοειδείς πρωτεΐνες δρουν ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς του TRAIL [423])

ακολουθούν χαρακτηριστικά p53-εξαρτώμενα προφίλ μεταγραφικής έκφρασης υπό την επίδραση της Cisplatin (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), η βαθμο-ειδική καταστολή της γονιδιακής ενεργότητας του *TRAIL* επιβεβαιώνει την πλήρη παρεμπόδιση της λειτουργικής εμπλοκής του TRAIL/DR4/DR5 αποπτωτικού άξονα στον φαρμακο-επαγόμενο θάνατο των T24 κυττάρων. Η αποσιώπηση του γονιδίου *TRAIL* στα T24 κύτταρα θα μπορούσε να πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών διακριτών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της βαθμο-εξαρτώμενης μεταγραφικής καταστολής, της μεθυλίωσης του DNA και της υπο-ακετυλίωσης των ιστονών. Πράγματι, το *TRAIL* ταξινομείται μεταξύ των χαρακτηριστικότερων γονιδίων στόχων των μελών της οικογένειας FoxO [441], των οποίων οι μεταγραφικές ενεργότητες ρυθμίζονται αρνητικά, μεταξύ άλλων, από μηχανισμό φωσφορυλίωσης ο οποίος ελέγχεται από την Akt κινάση [526-528]. Για τον λόγο αυτό, η συστατικώς ενεργή μορφή της Akt, η οποία παρατηρείται αποκλειστικά στα T24 κύτταρα, θα μπορούσε να φωσφορυλιώνει επιλεγμένους FoxO μεταγραφικούς παράγοντες, καθιστώντας τους ανενεργούς και ανίκανους να επάγουν κατωροϊκά το *TRAIL* γονίδιο στόχο. Παρ' όλα αυτά, η ενεργότητα του γονιδίου *TRAIL* μπορεί να αποκατασταθεί σε συγκεκριμένα πρότυπα κυτταρικά συστήματα καρκίνου, επιδρώντας είτε με 5-Aza-2'-deoxycytidine είτε με αναστολείς των HDAC απο-ακετυλασών των ιστονών, καταδεικνύοντας εμφανώς τον καθοριστικό ρόλο της απο-μεθυλίωσης του DNA ή/και της ακετυλίωσης των ιστονών στη ρύθμιση έκφρασης αποπτωτικών γονιδίων [423, 529, 530]. Τα ευρήματά μας πιθανόν προβάλλουν μία νέα θεραπευτική οδό πρόκλησης αποτελεσματικής απόπτωσης σε κακοήθεις όγκους των οποίων τα κύτταρα φέρουν μεταλλαγμένη p53, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, μέσω στοχευμένης υπερ-έκφρασης και συστατικής ενεργοποίησης των Fas, FasL και TRAIL αποπτωτικών ρυθμιστών, αποκλειστικά και μόνο στην περιοχή του όγκου [437].

Το p53-εξαρτώμενο μεταγραφικό προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Puma* υποστηρίζει σθεναρά την εμπλοκή της ομοειδούς πρωτεΐνης στη διαδικασία ανάπτυξης διαφορικής ευαισθησίας των δύο, υπό μελέτη, κυτταρικών σειρών (RT4 και T24) στη δράση της Cisplatin. Το *Puma*, ένα γνήσιο (*bona fide*) γονίδιο στόχος της p53 πρωτεΐνης [436, 438], έχει συσχετισθεί, σε προηγούμενες αναφορές, με την διαμεσολαβούμενη από τη Cisplatin νεφροτοξικότητα και απόπτωση κυττάρων νεφρικών σωλήνων, μέσω ενός p53-εξαρτώμενου μηχανισμού [427, 439]. Ως εκ

τούτου, σε αντίθεση με τα T24 κύτταρα, η αυξορρύθμιση και μιτοχονδριακή συσσώρευση της Bcl-2-only Puma πρωτεΐνης στα εκτιθέμενα στη Cisplatin RT4 κύτταρα, θα μπορούσε να οδηγεί σε σημαντική εξουδετέρωση των αντι-αποπτωτικών λειτουργιών των μελών της Bcl-2 οικογένειας, καθώς και σε διαμεσολαβούμενη από την Bax πρωτεΐνη απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* στο κυτοσόλιο, ακολουθούμενη από ωρίμανση των Κασπασών και ενεργοποίηση της απόπτωσης, όπως έχει δειχθεί και σε άλλα κυτταρικά συστήματα [224, 427, 435]. Συμπερασματικά, η επαγόμενη από το Puma υπερ-ευαισθητοποίηση του «ενδογενούς» μιτοχονδριακού μονοπατιού πιθανώς να συνεισφέρει καθοριστικά στην μειωμένη ανθεκτικότητα των RT4 κυττάρων στην τοξικότητα της Cisplatin.

Η ομάδα των γονιδίων που παρουσιάζει p53-ανεξάρτητη μειορρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας, ως απόκριση στη Cisplatin, συμπεριλαμβάνει, πέραν του *Bcl-2*, τα γονίδια *FAP-1*, *ATP7A*, *ATP7B* και *MRP1*. Τα επίπεδα έκφρασης του *FAP-1* ελαττώνονται αισθητά και στις δύο κυτταρικές σειρές RT4 και T24 στην μεγάλη συγκέντρωση του φαρμάκου (10 μg/ml), υποδεικνύοντας, ενδεχομένως, τον πιθανό ρόλο της *FAP-1* πρωτεΐνης στην επαγόμενη από τη Cisplatin απόπτωση κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου. Αυτό, όμως, θα μπορούσε να έχει εφαρμογή περισσότερο στα RT4 κύτταρα, απ' ό,τι στα T24, καθώς η διαφορετική τους δυναμική στην ενεργοποίηση του Fas/FasL σηματοδοτικού άξονα καθορίζει αποφασιστικά την λειτουργική σπουδαιότητα των ομοειδών κατωροϊκών διαμεσολαβητών του αποπτωτικού μονοπατιού. Η υπερ-έκφραση της *FAP-1* πρωτεΐνης έχει δειχθεί να αναστέλλει την Fas-διαμεσολαβούμενη απόπτωση σε συγκεκριμένα κύτταρα ανθρώπινων κακοηθειών, δρώντας ως αρνητικός διακόπτης του Fas/FasL μονοπατιού και παρέχοντας στους καρκινικούς πληθυσμούς ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα επιβίωσης [521, 531]. Επιπλέον, αποσιώπηση της μεταγραφικής έκφρασης του *FAP-1* γονιδίου ή αναστολή δράσης της φωσφατάσης τυροσίνης της *FAP-1* πρωτεΐνης (*PTP: protein tyrosine phosphatase*), είναι ικανές να καταργούν την ανθεκτικότητα κυττάρων του όγκου στην επαγόμενη απόπτωση από την Fas πρωτεΐνη, σε πρότυπο σύστημα καρκίνου του κεφαλής και λαιμού SCCHN κυττάρων [532].

Τα *ATP7A*, *ATP7B* και *CTR1* γονιδιακά προϊόντα λειτουργούν ως άμεσοι σύνδεσμοι της ρύθμισης της ομοιόστασης του χαλκού και της αποτελεσματικής συγκέντρωσης της Cisplatin μέσα στο κύτταρο [306, 309, 311]. Ο *CTR1*, ο σημαντικότερος «εισαγωγέας» χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου, έχει αποδειχθεί



ότι μεταφέρει τη Cisplatin και τα ανάλογα αυτής, ενδοκυτταρικά, ενώ οι αντλίες ATPάσης ATP7A και ATP7B, οι οποίες «εξάγουν» εκτός κυττάρου τον χαλκό, ρυθμίζουν σημαντικά την εκροή της Cisplatin από το κύτταρο [306, 309, 311, 446-448]. Συνεπώς, είναι η σχετική κινητική της εισροής-εκροής αυτή που ρυθμίζει την ενδοκυτταρική συσσώρευση της Cisplatin και, ως εκ τούτου, την κυτταροτοξική της δυναμική. Απώλεια λειτουργίας της CTR1 πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα να εισέρχεται μειωμένη ποσότητα Cisplatin στο κύτταρο και συνεπώς να αναπτύσσεται ισχυρή ανθεκτικότητα στο εν λόγω φάρμακο [306, 309, 311, 317, 321, 446, 448, 533].

Παρ' όλα αυτά, υπερ-έκφραση του CTR1 μεταφορέα δεν είναι ικανή να μεταβάλλει σημαντικά την ευαισθησία καρκινικών κυττάρων ωοθηκών στη Cisplatin, παρά τα αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ενδοκυτταρικά [309, 448, 534]. Από την άλλη πλευρά, ενισχυμένη έκφραση των ATP7A και ATP7B πρωτεϊνών εκροής συσχετίζονται θετικά με τον βαθμό ανθεκτικότητας στη Cisplatin τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και σε κλινικά δείγματα ασθενών [306, 309, 311, 320, 326, 446, 448]. Οι ATP7A και ATP7B πρωτεΐνες φαίνεται να επιδεικνύουν διακριτές και αρκετά διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες. Αν και η αυξορρυθμισμό της ATP7B συνδέεται με μειωμένη ικανότητα συγκέντρωσης της Cisplatin ενδοκυτταρικά, ως αποτέλεσμα του υψηλού βαθμού εκροής αυτής, η υπερ-έκφραση της ATP7A πρωτεΐνης καθιστά καρκινικά κύτταρα ωοθηκών ανθεκτικά στη Cisplatin, εξαιτίας της ενισχυμένης «απομόνωσης» της (Cisplatin) σε κυστικά κλάσματα/περιοχές, κρατώντας την μακριά από τις θέσεις στόχους της κυτταροτοξικής της δράσης [306, 311, 323, 326, 448, 535].

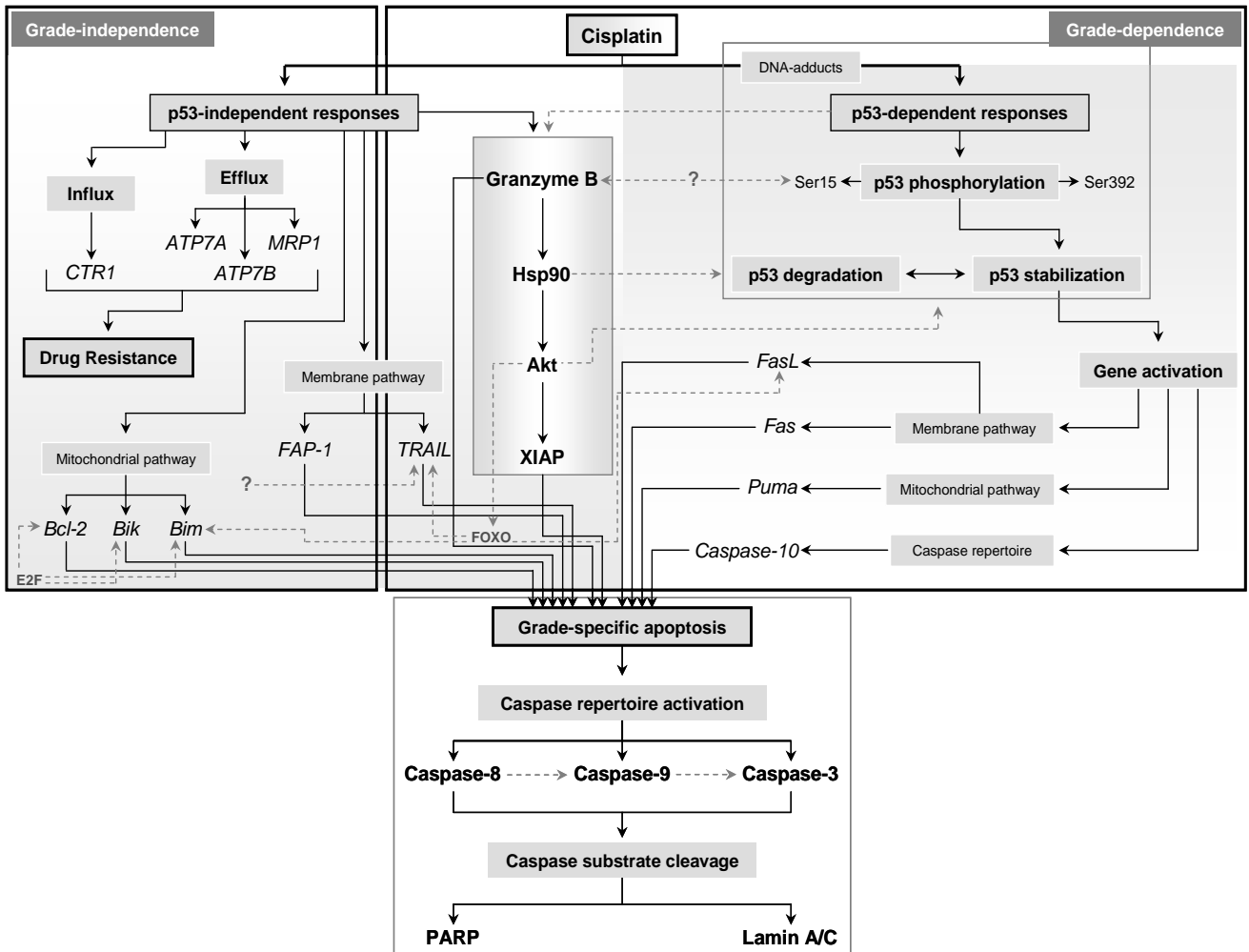
Χορήγηση υψηλής δόσης Cisplatin στα RT4 και T24 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση των ATP7A και ATP7B επιπέδων έκφρασης, ενώ η γονιδιακή ενεργότητα του CTR1 παρέμεινε ανεπηρέαστη και στις δύο, υπό εξέταση, κυτταρικές σειρές. Έτσι, φαίνεται πως η ευαισθησία καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης στη Cisplatin δύναται, μεταξύ άλλων, να προέλθει από (μειο)ρύθμιση του βαθμού εκροής, αλλά όχι εισροής, του φαρμάκου. Παρ' όλα αυτά, η p53-ανεξάρτητη μεταγραφική εξασθένηση των γονιδίων ATP7A και ATP7B δεν είναι ικανή να ερμηνεύσει την διαφορετική ανθεκτικότητα των RT4 και T24 κυττάρων στη Cisplatin, ενοχοποιώντας, έτσι, άλλα επίπεδα ρύθμισης, όπως την εξαρτώμενη από τον βαθμό κακοήθειας εντόπιση των ATP7A και ATP7B πρωτεϊνών

σε συγκεκριμένα υπο-κυτταρικά διαμερίσματα, όπως προηγουμένως έχει αναφερθεί για καρκινικά κύτταρα ωοθηκών [536].

Εκτός από τους μεταφορείς χαλκού (*copper transporters*), διακριτά μέλη της MRP (*multidrug resistant protein*) οικογένειας φαίνεται να λειτουργούν ως ATP-εξαρτώμενες αντλίες εξόδου για πληθώρα φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της Cisplatin [306, 311, 445]. Αν και έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η MRP1 πρωτεΐνη προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των ανθρακυκλινών, αλλά όχι της Cisplatin [324, 445, 446], η p53-ανεξάρτητη μειορρύθμιση των αντίστοιχων γονιδιακών δραστηριοτήτων στα RT4 και T24 κύτταρα, μετά από έκθεση στο φάρμακο, υποδεικνύει ισχυρά τον ρόλο της MRP1 στην ευαισθησία του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου στη Cisplatin. Αντιθέτως, το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *MRP2* (*ABCC2/cMOAT*), του οποίου η αυξημένη λειτουργία εμπλέκεται συχνά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη Cisplatin [306, 311, 324, 445, 446], δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την χορήγηση του φαρμάκου σε κανέναν από τους δύο κυτταρικούς τύπους (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα), αποσυνδέοντας έτσι την εμπλοκή του από την τοξικότητα και τον αποπτωτικό θάνατο που προκαλείται από τη Cisplatin σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, προσπαθήσαμε να αποκαλύψουμε την πολυπλοκότητα των λειτουργικών αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν καθοριστικά την ευαισθησία και την διαφορική ανθεκτικότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, RT4 και T24, στην κυτταροτοξική ενεργότητα της Cisplatin, ενός από τα πλέον δραστικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα στην κλινική πράξη (**Εικόνα 4.1**). Αποδεικνύουμε εμφανώς ότι και οι δύο τύποι κυττάρων οδηγούνται σε μεσολαβούμενη από τη Cisplatin απόπτωση, με τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από το ρεπερτόριο των Κασπασών. Η βαθμο-ειδική ευαισθησία στο φάρμακο σχετίζεται με την διαφορετική κατάσταση φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης των αποπτωτικών ρυθμιστών p53 και Akt, μαζί με τις διακριτές δομικές ακεραιότητες των κρίσιμων για την επιβίωση καθοριστών μεταγωγής σήματος, XIAP και Hsp90. Επιπλέον, η Cisplatin προάγει την αναδιάρθρωση των μεταγραφικών προφίλ σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται είτε στην απόπτωση είτε στην ενδοκυτταρική συσσώρευση του φαρμάκου. Μία ομάδα εξ αυτών μπορεί να ρυθμίζεται με τρόπο εξαρτώμενο από την E2F1 πρωτεΐνη, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι πιθανόν υπεύθυνος για τις μεταγραφικές αποκρίσεις άλλων γονιδίων που μελετήθηκαν έπειτα από έκθεση

στη Cisplatin. Οι καταστροφικές επιδράσεις της Cisplatin θα πρέπει, επίσης, να συνδέονται με την αυξημένη συσσώρευση του φαρμάκου στο εσωτερικό των, υπό εξέταση, καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, πιθανότατα εξαιτίας της σημαντικής εξασθένησης των συστημάτων εκροής του εν λόγω χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Ενδιαφέρον είναι πως η πλειονότητα των γονιδίων της παρούσας έρευνας, όπως τα *Bik*, *Bim*, *Bcl-2*, *FAP-1*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL* (μόνο για τα καρκινικά κύτταρα βαθμού κακοήθειας I), *Puma*, *Caspase-10*, *ATP7A*, *ATP7B* και *MRP1*, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως *in vivo* βιο-διαγνωστικοί δείκτες (*biomarkers*), με σκοπό την ανάπτυξη μίας μοριακής πλατφόρμας, η οποία θα μπορούσε αξιόπιστα να ελέγχει τις αποκρίσεις των ανθρώπινων κυτταρικών πληθυσμών κακοήθους ουροθηλίου στην θεραπευτική ενεργότητα της Cisplatin, παρέχοντας ως εκ τούτου κλινικά πρωτόκολλα με καινοφανή και πολυδύναμα γενετικά εργαλεία, για μία πιο αποτελεσματική και επιτυχημένη διαχείριση και αντιμετώπιση των ανθρώπινων ουροποιητικών κακοηθειών.



**Εικόνα 4.1** Σχηματική απεικόνιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων και μονοπατιών σηματοδοτικής ροής, όπου παρουσιάζονται οι ρυθμιστές που μελετήθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή και εμπλέκονται άμεσα στην επαγόμενη από τη Cisplatin απόπτωση των καρκινικών κυτταρικών σειρών RT4 και T24 της ουροδόχου κύστης. Έκθεση στη Cisplatin οδηγεί σε ενεργοποίηση ή καταστολή διακριτών p53-εξαρτώμενων και p53-ανεξάρτητων μηχανισμών, οι οποίοι συνδέονται στενά με την επαγωγή της απόπτωσης και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο φάρμακο. Οι πρωτεΐνες σημειώνονται με έντονα γράμματα (*bold*), ενώ τα γονίδια εμφανίζονται με γράμματα πλάγιας μορφής (*italics*). *Grade-independence*: Ανεξαρτησία από τον βαθμό κακοήθειας, *Grade-dependence*: Εξάρτηση από τον βαθμό κακοήθειας, *DNA-adducts*: Σύμπλοκα DNA, *p53-independent responses*: p53-ανεξάρτητες αποκρίσεις, *p53-dependent responses*: p53-εξαρτώμενες αποκρίσεις, *Influx*: Εισροή, *Efflux*: Εκροή, *Drug Resistance*: Ανθεκτικότητα στο φάρμακο, *p53 degradation*: Αποικοδόμηση της p53, *p53 stabilization*: Σταθεροποίηση της p53, *Gene activation*: Γονιδιακή ενεργοποίηση, *Membrane pathway*: Μεμβρανικό μονοπάτι, *Mitochondrial pathway*: Μιτοχονδριακό μονοπάτι, *Caspase repertoire*: Ρεπερτόριο των Κασπασών, *Grade-specific apoptosis*: Βαθμο-ειδική απόπτωση, *Caspase repertoire activation*: Ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών, *Caspase substrate cleavage*: Πρωτεόλυση των υποστρωμάτων των Κασπασών, *Caspase*: Κασπάση και *Lamin A/C*: Λαμίνη A/C.

## 4.2 Bortezomib (Μπορτεζομίμπ – Βορτεζομίδη)

Το 2012 θεωρείται ότι αποτελεί το πλέον θεραπευτικά υποσχόμενο έτος για τους ασθενείς που υποφέρουν από κακοήθειες της ουροδόχου κύστης. Οι δημοσιευμένες αναφορές προσπαθούν να ενοποιήσουν την υπάρχουσα γνώση σε όλο το φάσμα των θεματικών αξόνων που κυμαίνεται από την αιτιολογία της νόσου μέχρι την χημειοθεραπεία δευτέρου επιπέδου. Είναι, πλέον, σαφές ότι η παγκόσμια δημογραφική κατανομή του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αλλάζει βαθμιαία, με τρόπο που οι αιτιακοί παράγοντες (όπως η συχνότητα καπνίσματος και η εργασιακή επιβάρυνση) πρόκλησης της ασθένειας μεταβάλλονται από τα δυτικά κράτη σε αυτά της Αφρικής και Ασίας [537]. Επιπροσθέτως, αναπτύσσονται ισχυρές πλατφόρμες, οι οποίες συνδυάζουν λεπτομερή στοιχεία της μοριακής ανάλυσης του όγκου με αυτά που αφορούν στην εξατομικευμένη φαρμακολογική θεραπεία. Είναι χαρακτηριστικό ότι πρόσφατη μελέτη ανάλυσης της αλληλουχίας γονιδιωματικού DNA κακοήθους ουροθηλίου συσχέτισε εντυπωσιακά την εξατομικευμένη επιτυχή απόκριση του εν λόγω ασθενούς στο Everolimus (Εβερόλιμους) (ειδικός αναστολέας του mTOR μονοπατιού σηματοδότησης) με κρίσιμη μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας στον *TSC1* (*tuberous sclerosis complex 1*) γενετικό τόπο [537, 538]. Στην ίδια κατεύθυνση, και με στόχο την ανάπτυξη νέων, αποδοτικών και ασφαλών χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων, μία σειρά «ορφανών» (με άγνωστο μοριακό στόχο) φαρμάκων έχουν αρχίσει να δοκιμάζονται εντατικά σε διακριτές μορφές ανθρώπινης κακοήθειας, με 15 εξ' αυτών να έχουν ήδη εγκριθεί για περαιτέρω κλινική χρήση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (*FDA: food and drug administration*) των Η.Π.Α., με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ταυτοποίηση ενός μέχρι πρόσφατα θεωρούμενου «ορφανού» φαρμάκου για την αντιμετώπιση των διαταραχών του ύπνου στην επιτυχή θεραπεία του *N-Myc*-εξαρτώμενου ανθρώπινου νευροβλαστώματος [539, 540].

Είναι, λοιπόν, σαφές ότι θα πρέπει να επαναξιολογηθούν όλα τα θεραπευτικά πρωτόκολλα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, με βάση το κατά περίπτωση γενετικό περιβάλλον του εκάστοτε τύπου κακοήθους κυττάρου, καθώς και να εξεταστούν ήδη γνωστά (αλλά και νέα) χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, για άλλες μορφές καρκίνου, σε αυτήν του κακοήθους ουροθηλίου. Ως εκ τούτου, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι αποκρίσεις τεσσάρων (4), διακριτού βαθμού κακοήθειας, πρωτεωμικού περιεχομένου, γενετικής σύστασης και

σηματοδοτικού προφίλ (με σκοπό την ανάπτυξη ενός προ-κλινικού μοντέλου που να αντανακλά την κλινική ποικιλομορφία της ασθένειας), καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης στον ειδικό αναστολέα του πρωτεασώματος Bortezomib (εμπορική ονομασία Velcade), ο οποίος -ιστορικά- αποτελεί ένα ισχυρό χημειοθεραπευτικό εργαλείο έναντι του ανθρώπινου πολλαπλού μυελώματος [541]. Συνεκτιμώντας συγκριτικά τις κυτταροτοξικές δράσεις του Bortezomib στα διακριτά κυτταρικά περιβάλλοντα των RT4, RT112, T24 και TCCSUP κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου αποκαλύπτεται ότι το Bortezomib μπορεί και προκαλεί ισχυρή μείωση του βαθμού επιβίωσης των υπό μελέτη κυτταρικών τύπων, η οποία, όμως, δεν φαίνεται να εξαρτάται από τον βαθμό κακοήθειας αυτών, αφού την υψηλότερη (48ωρη) ευαισθησία επιδεικνύουν τα βαθμού κακοήθειας III (T24) και I-II (RT112) κύτταρα, και όχι τα αντίστοιχα των IV (TCCSUP) ή I (RT4) τύπων. Παρ' όλα αυτά, με εξαίρεση τα TCCSUP, οι υπόλοιποι κυτταρικοί τύποι αποδείχθηκαν να υιοθετούν ισχυρά Κασπασο-εξαρτώμενα προγράμματα απόπτωσης, με τα RT4 και T24 να ενεργοποιούν τόσο το «εξωγενές» -των διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου- (μέσω ενεργοποίησης Κασπάσης-8) όσο και το «ενδογενές» -του μιτοχονδρίου- (μέσω ενεργοποίησης Κασπάσης-9) μονοπάτι αποπτωτικού θανάτου. Και στις τρεις περιπτώσεις των RT4, RT112 και T24 κυττάρων καταλήγουμε σε μία ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή ενεργοποίησης της Κασπάσης-3, η οποία, πλέον, μπορεί και οδηγεί στην φαρμακο-εξαρτώμενη εξόντωση των -υπό εξέταση- κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου, όπως εμφανώς αποκαλύπτεται από την ισχυρή φαρμακο-ειδική πρωτεόλυση των PARP και Lamin A/C ειδικών υποστρωμάτων αυτής. Με βάση, λοιπόν, την υπάρχουσα δημοσιευμένη γνώση που αφορά στα μηχανιστικά μοντέλα εμπλοκής της απόπτωσης ως μηχανισμού καταστροφής κυττάρων υπό την επίρεια εξωγενούς ή ενδογενούς στρες [221, 542], αποκαλύπτεται αδιαμφισβήτητα η μη-αντιστρεπτή ενεργοποίηση ενός ισχυρού και δοσο-εξαρτώμενου προγράμματος αποπτωτικού θανάτου στο ανθρώπινο κακοήθες ουροθήλιο μετά από έκθεση αυτού στο Bortezomib.

Η συγκριτικά υψηλότερη -μερική- αντοχή των TCCSUP (βαθμού κακοήθειας IV) κυττάρων στο αποπτωτικό δυναμικό του Bortezomib, ενδεχομένως, αντισταθμίζεται από την ισχυρή επαγωγή της αυτοφαγίας και την ενίσχυση του μηχανισμού βιοσύνθεσης αυτοφαγοσωμάτων, όπως αυτές αντανακλώνονται στην ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή έκφρασης της κρίσιμης αυτοφαγικής

πρωτεΐνης LC3B-II ως απόκριση στη δράση του φαρμάκου. Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου της LC3B-II μορφής στην επιμήκυνση και «κυκλοποίηση» του αυτοφαγοσώματος, και της ευρείας χρήσης αυτής ως ενός αξιόπιστου διαφορικού δείκτη ταυτοποίησης της αυτοφαγίας [221, 276, 543], και με βάση την παρατήρηση ότι το Bortezomib δεν προκαλεί -βιολογικά αξιολογήσιμη- μειορρύθμιση των Atg5, Atg7 και Beclin-1 αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα TCCSUP κύτταρα, φαίνεται ότι το φάρμακο μπορεί και επάγει την ισχυρή βιοσύνθεση αποικοδομητικών αυτοφαγοσωμάτων, τα οποία, πιθανώς, δύνανται να προάγουν τον κυτταρικό θάνατο, με τρόπο που να αντισταθμίζουν τις χαμηλές αποπτωτικές αποκρίσεις των εν λόγω κυττάρων και έτσι να δικαιολογούν, μέσω συνέργειας απόπτωσης και αυτοφαγίας, την -γενικά- υψηλή κυτταροτοξική δυναμική του φαρμάκου σε αυτά (TCCSUP).

Αν και τα τέσσερα (4) αποκτηθέντα πρότυπα αποπτωτικού θανάτου στη δράση του φαρμάκου αξιολογούνται ως ποιοτικά παρόμοια μεταξύ τους, με εμφανείς δοσο-εξαρτώμενους χαρακτήρες φαρμακο-ειδικής πρωτεολυτικής επεξεργασίας κρίσιμων αποπτωτικών διαμεσολαβητών, τα αντίστοιχα προφίλ αυτοφαγικής απόκρισης στο Bortezomib εμφανίζονται να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το είδος του ουροθηλιακού καρκινικού κυττάρου που κατά περίπτωση εκτίθεται στο φάρμακο. Ειδικότερα, ενώ τα υψηλού βαθμού κακοήθειας III (T24) και IV (TCCSUP) κύτταρα χαρακτηρίζονται από στοιχεία υψηλής συστατικής αυτοφαγίας, γεγονός που επιτρέπει την -επιτυχή- υιοθέτηση του όρου «αυτοφαγικός εθισμός» (*“autophagy addiction”*), τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας I (RT4) και I-II (RT112) κύτταρα παρουσιάζονται με συγκριτικά χαμηλότερα βασικά επίπεδα έκφρασης αυτοφαγικών πρωτεϊνών. Είναι σαφές ότι η δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των Atg5, Atg7, Atg12 και Beclin-1 πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με την απουσία επαγωγής της LC3B-II μορφής, στα εκτεθειμένα στο Bortezomib T24 κύτταρα προσδίδει στην αυτοφαγία έναν ιδιαίτερο και διακριτό χαρακτήρα από αυτόν των TCCSUP κυττάρων. Φαίνεται ότι στην περίπτωση των T24 δεν είναι η επαγωγή αλλά η ισχυρή μειορρύθμιση κρίσιμων αυτοφαγικών συστατικών, μετά από έκθεση στο φάρμακο, που οδηγεί τα κύτταρα στον θάνατο, γεγονός που αναδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο του «αυτοφαγικού εθισμού» στην κυτταρική επιβίωση επιλεγμένων πληθυσμών καρκινικού ουροθηλίου υψηλού βαθμού κακοήθειας (III). Άρα, ενώ τα TCCSUP υπό τη δράση του Bortezomib πεθαίνουν μέσω συνδυαστικής εμπλοκής ενός ήπιου προγράμματος απόπτωσης και ενός ισχυρού μηχανισμού αυτοφαγίας, τα T24 κύτταρα

εξοντώνονται ως απόκριση στο φάρμακο μέσω ενεργοποίησης ενός ισχυρού αποπτωτικού προγράμματος και μίας σθεναρής μειορρυθμισής του μηχανισμού συστατικής αυτοφαγίας. Αντίθετα, η εντυπωσιακή και δοσο-εξαρτώμενη αυξορρυθμιση όλων των αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα RT112, μετά από έκθεση στο Bortezomib, αποδεικνύει τον κρίσιμο καθοριστικό ρόλο της -επαγόμενης- αυτοφαγίας στην χημειοθεραπευτική δυναμική του φαρμάκου, με τρόπο που να υποδεικνύει τον συνεργατικό ρόλο απόπτωσης και αυτοφαγίας στην τελική φαρμακο-επαγόμενη καταστροφή του κακοήθους ουροθηλίου. Η συγκριτικά μικρότερη κυτταροτοξική απόκριση των RT4 κυττάρων (ως προς τα RT112), μετά τη χορήγηση Bortezomib, θα μπορούσε να συσχετισθεί, εκτός από το διακριτό αποπτωτικό προφίλ, και με το λιγότερο ισχυρό πρότυπο επαγόμενης αυτοφαγίας στη δράση του φαρμάκου. Με άλλα λόγια, τα RT112 εμφανίζουν μία συγκριτικά (με τα RT4) υψηλότερη ευαισθησία στο Bortezomib επειδή μπορούν και ενεργοποιούν ισχυρά και, πιθανότατα, συνεργαζόμενα προγράμματα αποπτωτικού και αυτοφαγικού θανάτου, ενώ τα RT4 κύτταρα κινητοποιούν έντονα αποπτωτικά φαινόμενα αλλά σχετικά ηπιότερες αυτοφαγικές επαγωγές ως απόκριση στο Bortezomib. Συμπερασματικά, είναι εντυπωσιακό ότι ανάλογα με το εκάστοτε κυτταρικό περιβάλλον, το κακοήθες ουροθήλιο μπορεί και επιλέγει διαφορετικούς τρόπους διαχείρισης της αυτοφαγίας για να οδηγήσει τα προσβεβλημένα, από το στρες του Bortezomib, κύτταρα στον θάνατο. Αυτό, βέβαια, δεν αποκλείει το -εναλλακτικό- ενδεχόμενο η εμπλοκή της αυτοφαγίας να έχει αντισταθμιστικό ρόλο, στην προσπάθεια του προσβεβλημένου κυττάρου να απομακρύνει και αποτοξινώσει το υψηλό φορτίο (*load*) ουμπικουϊτινιωμένων πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (*aggregates*) που δημιουργούνται και αθροίζονται από την φαρμακο-επαγόμενη απώλεια λειτουργίας του πρωτεασώματος.

Η ικανότητα του Bortezomib να προκαλεί αποπτωτικό θάνατο έχει αναφερθεί και σε άλλες μορφές ανθρώπινης κακοήθειας, με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτές των γαστρεντερικών όγκων και του νευροβλαστώματος [544, 545], ενώ κύτταρα μελανώματος φάνηκαν να υπόκεινται σε σύγχρονους μηχανισμούς αποπτωτικού και αυτοφαγικού θανάτου χωρίς όμως να προσδιορίζεται ο προωθητικός ή αντισταθμιστικός ρόλος της αυτοφαγίας στο κυτταροτοξικό δυναμικό του Bortezomib [546]. Παρομοίως, πρόσφατη αναφορά αποκαλύπτει τη δυνατότητα του φαρμάκου να επάγει ισχυρά τη λειτουργία της αυτοφαγικής μηχανής χωρίς όμως να



μπορεί να της αποδώσει τον ακριβή «προ-θανάτιο» (“*pro-death*”) ή «προ-επιβίωσαντα» (“*pro-survival*”) ρόλο [547]. Πράγματι, έχει φανεί ότι αν και η υπερ-ενεργοποίηση της αυτοφαγίας είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά διαφορετικών τύπων ανθρώπινου καρκίνου, η αναστολή της μπορεί να οδηγήσει είτε σε αυξημένο θάνατο είτε σε αυξημένη επιβίωση, ανάλογα με τον ιστοειδικό τύπο, τον βαθμό κακοήθειας και το -επακόλουθο- χημειοθεραπευτικό πρωτόκολλο αντιμετώπισης της νόσου [221, 276]. Ως εκ τούτου, ανάλογα με τον προσδιορισθέντα προαγωγικό ή προστατευτικό, έναντι της εκάστοτε μορφής στρες (Bortezomib), ρόλο της αυτοφαγίας [258], μπορούν να επιλεγθούν ειδικοί επαγωγείς (*inducers*) ή αναστολείς (*inhibitors*) αυτής, με σκοπό την ανάπτυξη περισσότερο στοχευμένων και ακόμα πιο αποδοτικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Συμπερασματικά, λοιπόν, θα μπορούσαν να διακριθούν δύο μορφές αυτοφαγίας στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο: (Α) η επαγόμενη μορφή, η οποία ενεργοποιείται από την απώλεια λειτουργίας του πρωτεασώματος, και στόχο έχει είτε να οδηγεί τα κύτταρα στον θάνατο είτε να εξισορροπεί το υψηλό φορτίο ουμικουϊτινωμένων πρωτεϊνικών -τοξικών- συσσωματωμάτων, μέσω εκλεκτικής αποικοδόμησης αυτών στα αυτοφαγοσώματα [257], και (Β) η -υψηλού επιπέδου έκφρασης- συστατική μορφή, η οποία μειορρυθμίζεται ισχυρά παρουσία φαρμάκου, και ενδεχομένως συσχετίζεται με τη διατήρηση της εύρυθμης μιτοχονδριακής λειτουργίας, καθώς και με τα υψηλά επίπεδα βασικού μεταβολισμού του κυττάρου, ενώ εμφανίζεται να εξαρτάται στενά από την παρουσία της ογκογόνου δράσης του ενεργοποιημένου Ras σηματοδότη [257, 548]. Σε συμφωνία, και δεδομένου ότι τα T24 κύτταρα φέρουν το μεταλλαγμένο H-Ras<sup>G12V</sup> ενεργοποιημένο ογκογονίδιο, τα παρατηρούμενα υψηλά επίπεδα συστατικής αυτοφαγίας θα πρέπει να συνδέονται άρρηκτα με την κλωνική απόκτηση της εν λόγω μεταλλαγής, με τρόπο που ο «αυτοφαγικός εθισμός» να οδηγεί και να υποστηρίζει τον «σηματοδοτικό εθισμό», και αντίστροφα.

Παρ’ όλα αυτά, η συνεργατική και συγκλίνουσα κυτταροτοξική δράση απόπτωσης και αυτοφαγίας (στα RT4, RT112 και TCCSUP), υπό συνθήκες αναστολής του ουροθηλιακού πρωτεασώματος, θα μπορούσε εν δυνάμει να αντανάκλαται και στην ικανότητα σύνδεσης της Κασπάσης-8 στα δομικά συστατικά της αυτοφαγοσωμικής μεμβράνης, και στην επακόλουθη αυτο-πρωτεόλυση και ενεργοποίηση αυτής (Κασπάσης-8), μέσω μηχανισμού διαμοριακής γειννίας, όπως

έχει σχετικά πρόσφατα αναφερθεί στα HeLa καρκινικά κύτταρα [549]. Το ενδιαφέρον στην εν λόγω μελέτη είναι η ενεργοποίηση της Κασπάσης-8 τόσο με απουσία εμπλοκής διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου, και ομοειδών συνδετών αυτών (*death ligands*), όσο και με απαίτηση επαγωγής αυτοφαγίας καθώς και παρουσίας του Atg5 κρίσιμου αυτοφαγικού ρυθμιστή.

Ο δόσο-εξαρτώμενος σχηματισμός υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνικών και ουμπικουϊτινωμένων συσσωματωμάτων και στους τέσσερις (4), υπό εξέταση, κυτταρικούς τύπους, σε συνδυασμό με την ισχυρή απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος στα RT4 και T24 κύτταρα, αποδεικνύουν την ικανότητα του Bortezomib να αναστέλλει δραματικά την συνολική λειτουργική ακεραιότητα και επάρκεια του ουροθηλιακού πρωτεασώματος, και να οδηγεί στην υπερ-φόρτωση των κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου με τοξικού τύπου πρωτεϊνικά -ουμπικουϊτινωμένα- συσσωματώματα, τα οποία ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την πρωτογενή κυτταροτοξική ισχύ του φαρμάκου. Αν και το ποσοστό, ανά χρονική στιγμή ζωής του κυττάρου, των ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών καθορίζεται από την σχετική ενεργότητα των λιγασών ουμπικουϊτίνης (*ubiquitin ligases*) και των απο-ουμπικουϊτινινασών (*DUBs: deubiquitinases*) [365, 543], φαίνεται ότι στο κακόηθες ουροθήλιο η ισχυρή ικανότητα του Bortezomib να προάγει την απουσία αποικοδόμησης κρίσιμων ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών στόχων δεν μπορεί να αντισταθμιστεί επιτυχώς από την όποια ενεργότητα απο-ουμπικουϊτινίωσης των αντίστοιχων ενζύμων της υπερ-οικογένειας. Παρ' ότι δεν μπορούμε να διακρίνουμε αν τα προερχόμενα από το Bortezomib συσσωματώματα του κακοήθους ουροθηλίου περιέχουν αλυσίδες ουμπικουϊτίνης συζευγμένες στη θέση λυσίνη 48 (K48) ή/και λυσίνη 63 (K63) της ομοειδούς πρωτεϊνικής αλυσίδας (Ub), είναι πιθανόν αυτές (οι αλυσίδες) να αναγνωρίζονται από την p62/SQSTM1 πρωτεΐνη-προσαρμογέα (*protein-adaptor*), η οποία αποτελεί τον ενδιάμεσο -χαμένο- κρίκο μεταξύ πρωτεϊνικής «συμπλοκοποίησης» και αυτοφαγίας [543]. Δηλαδή, η σύνδεση της p62 με τις ουμπικουϊτινωμένες αλυσίδες των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, όπως αυτά δημιουργούνται από τη δράση του Bortezomib στα RT4, RT112 και TCCSUP κύτταρα, θα μπορεί να οδηγεί στη στόχευση αυτών (συσσωματωμάτων) (μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης p62 και LC3) [543] στο αυτοφαγόσωμα και στην επακόλουθη αποικοδόμησή τους μέσω μηχανισμού «επιλεκτικής αυτοφαγίας» (“*selective autophagy*”). Μάλιστα, θα μπορούσε να είναι η

κυτταρο-ειδική αντιπροσώπευση και διαφορική συσσώρευση της ενεργού p62 πρωτεΐνης στους τέσσερις κυτταρικούς τύπους κακοήθους ουροθηλίου που σχετίζεται με την διαφορετικού βαθμού δημιουργία, αποικοδόμηση και επακόλουθη τοξική δράση ουμπικουϊτινωμένων συσσωματωμάτων σε αυτούς (τύπους). Ωστόσο, η δοσο-ειδική και υψηλού βαθμού συσσώρευση ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, σε συνδυασμό με την ισχυρή τοξική δράση του φαρμάκου στην κυτταρική επιβίωση, υποδεικνύουν είτε την αποτυχία της «επιλεκτικής αυτοφαγίας» να διασώζει τα κύτταρα, λόγω υπερβολικού τοξικού (ουμπικουϊτινωμένου) φορτίου, είτε την αδυναμία της επαγόμενης αυτοφαγίας να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο σε συνθήκες απώλειας λειτουργίας πρωτεασώματος, αλλά, αντίθετα, την ικανότητά της (αυτοφαγίας) να οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης στην καταστροφή και στην εξόντωση.

Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής εντοπίζεται στη δυνατότητα του Bortezomib να τροποποιεί την μεταγραφική δραστηριότητα προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων με αυστηρά γονιδιο-ειδικό τρόπο, χωρίς να προκαλεί γενικευμένη κατάρρευση της μεταγραφικής μηχανής. Ειδικότερα, αποκαλύφθηκε η δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της μεταγραφικής έκφρασης των FasL και DR4 (και DR5) συνδετών υποδοχέων θανάτου ως απόκριση της έκθεσης των RT4 κυττάρων στο Bortezomib, γεγονός που φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με το αποπτωτικό δυναμικό του εν λόγω φαρμάκου στο κακόηθες ουροθήλιο. Δηλαδή, η φαρμακο-επαγόμενη και ισχυρή αυξορρύθμιση των FasL και DR4 (και DR5) προ-αποπτωτικών γονιδίων, σε συνδυασμό με την δραματική μειορρύθμιση των Bcl-2 και cIAP-2 αντι-αποπτωτικών γονιδίων, θα μπορούσαν να αποτελούν κύριους αιτιακούς παράγοντες ενεργοποίησης του προγράμματος αποπτωτικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης μετά τη χορήγηση Bortezomib. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της Κασπάσης-8 ενδεχομένως συνιστά ένα κατωροϊκό αποπτωτικό γεγονός της σύνθεσης, έκκρισης και σύνδεσης του FasL στον ομοειδή υποδοχέα θανάτου Fas, μηχανισμός που υποστηρίζεται σθεναρά από τα παρόμοια πρότυπα δοσο-εξαρτώμενης αυξορρύθμισης της ενεργοποιημένης Κασπάσης-8 και του FasL RNA μεταγράφου στα εκτεθειμένα στο Bortezomib RT4 κύτταρα. Μάλιστα, ο έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας των εν λόγω γονιδίων κατά τη διάρκεια -ενδεχόμενης- χημειοθεραπευτικής αντιμετώπισης ουροθηλιακών κακοηθειών με βάση το

Bortezomib θα μπορούσε να αποτελεί ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο για την αξιολόγηση της απόκρισης και επιτυχούς εφαρμογής του συγκεκριμένου φαρμακολογικού πρωτοκόλλου. Είναι εντυπωσιακό ότι, αντίθετα με ότι έχει αναφερθεί σε κύτταρα γαστρεντερικών όγκων, όπου το Bortezomib καταστέλλει την ενεργότητα μεταγραφικής επιμήκυνσης (*transcriptional elongation*) της RNA πολυμεράσης II και προάγει τη μειορρύθμιση του CBP μεταγραφικού συν-ενεργοποιητή (*transcriptional co-activator*) [544], στο RT4 κυτταρικό περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου το εν λόγω φάρμακο διαφαίνεται να μην προκαλεί γενικευμένη κατάρρευση της μεταγραφικής μηχανής, όπως κανείς θα ανέμενε από την -αντίστοιχη- αναστολή δράσης της RNA πολυμεράσης II (και του CBP), αλλά να ελέγχει την μεταγραφική δραστηριότητα με απόλυτα γονιδιο-ειδικό τρόπο, επιτρέποντας, ως εκ τούτου, την κατά περίπτωση αυξορρύθμιση (*FasL*, *DR4* και *DR5*), μειορρύθμιση (*Bcl-2*, *cIAP-2* και *TRAIL*) και διατήρηση (*Mcl-1* και *GAPDH*) αυτής. Η απορρύθμιση αποικοδόμησης μέσω πρωτεασώματος μεταγραφικών ενεργοποιητών ή/και καταστολέων [544] με αυστηρά γονιδιο-ειδικό τρόπο θα μπορούσε πειστικά να δικαιολογήσει τα τρία (3) αποκτώμενα πρότυπα μεταγραφικής απόκρισης των RT4 ουροθηλιακών γονιδίων στην τοξική δράση του Bortezomib.

Η εξαρτώμενη από το Bortezomib επαγωγή των DR4 (και DR5) υποδοχέων θανάτου ως ενός σημαντικού παράγοντα ενίσχυσης της αποπτωτικής σηματοδότησης έχει αναφερθεί σε διαφορετικές περιπτώσεις κακοήθειας [451], με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό του ανθρώπινου γλοιώματος [550]. Παρ' όλα αυτά, ο ομοειδής TRAIL συνδέτης των DR4/5 υποδοχέων θανάτου αποδείχθηκε να καταστέλλεται μεταγραφικά με έναν ισχυρά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στα RT4 κύτταρα, απόκριση που πιθανότατα λειτουργεί αντισταθμιστικά στην υπερ-έκφραση των DR4/5 υποδοχέων. Εναλλακτικά, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι στο περιβάλλον πρωτεασωμικής ανεπάρκειας του κακοήθους ουροθηλίου η μεμβρανική συσσώματωση των DR4/5 υποδοχέων δύναται να κινητοποιεί αποπτωτικά σήματα απουσία του ομοειδούς συνδέτη TRAIL, ενδεχομένως λόγω απελευθέρωσης του συμπλόκου του υποδοχέα από μηχανισμούς αυτο- ή ετερο-καταστολής. Με άλλα λόγια, αναφερόμαστε σε ένα TRAIL-ανεξάρτητο και DR4/5-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι, το οποίο μπορεί και κινητοποιείται εκλεκτικά μόνο στις περιπτώσεις λειτουργικής απώλειας του πρωτεασώματος στο περιβάλλον του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η δυνατότητα του DR5 υποδοχέα να

«εσωτερικοποιείται» (“*internalized*”) σε ενδοσώματα (*endosomes*) παρουσία TRAIL και να ουμπικουϊτινιώνεται όταν υπερ-εκφράζεται [551], υποδεικνύει την ενδεχόμενη απελευθέρωση της αποπτωτικής του (DR5) δυναμικής απουσία TRAIL (διαφυγή «εσωτερικοποίησης») και παρουσία Bortezomib (δομική σταθεροποίηση, μεταγραφική ενεργοποίηση και μεμβρανική συσσώρευση) στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο. Η αδυναμία ανίχνευσης *TRAIL* RNA μεταγράφου στα T24 κύτταρα συνάδει στο εν λόγω μοντέλο της μη-συμμετοχής αυτού (TRAIL) στον προερχόμενο εκ του Bortezomib αποπτωτικό θάνατο του κακοήθους ουροθηλίου. Παρόμοια αποτελέσματα δραματικής μείωσης των *TRAIL* RNA επιπέδων έκφρασης έχουν αναφερθεί και στα UM-UC-3 κύτταρα καρκίνου ουροδόχου κύστης ως απόκριση στο Bortezomib [552], γεγονός που ενδεικνύει την γενικευμένη και ισχυρή ικανότητα του φαρμάκου να καταστέλλει την έκφραση και εμφάνιση του TRAIL αποπτωτικού ρυθμιστή. Στην κατεύθυνση αυτή, ιδιαίτερο μηχανιστικό αλλά και κλινικό ενδιαφέρον αποκτά η συνεργιστική δράση των Bortezomib και TRAIL στην κυτταρική εξόντωση, μέσω αυξορρύθμισης των επιπέδων έκφρασης των DR4 και DR5 υποδοχέων [451, 550, 551]. Η υψηλή αποδοτικότητα του εν λόγω φαρμακολογικού κοκτέιλ θα μπορούσε να αποδίδεται στην αντισταθμιστική δράση του εξωγενώς χορηγούμενου TRAIL ως προς την ικανότητα του Bortezomib να καταστέλλει την ενδογενή σύνθεση TRAIL, ενώ συγχρόνως να μπορεί να επάγει την έκφραση των DR4/5 ομοειδών υποδοχέων θανάτου. Με άλλα λόγια, η μειορρύθμιση του «κυτταρικού» TRAIL από το Bortezomib θα μπορούσε να εξισορροπείται από το TRAIL του φαρμακολογικού σχήματος, το οποίον τώρα συνδέεται στους DR4/5 υποδοχείς, όπως αυτοί συσσωρεύονται στην μεμβράνη μετά τη δράση του φαρμάκου. Ως εκ τούτου, μία Bortezomib-TRAIL θεραπευτική πλατφόρμα θα μπορούσε να αποτελεί ένα ισχυρό, ασφαλές και επιτυχημένο κλινικό εργαλείο αντιμετώπισης του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Μία από τις πλέον εντυπωσιακές αποκρίσεις των κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου στη δράση του Bortezomib αντιπροσωπεύεται από την δοσο-εξαρτώμενη και κυτταρο-ειδική ισχυρή επαγωγή γονιδιωματικής τοξικότητας, όπως αυτή αντανακλάται στην αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη θέση σερίνη 139 (*Ser*<sup>139</sup>) H2AX ιστόνης, η οποία αποτελεί ουσιαστικά και τον μοριακό μάρτυρα ανίχνευσης δίκλωνων θραυσμάτων DNA υπό συνθήκες κυτταρικού στρες [466]. Δεδομένου ότι και στους τέσσερις (4) υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους

(RT4, RT112, T24 και TCCSUP) τα δοσο-ειδικά και φαρμακο-επαγόμενα πρότυπα συσσώρευσης της p-H2AX-Ser<sup>139</sup> πρωτεΐνης αποδείχθηκαν να ταυτίζονται με τα αντίστοιχα του σχηματισμού ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, επιτρέπεται η διαμόρφωση ενός μηχανιστικού μοντέλου, όπου η αναστολή του πρωτεασώματος προκαλεί πρωτογενώς την -τοξική- συσσώρευση ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες τώρα -δευτερογενώς- δύνανται να επάγουν ισχυρή γονιδιωματική τοξικότητα με τη μορφή δίκλωνων θραύσεων DNA, όπως έχει αναφερθεί και στην περίπτωση κυττάρων γαστρεντερικού όγκου μετά από χορήγηση Bortezomib [544].

Προς μεγάλη έκπληξη, αλλά και ενδιαφέρον, το Bortezomib αποκαλύπτεται ικανό να σταθεροποιεί και να ενεργοποιεί τον p53 μεταγραφικό παράγοντα, έναν καθοριστικό αισθητήρα (*sensor*) και «σηματοδοτικό φύλακα» (“*signaling guardian*”) της δομικής ακεραιότητας του γονιδιώματος, αποκλειστικά στα RT4 και όχι στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές κακοήθους ουροθηλίου (RT112, T24 και TCCSUP) που εξετάστηκαν. Η φαρμακο-ειδική φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης στις θέσεις σερίνη 15 και σερίνη 37 συσχετίζεται άμεσα με έναν μηχανισμό ανίχνευσης καταστροφής πυρηνικού DNA, ενώ η φωσφορυλίωση στη σερίνη 392 αντανάκλα τη δυνατότητα σταθεροποίησης προ-σχηματισμένων τετραμερών συμπλόκων και ενδυνάμωσης της μεταγραφικής δραστηριότητας αυτών, τελικό αποτέλεσμα των οποίων είναι η καθοριστική εμπλοκή της p53 πρωτεΐνης σε ένα ισχυρό πρόγραμμα απόπτωσης του κακοήθους ουροθηλίου. Σε ότι αφορά στα RT4 και μόνο, και με βάση την ισχύουσα δημοσιευμένη γνώση [365, 380], η προκαλούμενη από την καταστροφή του γονιδιωματικού DNA (μέσω Bortezomib) ενεργοποίηση του ATM/ATR/DNA-PK συστήματος κινασών σερίνης/θρεονίνης θα μπορούσε, στο περιβάλλον του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης, να φωσφορυλιώνει την p53 πρωτεΐνη στα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης 15 και 37, ενώ συγχρόνως να προάγει, λόγω ειδικής φωσφορυλίωσης, την αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος, του MDM2 αρνητικού ρυθμιστή, μίας καθοριστικής λιγάσης ουμπικουϊτίνης της p53 πρωτεΐνης, το γονίδιο της οποίας (*MDM2*) αποτελεί κρίσιμο στόχο του p53 μεταγραφικού παράγοντα. Η φαρμακο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση των MDM2 επιπέδων έκφρασης στα RT4 κύτταρα συνάδει άριστα με την αστάθεια της πρωτεΐνης σε συνθήκες ηρεμίας, λόγω αυτο-ουμπικουϊτινώσεως, και την διαδοχική -δοσο-ειδική- συσσώρευση της ουμπικουϊτινωμένης μορφής παρουσία Bortezomib. Η πρωτεϊνική

MDM2-like ισομορφή των 60 kDa, πιθανό προϊόν πρωτεολυτικής επεξεργασίας (ή εναλλακτικού ματίσματος), θα μπορούσε να περιέχει αλλοιωμένες ενεργότητες λιγάσης ουμπικουϊτίνης, οι οποίες, ενδεχομένως, να σχετίζονται με τα υψηλά ποσοστά ανιχνεύσιμης ουμπικουϊτινίωσης της p-p53-Ser<sup>37</sup> μορφής. Εναλλακτικά, θα ήταν δυνατόν η φωσφορυλιωμένη, σταθεροποιημένη και ενεργοποιημένη, από το Bortezomib, p53 πρωτεΐνη να επάγει την μεταγραφική έκφραση του *MDM2* γονιδίου στόχου και τελικά να οδηγήσει στη συσσώρευση του ομοειδούς πρωτεϊνικού προϊόντος στα RT4 κύτταρα. Οι επαγόμενες από το Bortezomib p-p53-Ser<sup>37</sup> πρωτεΐνες με αντίστοιχα μοριακά βάρη 63 και 78 kDa πιθανότατα αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μορφές ουμπικουϊτινίωσης (μονο- και τρι-ουμπικουϊτινίωσης, αντίστοιχα), με αυτή των 78 kDa να χρήζει περαιτέρω μελέτης λόγω του ισχυρού χαρακτήρα αυξορρυθμισής της. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 37 θα μπορούσε να δημιουργεί μία ειδική χωροταξική διαμόρφωση που να ευνοεί ενεργειακά και μηχανιστικά την μονο-/τρι-ουμπικουϊτινίωση της p53 πρωτεΐνης, αποτέλεσμα των οποίων θα ήταν η ενίσχυση του αποπτωτικού ρόλου αυτής (p53) στο κακόηθες ουροθήλιο. Όπως, μάλιστα, έχει αναφερθεί, η μονο-ουμπικουϊτινίωση της p53 σε απόκριση στο στρες συσχετίζεται άρρηκτα με την μετακίνηση αυτής στο μιτοχόνδριο και την ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασής της (p53) με μέλη της Bcl-2 υπερ-οικογένειας [380].

Ωστόσο, αποδεικνύεται η αδυναμία της p53 να συμμετέχει καθοριστικά στην κυτταροτοξική ενεργότητα του Bortezomib σε όλους τους τύπους κακοήθους ουροθηλίου, όπως διαφαίνεται από την απουσία φωσφορυλίωσης και σταθεροποίησης αυτής (p53), ως απόκριση στο φάρμακο, στις υπόλοιπες -υπό εξέταση- τρεις κυτταρικές σειρές (RT112, T24 και TCCSUP). Σε συμφωνία, αθροιστικά βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν επισημάνει ότι η αυξορρύθμιση της p53 πρωτεΐνης μετά από έκθεση κυττάρων στο Bortezomib δεν αποτελεί ένα γενικού χαρακτήρα μοριακό γεγονός, αλλά μία ειδική απόκριση που φαίνεται να εξαρτάται από το εκάστοτε κυτταρικό περιβάλλον, γενετικό προφίλ και είδος του εφαρμοζόμενου στρες [380, 553]. Παρ' όλα αυτά, η αδυναμία ενεργοποίησης της p53 στα T24 και TCCSUP κύτταρα θα μπορούσε να σχετίζεται στενά με τις, αντίστοιχες, ενδογενείς μεταλλαγμένες -και λειτουργικά αδρανείς- μορφές αυτής, ενώ η φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη στα RT112, αν και εν δυνάμει λειτουργική, λόγω διακριτών και ανεξάρτητων του πρωτεασώματος μηχανισμών (όπως για παράδειγμα, υπερ-

ενεργοποίηση αυτοφαγίας) εμφανίζεται, πάλι, ανίκανη να συσσωρευθεί και να οδηγήσει τα κύτταρα στον αποπτωτικό θάνατο. Συμπερασματικά, λοιπόν, αποκαλύπτεται η αυστηρά κυτταρο-ειδική και μη-γενικευμένη εμπλοκή του ενεργοποιημένου p53 μεταγραφικού παράγοντα στον αποπτωτικό θάνατο του κακοήθους ουροθηλίου, ως απόκριση στην απώλεια λειτουργίας του πρωτεασώματος.

Είναι πραγματικά εντυπωσιακό ότι ενώ το ρεπερτόριο των Κασπασών και των ομοειδών τους υποστρωμάτων εμφανίζεται ποιοτικά παρόμοιο (διατηρώντας πάντα τον κυτταρο-ειδικό τους χαρακτήρα) σε όλους τους -υπό μελέτη- κυτταρικούς τύπους, μετά τη χορήγηση Bortezomib, τα πρότυπα έκφρασης των Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, cIAP-1, Survivin και Livin αντι-αποπτωτικών ρυθμιστών παρουσιάζονται με έναν αυστηρά κυτταρο-ειδικό χαρακτήρα, ο οποίος φαίνεται να εξαρτάται από το πρωτεωμικό περιβάλλον και την γενετική σύσταση της εκάστοτε καρκινικής ουροθηλιακής σειράς. Ως εκ τούτου, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η ευπάθεια του κάθε, υπό εξέταση, είδους καρκινικού κυττάρου στο φάρμακο ρυθμίζεται όχι από μεμονωμένες αλλά από συνδυαστικές και πολυ-παραγοντικές αποκρίσεις που περιλαμβάνουν είτε αυξορρύθμιση είτε μειορρύθμιση της συσσώρευσης και δράσης του εκάστοτε αποπτωτικού αναστολέα. Παρ' όλα αυτά, εκτός από τα κυτταρο-ειδικά πρότυπα, ανιχνεύονται και ανεξάρτητες από τον κυτταρικό τύπο μοριακές αποκρίσεις, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή μίας μονο- ή δι-ουμπικουϊτινωμένης μορφής της XIAP πρωτεΐνης, της οποίας ο σχηματισμός ενδέχεται να ελέγχει καταλυτικά την ενεργοποίηση ενός ισχυρού αποπτωτικού προγράμματος σε όλους τους τύπους του καρκινικού ουροθηλίου. Ειδικότερα, η μέσω του Bortezomib προκαλούμενη ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της XIAP-like ουμπικουϊτινωμένης πρωτεΐνης των 65 kDa, η οποία πιθανότατα χαρακτηρίζεται από δραματικά μειωμένη ικανότητα αναστολής της ενεργού Κασπάσης-3 και -7, θα μπορούσε να αποτελεί μία από τις πρωτογενείς αιτίες κυτταρο-ανεξάρτητης τοξικότητας του φαρμάκου στο κακόηθες ουροθήλιο. Επιπρόσθετα, η δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση του (μη-ουμπικουϊτινωμένου) XIAP αναστολέα στα RT4 και, κυρίως, στα T24 κύτταρα φαίνεται να συνεπικουρεί στην εξαρτώμενη από την αδρανοποίηση του XIAP ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών. Τόσο η δυνατότητα του XIAP να (αυτο-)ουμπικουϊτινώνεται *in vivo* [381], όσο και να μειορρυθμίζεται σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος και Hodgkin λεμφώματος παρουσία Bortezomib



[554, 555], αποδεικνύει την γενικότερη καθοριστική εμπλοκή αυτού (XIAP) στην κινητοποίηση του αποπτωτικού θανάτου -εν δυνάμει- σε όλα τα κυτταρικά περιβάλλοντα με λειτουργικά ανεπαρκές πρωτεάσωμα. Αντίθετα, όπως ανιχνεύεται και σε κύτταρα Hodgkin λεμφώματος [555], ο cIAP-1 αποπτωτικός αναστολέας εμφανίζεται ανεπηρέαστος στα T24 και TCCSUP, ενώ η κυτταρο-ειδική και δοσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση αυτού στα RT4 κύτταρα ενδεχομένως προάγει την σχετική -και συγκριτικά υψηλότερη- ανθεκτικότητα αυτών στο Bortezomib. Η χαμηλότερου μοριακού βάρους cIAP-1-like πρωτεΐνη των 45 kDa θα μπορούσε να υποστηρίξει την κυτταρική επιβίωση των RT4 μέσω υψηλότερης -συστατικής- ενεργότητας αναστολής Κασπάσης.

Συνεπώς, φαίνεται, ότι οι αποκρίσεις των αποπτωτικών αναστολέων μπορούν να τυποποιηθούν σε δύο διακριτές κατηγορίες: (Α) στις προαγωγικές (*promoting*) και (Β) στις αντισταθμιστικές (*counterbalanced*) για τον κυτταρικό θάνατο αποκρίσεις, με την καθεμία εξ αυτών να παρουσιάζει αυστηρή κυτταρο-ειδική εξειδίκευση, με τρόπο ώστε να συμμετέχει διαφορικά στον τελικό φαινότυπο του αποπτωτικού θανάτου του κακοήθους ουροθηλίου. Ειδικότερα, για τον αποπτωτικό θάνατο των T24 κυττάρων αποκαλύπτεται να ενοχοποιούνται προαγωγικά η φαρμακο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> και XIAP αναστολέων, και αντισταθμιστικά η αυξορρύθμιση της Survivin (16 kDa), με απουσία συμμετοχής των cIAP-1 και Livin πρωτεϊνών. Αντίθετα, στο κυτταρικό περιβάλλον των RT4, οι Bcl-X<sub>L</sub> και Livin [και cIAP-1 (62 kDa)] αναστολείς ανιχνεύονται να εκτελούν αντισταθμιστικό έργο (όπως τεκμαίρεται από την δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή τους), ενώ το κύριο τμήμα του αποπτωτικού προγράμματος καθοδηγείται από τη μειορρύθμιση των Bcl-2 και Survivin (16 kDa) [και XIAP (53 kDa)] πρωτεϊνών. Τουλάχιστον, σε ότι αφορά στα RT4 κύτταρα, και μόνο, διαφαίνεται ο κρίσιμος ρόλος της μειορρύθμισης της Survivin (16 kDa) στην φαρμακο-επαγόμενη απόπτωση αυτών, όπως έχει, επίσης, αναφερθεί σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος παρουσία Bortezomib [556]. Η συγκριτικά υψηλότερη -σχετική- ανοχή των TCCSUP στο φάρμακο πιθανότατα προέρχεται από τα ουσιαστικά ανεπηρέαστα επίπεδα έκφρασης των Bcl-X<sub>L</sub> και cIAP-1 [και XIAP (53 kDa)] πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με την δοσο-εξαρτώμενη -αντισταθμιστική- αυξορρύθμιση του Survivin (16 kDa) αναστολέα. Ως εκ τούτου, υποδεικνύεται -αφαιρετικά- ο καθοριστικός ρόλος της Livin πρωτεΐνης, η απουσία της οποίας σε συνθήκες πρωτεασωμικής αναστολής μπορεί και προάγει τον

αποπτωτικό θάνατο. Όμως, τα RT112 κύτταρα παρόλο που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλή κυτταροτοξική ευαισθησία στο Bortezomib, φέρονται να εμπεριέχουν σημαντικές αντισταθμιστικές λειτουργίες, οι οποίες διαμορφώνονται αθροιστικά από την δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή των επιπέδων έκφρασης των Bcl-X<sub>L</sub>, Survivin (16 kDa) και Livin, γεγονός που, αναγκαστικά (αφαιρετικά), αναδεικνύει τον θεμελιώδη ρόλο της ουμπικουϊτινωμένης XIAP-like (65 kDa) μορφής στην αποπτωτική εξόντωση των εν λόγω κυττάρων παρουσία του φαρμάκου. Με άλλα λόγια, όλες οι, υπό εξέταση, κυτταρικές σειρές του κακοήθους ουροθηλίου υπόκεινται σε αποπτωτικό θάνατο, παρουσία Bortezomib, κυρίως μέσω της XIAP-like ουμπικουϊτινωμένης μορφής (65 kDa), ενώ τα επιμέρους και κατά περίπτωση διαφορεικά επίπεδα ευπάθειας αυτών (σειρών) καθοδηγούνται από την κυτταρο-ειδική και συνδυαστική συμμετοχή των υπολοίπων αποπτωτικών αναστολέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υψηλού μοριακού βάρους και, ενδεχομένως, εξι(6)-ουμπικουϊτινωμένη μορφή της Survivin (70 kDa) πρωτεΐνης, η οποία ενώ στα χαμηλής κακοήθειας RT4 και RT112 κύτταρα εμφανίζει ισχυρή δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή, στα υψηλής κακοήθειας T24 και TCCSUP κύτταρα ακολουθεί σαφή μειορρύθμιση ως απόκριση στο φάρμακο. Παρ' όλα αυτά, οι δύο εν λόγω τυποποιημένες αποκρίσεις του Survivin αναστολέα δεν συσχετίζονται με τα αντίστοιχα επίπεδα κυτταροτοξικής ευπάθειας της εκάστοτε κυτταρικής σειράς στο Bortezomib, γεγονός που υποδεικνύει την διαφορεική λειτουργία [ενδεχομένως, μέσω ουμπικουϊτινώσεως σε διαφορετική θέση (K<sup>48</sup> ή K<sup>63</sup>)] της κάθε Survivin-like ουμπικουϊτινωμένης ισομορφής στο κατά περίπτωση διακριτό περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου. Για παράδειγμα, η ουμπικουϊτινωμένη Survivin (70 kDa) πρωτεΐνη θα μπορούσε να κατέχει αντισταθμιστικές δράσεις στα RT4 και προαγωγικές ενεργότητες θανάτου στα RT112 κύτταρα παρουσία Bortezomib. Παρόμοιοι μηχανισμοί αντισταθμιστικής απόκρισης στην κυτταροτοξική ισχύ του Bortezomib έχουν αναφερθεί και σε κύτταρα ανθρώπινου λεμφώματος, όπου η αναστολή του πρωτεασώματος μπορεί και επάγει ισχυρά την έκφραση του Mcl-1 αντι-αποπτωτικού ρυθμιστή με έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο [557]. Η ενοχοποίηση παραγωγής ενεργών (ελεύθερων) ριζών οξυγόνου (ROS: *reactive oxygen species*) στην εν λόγω μελέτη υποδεικνύει την πιθανότητα καθοριστικής συμμετοχής αυτών (ROS) και στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης υπό συνθήκες πρωτεασωμικής ανεπάρκειας.

Ένα από τα κύρια ευρήματα της παρούσας μελέτης εστιάζεται στην ανάπτυξη συνδυαστικών φαινομένων «αυτοφαγικού εθισμού», «πρωτεασωμικού εθισμού» και «σηματοδοτικού εθισμού» στα υψηλής αλλά όχι στα χαμηλής κακοήθειας κύτταρα του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Για παράδειγμα, τα υψηλά συστατικά επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας φαίνεται να σχετίζονται στενά με τα υψηλά συστατικά επίπεδα φωσφορυλίωσης, και άρα ενεργοποίησης, κρίσιμων κινασών σερίνης/θρεονίνης στα T24 κύτταρα, γεγονός που ενδεχομένως αποτελεί βασική προϋπόθεση για την απόκτηση του υψηλού βαθμού κακοήθειας και μεταστατικότητας αυτών (T24). Πολύ πρόσφατες αναφορές αποκαλύπτουν την απαίτηση μονο-ουμπικουϊτινίωσης της Ras πρωτεΐνης για ενεργοποίηση του ομοειδούς μονοπατιού σηματοδότησης (Ras/Raf/MEK/ERK), μέσω μείωσης της ευπάθειας αυτής (Ras) στην προκαλούμενη από τις GAP (*GTPase-activating protein*) πρωτεΐνες υδρόλυση του GTP, και επομένως συνεχή διατήρηση της Ras-GTP μορφής στην ενεργό κατάσταση [558]. Ως εκ τούτου, είναι σαφές ότι τόσο τα βασικά επίπεδα όσο και οι επαγόμενες αποκρίσεις ενεργότητας κρίσιμων κινασών σερίνης/θρεονίνης θα πρέπει να ελέγχουν με καθοριστικό και συνδυαστικό τρόπο, σε σχέση με την ανά κυτταρική σειρά κακοήθους ουροθηλίου ευαισθησία, την τοξική δράση του Bortezomib. Όμως, δεδομένης της ταυτόχρονης ύπαρξης προαγωγικών και αντισταθμιστικών αποκρίσεων θανάτου στην έκθεση στο φάρμακο, η αξιολόγηση της συμμετοχής του κάθε σηματοδοτικού μονοπατιού στον φαρμακο-επαγόμενο κυτταροτοξικό φαινότυπο του καρκίνου της ουροδόχου κύστης δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά περίπτωση και απομονωμένα, αλλά μέσω μίας συστημικής και δικτυακής προσέγγισης, με τρόπο που η τελική ευαισθησία (ή μερική ανθεκτικότητα) θα προσδιορίζεται από το σύνολο των σηματοδοτικών διαταραχών όλων των υπό μελέτη ρυθμιστικών κινασών και ομοειδών μονοπατιών. Με άλλα λόγια, το αν η αυξορρύθμιση/μειορρύθμιση ή ο σχηματισμός μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικών ισομορφών, όπως αυτές δημιουργούνται, πιθανότατα, μέσω -στοχευμένης- διαφορικής πρωτεόλυσης (χωρίς να αποκλείεται το σενάριο εναλλακτικού ματίσματος), μετά από χορήγηση Bortezomib, κατέχουν προωθητικό ή αντισταθμιστικό ρόλο, μπορούν να τονιστούν επαρκώς μόνο υπό το πρίσμα της συνολικής και ολοκληρωμένης απόκρισης θανάτου του καθενός εκ των τεσσάρων (4), υπό εξέταση, κυτταρικών τύπων (RT4, RT112, T24 και TCCSUP).

Η συγκριτικά υψηλότερη ανθεκτικότητα των TCCSUP κυττάρων φαίνεται να οφείλεται στην ισχυρή επαγωγή της φωσφορυλιωμένης GSK-3β κινάσης, σε συνδυασμό με την ιδιαίτερα ισχνή αυξορρύθμιση της ενεργού p38 MAPK κινάσης και με τη διατήρηση της ενεργού Akt κινάσης σε -ουσιαστικά- άθικτη μορφή. Αντίθετα, η δόσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση της ενεργού p44/42 MAPK κινάσης φαίνεται να συμμετέχει καθοριστικά στον θάνατο, ενώ η επαγωγή έκφρασης της ενεργού AMPKα κινάσης θα μπορούσε και αυτή να κατέχει ισχυρή αντισταθμιστική δράση. Όσον αφορά στα RT112, τα κύτταρα με την σχετικά υψηλότερη παρατηρούμενη ευπάθεια στο Bortezomib, θα πρέπει να είναι η ακρωτηριασμένη μορφή της Akt, η μέτρια επαγωγή της ενεργού GSK-3β κινάσης, η ισχυρή αυξορρύθμιση της ενεργού p38 MAPK κινάσης, η αδυναμία σθεναρής ενεργοποίησης της p44/42 MAPK κινάσης και η καταστολή δράσης της AMPKα κινάσης, μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής λειτουργικής ανάδρασης του πρωτεολυτικού θραύσματος (χωρίς να αποκλείεται το σενάριο εναλλακτικού ματίσματος) των 58 kDa αυτής, που συνδυαστικά προσδίδουν στα εν λόγω κύτταρα την παρατηρούμενη ευαισθησία στη δράση του φαρμάκου. Τα T24, κύτταρα με -συγκριτικά- ασθενώς ανθεκτικότερο από τα RT112 φαινότυπο στον εν λόγω χημειοθεραπευτικό παράγοντα, χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα «σηματοδοτικού εθισμού» των Akt, GSK-3β, p44/42 MAPK, p38 MAPK και AMPKα ενεργοποιημένων κινασών, οι οποίες προφανώς συμμετέχουν καθοριστικά στην επιβίωση και ανάπτυξη αυτών (T24) σε συνθήκες ηρεμίας (απουσίας στρες), καθώς και στην απόκτηση του υψηλού βαθμού κακοήθειας (III) και μεταστατικότητας που τα χαρακτηρίζει. Ως εκ τούτου, αποδεικνύεται να είναι η ισχυρή και δόσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των ενεργών Akt και AMPKα κινασών, οι οποίες σε συνδυασμό με την επαγωγή έκφρασης της p38 MAPK ενεργού κινάσης μπορούν και οδηγούν τα κύτταρα στον θάνατο ως απόκριση στο Bortezomib. Η ανθεκτική στο φάρμακο διατήρηση της ενεργότητας των GSK-3β και p44/42 MAPK κινασών αποδεικνύει ότι οι εν λόγω ρυθμιστές δεν διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταροτοξική δυναμική του φαρμάκου στο T24 κυτταρικό περιβάλλον. Σε σχέση με τα RT4, τα δεύτερα συγκριτικά σε σειρά ανθεκτικότητας μετά τα TCCSUP κύτταρα, οι προαγωγικές στον θάνατο σηματοδοτικές δράσεις φαίνεται να περιλαμβάνουν την ισχυρή και δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της p38 MAPK ενεργού κινάσης, καθώς και τον φαρμακο-ειδικό σχηματισμό πρωτεολυτικών θραυσμάτων (χωρίς να αποκλείεται το σενάριο εναλλακτικού ματίσματος) των Akt και -ενεργού-

AMPKα κινασών, με ενδεχόμενες αρνητικά -επικρατείς- λειτουργικές ιδιότητες. Αντίθετα, η φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμιση των GSK-3β και p44/42 MAPK ενεργών κινασών φαίνεται ότι δρα αντισταθμιστικά, προσδίδοντας έτσι στα RT4 τον παρατηρούμενο φαινότυπο -συγκριτικά- υψηλότερης αντοχής στο Bortezomib. Συμπερασματικά, στο περιβάλλον του ανθρώπινου κακόηθους ουροθηλίου, υπό συνθήκες πρωτεασωμικής αδρανοποίησης, η p38 MAPK κινάση φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό προωθητικό ρόλο στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, ενώ η καθεμία από τις Akt, GSK-3β, p44/42 MAPK και AMPK κινάσες χαρακτηρίζεται από διακριτή αντισταθμιστική συμμετοχή στην προσπάθεια του κυττάρου να κινητοποιήσει εναλλακτικά μονοπάτια αποτοξίνωσης από το υψηλό φορτίο των ουμικουϊτινωμένων πρωτεϊνών. Το σύνολο των σηματοδοτικών αποκρίσεων μπορεί να διακριθεί σε δύο βασικές κατηγορίες: (Α) στην επαγόμενη μορφή, η οποία προσδιορίζεται από την αυξορρύθμιση -ενεργών- πρωτεϊνικών ισομορφών και ομοειδών θραυσμάτων αυτών και (Β) στην συστατική μορφή, η οποία είτε παραμένει ανεπηρέαστη είτε παρουσιάζεται να μειορρυθμίζεται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Ο συνδυασμός δράσης της -κατά περίπτωση- επαγόμενης και συστατικής σηματοδότησης είναι τελικά αυτός που προσδίδει στο εκάστοτε κακόηθες ουροθηλιακό περιβάλλον τον συγκεκριμένο φαινότυπο κυτταροτοξικής ευαισθησίας στη δράση του Bortezomib.

Η μειορρύθμιση της συστατικώς ενεργοποιημένης Akt κινάσης ως απόκριση της έκθεσης στο Bortezomib, σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (T24), έχει, επίσης, αναφερθεί σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, καθώς και σε αυτά καρκίνου του πνεύμονα [559, 560]. Δεδομένου ότι η εναρκτήρια Κασπάση-9 μπορεί και απενεργοποιείται τόσο από την Akt όσο και από τις p44/42 MAPK (ERK) κινάσες [561], είναι πιθανόν ότι η φαρμακο-επαγόμενη μειορρυθμισή τους [Akt (T24), αλλά και p44/42 MAPK (TCCSUP)] ρυθμίζει καταλυτικά την ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών στο κακόηθες ουροθήλιο. Η ισχυρή και δοσο-ειδική αυξορρύθμιση του -πιθανότατα- πρωτεολυτικού θραύσματος της -συνολικής- Akt κινάσης στα RT4 και RT112 κύτταρα θα μπορούσε επίσης να προκαλεί αποπτωτικό θάνατο, μέσω ενδεχόμενης κατασταλτικής στρατολόγησης και απομάκρυνσης από την φυσιολογική θέση δράσης (*squelching*) επιλεγμένων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, χωρίς αυτό να αποκλείει το σενάριο στοχευμένης φωσφορύλιωσης αποπτωτικών επαγωγέων και επακόλουθης ενεργοποίησης αυτών.

Σε ότι αφορά στην σηματοδοτική απόκριση της GSK-3β, κύτταρα πολλαπλού μυελώματος -σε αντίθεση με αυτά του κακοήθους ουροθηλίου (RT4, RT112 και TCCSUP)- αποκαλύφθηκαν να περιέχουν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης κινάσης παρουσία του φαρμάκου [562], γεγονός που υποδεικνύει την διαφορική κυτταρο-ειδική συμμετοχή της GSK-3β κινάσης στην χημειοθεραπευτική καταστροφή του όγκου. Εκτός από τη μειορρύθμιση της ενεργοποιημένης Akt σε κύτταρα ανθρώπινων παρεγκεφαλιδικών όγκων, η έκθεση στο Bortezomib αποκαλύφθηκε να προκαλεί την ενεργοποίηση των p44/42 MAPK κινασών, με τρόπο που η χρήση ειδικών αναστολέων αυτών (p44/42 MAPK) μπορούσε να προάγει συνεργατικά την αντι-καρκινική ισχύ του Bortezomib στα εν λόγω κύτταρα [563], υποδεικνύοντας έτσι τον προστατευτικό ρόλο αυτών (p44/42 MAPK). Αντιθέτως, στο κυτταρικό περιβάλλον ανθρώπινου καρκίνου του πνεύμονα η κυτταροτοξική ισχύς του φαρμάκου φάνηκε να συσχετίζεται με την υπερ-έκφραση του DR5 υποδοχέα θανάτου και την ενεργοποίηση των p44/42 MAPK κινασών [564]. Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι οι ενεργοποιημένες p44/42 MAPK κινάσες μπορούν και συμπεριφέρονται είτε αντισταθμιστικά [563] είτε προωθητικά [564] του αποπτωτικού θανάτου, εξαρτώμενες πάντα από το συνολικό κυτταρικό περιβάλλον που ανήκουν, ενώ υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν άρρηκτα τη μείωση της σηματοδοτικής δράσης των p44/42 MAPK κινασών με τον αποπτωτικό θάνατο ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων [565], γεγονός που συνάδει άριστα με τις σηματοδοτικές αποκρίσεις των TCCSUP κυττάρων παρουσία Bortezomib. Παρομοίως, η αποπτωτική ή αντι-αποπτωτική δράση της p38 MAPK κινάσης εμφανίζεται να εξαρτάται από τον εκάστοτε τύπο όγκου και σηματοδοτικό περιεχόμενο αυτού, όπως χαρακτηριστικά αποκαλύπτεται για την προαγωγική ενεργότητα θανάτου της εν λόγω κινάσης σε οισοφαγικά καρκινώματα [566] και την αντισταθμιστική της δυναμική -επιβίωσης- σε ανθρώπινους όγκους μαστού [567], ως απόκριση στο Bortezomib. Οι, εν δυνάμει, αποπτωτικές λειτουργίες της p38 MAPK κινάσης στο κακόηθες ουροθήλιο θα μπορούσαν να εμπλέκουν διακριτούς μεταγραφικούς και μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι αφορούν στη σύνθεση, δομική ακεραιότητα και ενεργότητα υποδοχέων θανάτου, μονοπατιών επιβίωσης και (προ-/αντι-αποπτωτικών) μελών της Bcl-2 υπερ-οικογένειας, όπως έχει αναφερθεί για άλλα κυτταρικά συστήματα [136]. Με ενδιαφέρον επισημαίνεται ότι όσον αφορά στην AMPK κινάση, και με βάση την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία,

είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζεται συσχέτιση σηματοδοτικής απόκρισης αυτής στην αναστολή του πρωτεασώματος. Για παράδειγμα, η προωθητική δράση θανάτου της μειορρυθμιζόμενης AMPK κινάσης, παρουσία Bortezomib, στα T24 κύτταρα θα μπορούσε να οδηγεί σε αδυναμία ανταπόκρισης αυτών (T24) στην εξασθένηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP [148], όπως αυτή (εξασθένηση) προκαλείται από το υψηλό φορτίο συσσωματωμένων και πολυ-ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών (η ενεργοποίηση της ουμπικουϊτίνης από το E1 ένζυμο απαιτεί υδρόλυση του ATP σε AMP και PPI [568]), γεγονός που προκαλεί γενικευμένη βιο-ενεργειακή κρίση και τελικά κυτταρική κατάρρευση.

Ένα άλλο επίπεδο αντισταθμιστικής ρύθμισης θανάτου θα μπορούσε να είναι αυτό της ενεργοποίησης του NFκB μονοπατιού σηματοδότησης, τα γονίδια στόχοι του οποίου παίζουν, εν γένει, κρίσιμο αντι-αποπτωτικό ρόλο [353]. Με βάση την παρατηρούμενη ισχυρή και δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των IκBa και IκBβ αναστολέων, ως απόκριση στο Bortezomib, υποδεικνύεται η φαρμακο-επαγόμενη απελευθέρωση και ενεργοποίηση του NFκB μεταγραφικού συμπλόκου τόσο στα T24 όσο και στα TCCSUP -υψηλού βαθμού κακοήθειας- κύτταρα, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα την κινητοποίηση προστατευτικών μονοπατιών επιβίωσης. Παρόμοιοι μηχανισμοί αντισταθμιστικής δράσης παρατηρούνται, επίσης, στα RT4 και RT112 -χαμηλού βαθμού κακοήθειας- κύτταρα, όπου η δοσο-ειδική σθεναρή μειορρύθμιση του IκBβ αναστολέα, ενδεχομένως, οδηγεί σε NFκB-εξαρτώμενες αποκρίσεις κυτταρικής επιβίωσης του κακοήθους ουροθηλίου υπό την παρουσία του Bortezomib. Αντίθετα, ο έντονος σχηματισμός χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικών ισομορφών (35/33 kDa) της IκBa πρωτεΐνης, υπό συνθήκες πρωτεασωμικής αναστολής, στα -χαμηλής κακοήθειας- RT4 και RT112 κύτταρα θα μπορούσε να προκαλεί είτε ανάδρομη επικρατή αναστολή της IκBa (39 kDa) ενεργότητας (απελευθέρωση NFκB) είτε ισχυρή φαρμακο-επαγόμενη καταστολή [σε συνεργασία με την δοσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση του -άθικτου- IκBa (39 kDa) αναστολέα] του NFκB μεταγραφικού συμπλόκου. Έχει σχετικά πρόσφατα αναφερθεί ότι ο σχηματισμός μίας παρόμοιου μοριακού βάρους IκBa ακρωτηριασμένης μορφής [~30 kDa (ΔIκBa)] σε διαφορετικά καρκινικά κυτταρικά περιβάλλοντα, μετά από έκθεση στο Bortezomib, συσχετίζεται στενά με την επαγωγή της NFκB ενεργότητας, αυξορρυθμίζοντας την μεταγραφική έκφραση γονιδίων στόχων που ελέγχουν μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης [569]. Σε αντιδιαστολή, όσον αφορά στο κυτταρικό

περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου (RT4 και RT112), και δεδομένης της φαρμακο-εξαρτώμενης μειορρύθμισης της μεταγραφικής έκφρασης των *Bcl-2* και *cIAP-2* αντι-αποπτωτικών γονιδίων στόχων του NFκB παράγοντα (προωθητική δράση θανάτου στα RT4), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η συνολική καταστολή της NFκB λειτουργίας προέρχεται από τον σχηματισμό των IκBa-like -πιθανώς πρωτεολυτικά ακρωτηριασμένων- ισομορφών (35/33 kDa), οι οποίες ενδεχομένως δύνανται να επάγονται από τα ισχυρής έκφρασης φαρμακο-ειδικά πρωτεολυτικά (ή διαφορικού ματίσματος) θραύσματα (80/45 kDa) της IKKα κινάσης στα χαμηλού βαθμού κακοήθειας -RT4 και RT112- καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης. Παρ' όλα αυτά, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί το εναλλακτικό σενάριο καταστολής δράσης της IκBa μορφής των 39 kDa από τις IκBa-like ισομορφές των 35/33 kDa, γεγονός που θα οδηγούσε στην απελευθέρωση του NFκB συμπλόκου, όπως υποδεικνύεται από την προερχόμενη εκ του Bortezomib μεταγραφική ενεργοποίηση του *FasL* γονιδίου στόχου στα RT4 κύτταρα, ως απόκριση στο φάρμακο (προωθητική δράση θανάτου).

Ένα από τα πλέον ισχυρά επίπεδα αντισταθμιστικής και αυτο-προστατευτικής δράσης του κακοήθους ουροθηλίου στην τοξική ενεργότητα του Bortezomib αντιπροσωπεύεται στην ισχυρή και δοσο-ειδική αυξορρύθμιση της Hsp70 μοριακής συνοδού, στην προσπάθεια του εκάστοτε κυτταρικού τύπου να διατηρεί την πρωτεωμική του ακεραιότητα και ομοιόσταση. Παρόμοιες αντισταθμιστικές αποκρίσεις έχουν αναφερθεί και σε ανθρώπινα κύτταρα πολλαπλού μυελώματος παρουσία του φαρμάκου [570], γεγονός που ενδεικνύει την γενικού χαρακτήρα, και ανεξάρτητη από το είδος του όγκου, ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αμύνονται σθεναρά με Hsp70-εξαρτώμενο τρόπο έναντι της πρωτεωμικής κατάρρευσης, όπως αυτή εκρέει από την πρωτεασωμική ανεπάρκεια. Εντούτοις, κρίνοντας τόσο από την φαρμακο-επαγόμενη παραγωγή -ενδεχομένως- πρωτεολυτικά ακρωτηριασμένων Hsp70-like (χαμηλότερου μοριακού βάρους) ισομορφών (67/63/46/42 kDa), με εν δυνάμει αρνητικά επικρατή ρόλο, όσο και από το τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα του Bortezomib, είναι προφανές ότι η αντισταθμιστική ενεργότητα της Hsp70 πρωτεΐνης αδυνατεί να αποτοξινώσει επιτυχώς το προσβεβλημένο πρωτέωμα από το υψηλό φορτίο των ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών. Με ενδιαφέρον, ανιχνεύεται η φαρμακο-ειδική μονο-ουμπικουϊτινίωση της Hsp70 (78 kDa) στα RT4 και T24, και η πολυ-ουμπικουϊτινίωση αυτής (155 kDa)



στα RT4, RT112 και T24 κύτταρα, ο βιολογικός ρόλος των οποίων χρήζει περαιτέρω μελέτης.

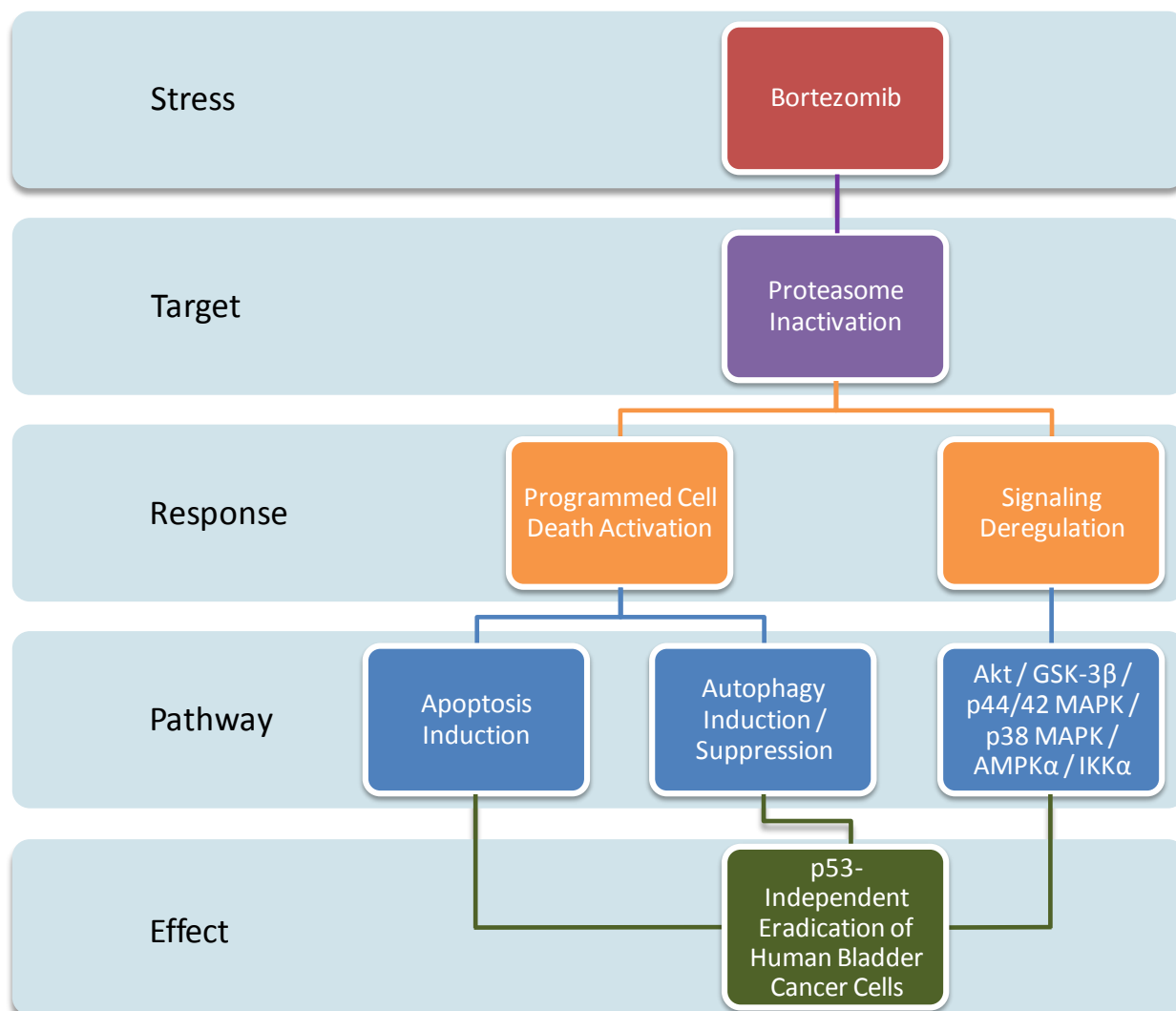
Σε συμφωνία, η Granzyme B-ανεξάρτητη επαγωγή σχηματισμού μίας μικρότερου μοριακού βάρους (55 kDa) -πιθανώς- πρωτεολυτικά ακρωτηριασμένης Hsp90-like ισομορφής θα μπορούσε να φέρει τέτοιου είδους ενεργότητες οι οποίες να καταστέλλουν λειτουργικά αυτές της άθικτης και πρόδρομης Hsp90 (90 kDa) μοριακής συνοδού, με τελικό αποτέλεσμα την προαγωγή του θανάτου στα RT4 και T24 κύτταρα, μετά από έκθεση αυτών στο Bortezomib. Επιπρόσθετα, αποκαλύπτεται η φαρμακο-ειδική, και ανάλογη με το είδος του εφαρμοζόμενου στρες, δημιουργία Hsp90-like ισομορφών (πρωτεολυτικών θραυσμάτων), όπως υποδεικνύεται από το διαφορετικό μοριακό βάρος αυτών μετά από έκθεση των RT4 κυττάρων στη Cisplatin (~65 kDa) [571] ή στο Bortezomib (55 kDa). Η απουσία συγκρίσιμου μηχανισμού φαρμακο-επαγόμενης παραγωγής Hsp90-like ισομορφών στα RT112 (αν και μία ιδιαίτερα ισχυρή πρωτεϊνική ζώνη μπορεί να ανιχνευθεί σε συνθήκες υπερ-έκθεσης του φιλμ χημειο-φωταύγειας) και TCCSUP κύτταρα επιτρέπει την μηχανιστική αποσύνδεση συμμετοχής της Hsp90 στην εξόντωση αυτών (RT112 και TCCSUP), υπό τη δράση του φαρμάκου. Εναλλακτικά, η προκαλούμενη από το Bortezomib αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Hsp90 μοριακής συνοδού θα μπορούσε να εξοπλίζει τα RT112 κύτταρα με μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο φάρμακο, απόκριση που δεδομένης της υψηλής φαρμακο-ευαισθησίας αυτών (RT112) δεν φαίνεται να λειτουργεί επιτυχώς.

Η αντι-νεοπλασ(μα)τική ενεργότητα του Bortezomib αποδείχθηκε να μην εξαντλείται στο επίπεδο των κυτταρικών σειρών κακοήθους ουροθηλίου, αλλά να επεκτείνεται και σε αυτό της *in vivo* αντιμετώπισης πειραματικών όγκων ουροδόχου κύστης στη μορφή αλλομοσχεύματος (“*Xenograft*”), όπως αυτοί αναπτύσσονται σε SCID ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς. Είναι εντυπωσιακό ότι το Bortezomib μπορεί και επιβραδύνει δραστικά τον χρόνο εμφάνισης και ρυθμό αύξησης τόσο των T24 όσο και των RT112 πειραματικών καρκινικών αλλομοσχευμάτων ουροδόχου κύστης, γεγονός που επιβεβαιώνει την *in vivo* δυναμική του φαρμάκου να εξασκεί ισχυρή ογκο-κατασταλτική δράση, ανεξάρτητα από τον βαθμό κακοήθειας και το *p53* γενετικό προφίλ του εκάστοτε ουροθηλιακού όγκου. Επιπλέον, αποδεικνύεται η θεραπευτική αποδοτικότητα του ενδοφλέβιου, μέσω του αγγειακού συστήματος της ουράς του ποντικού (*mouse tail-vein*), τρόπου έγχυσης του Bortezomib, καθώς και η

επιτυχία του συνολικού χρονοδιαγράμματος και δοσολογίας χορήγησης του φαρμάκου στον εκάστοτε SCID ποντικό φέροντα τον, υπό μελέτη, πειραματικό όγκο (T24- και RT112-αλλομοσχεύματα). Παρ' όλα αυτά, η εμφάνιση T24 και RT112 ανιχνεύσιμων όγκων (αν και -συγκριτικά- εντυπωσιακά μικρότερων διαστάσεων) σε συνθήκες έκθεσης στο Bortezomib αντανakλά την ικανότητα των κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου να μετεξελίσσονται *in vivo*, μέσω ισχυρών διαδικασιών μεταλλαξογένεσης και κλωνικής επιλογής, σε ανθεκτικούς στο φάρμακο δευτερογενείς πληθυσμούς, η πλήρης εξόντωση των οποίων θα απαιτούσε είτε τροποποίηση του παρόντος θεραπευτικού μονο-σχήματος είτε εφαρμογή ενός νέου φαρμακολογικού κοκτέιλ με αναβαθμισμένες αντι-νεοπλασ(μα)τικές ιδιότητες και πολύ περιορισμένη συστηματική τοξικότητα. Όμως, η υψηλή χημειοθεραπευτική αξία του Bortezomib δεν αντανakλάται μόνο στην ισχυρή επιβράδυνση του χρόνου και ρυθμού ανάπτυξης των ουροθηλιακών όγκων, αλλά και στην πλήρη καταστολή (100%) εμφάνισης δευτερογενών μεταστατικών εστιών (μεταστάσεων), σε όλο το εύρος της κοιλιακής χώρας και των εσωτερικών οργάνων των SCID ποντικών, οι οποίες (εστίες), όμως, ανιχνεύονται σε ένα ποσοστό της τάξης του ~32% στην περίπτωση των T24-αλλομοσχευμάτων απουσία χορήγησης φαρμάκου. Σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, και δια μέσου της χρήσης πειραματικών ζωικών μοντέλων τύπου "Xenograft", το Bortezomib αποδείχθηκε ικανό να μειορρυθμίζει σημαντικά το μεταστατικό δυναμικό καρκίνου του πνεύμονα [541, 572] και να προκαλεί ισχυρή μείωση του ρυθμού αύξησης οισοφαγικών [566], γαστρεντερικών [573], ηπατοκυτταρικών [559] και ανθεκτικών στην κλινικά συμβατική χημειοθεραπεία (στα Erlotinib και Gefitinib) πνευμονικών [560] όγκων. Η εν λόγω ισχυρή ογκο-κατασταλτική ενεργότητα του Bortezomib στο προ-κλινικό επίπεδο σε μία σειρά διακριτών τύπων ανθρώπινης κακοήθειας έχει μετεξελιχθεί σε ένα σύνολο διαφορετικών φάσεων κλινικών δοκιμών, που διεξάγονται τόσο για συμπαγείς όγκους όσο και αιματολογικές κακοήθειες, με ιδιαίτερη έμφαση σε αυτήν του πολλαπλού μυελώματος [541]. Αν και το *in vivo* θεραπευτικό διαμέτρημα του Bortezomib φαίνεται να συνδέεται με συστηματική τοξικότητα που περιλαμβάνει θρομβοκυτταροπενία, διάρροια και, κυρίως, περιφερική νευροπάθεια (αν και μπορεί να προάγει την οστεογένεση), έχουν αναφερθεί κλινικές μελέτες συνεργατικής χορήγησης μη-τοξικών δόσεων Bortezomib με κλινικά συμβα(ικ)ούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την υπερνίκηση της κατά

περίπτωση αναπτυσσόμενης χημειο-ανθεκτικότητας [553]. Στην κατεύθυνση αυτή, είναι πιθανόν ότι ένα τροποποιημένο και εξελεγμένο φαρμακολογικό κοκτέιλ με βάση το Bortezomib θα μπορούσε πραγματικά να αποδειχθεί ιδιαίτερα επιτυχές στην *in vivo* αντι-καρκινική εκρίζωση του ουροθηλιακού όγκου και στην εξάλειψη ανάπτυξης ενδεχόμενης αντίστασης στο εφαρμοζόμενο θεραπευτικό σχήμα. Σε σχέση με την αξιολόγηση της ογκο-κατασταλτικής αποτελεσματικότητας του Bortezomib σε κλινικό επίπεδο έναντι της ουροθηλιακής κακοήθειας αξίζει να αναφερθούν τρεις (3) τρέχουσες κλινικές δοκιμές, δύο (2) εκ των οποίων σε μορφή μονο-σχήματος και μία (1) σε μορφή κοκτέιλ (με Doxorubicin και Gemcitabine), οι οποίες λαμβάνουν χώρα υπό την εποπτεία του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (*NIH: National Institute of Health*) των Η.Π.Α. (<http://www.clinicaltrials.gov>).

Συμπερασματικά, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.2**, η μέσω του Bortezomib αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος σε κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου οδηγεί σε ενεργοποίηση εξαρτώμενων από την απόπτωση και αυτοφαγία προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου και σε απορρύθμιση κρίσιμων σηματοδοτικών δικτύων, αποκρίσεις που τελικά οδηγούν με p53-ανεξάρτητο τρόπο στην καταστροφή των κυττάρων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης.



**Εικόνα 4.2** Συγκεντρωτικό διάγραμμα ροής των λειτουργικά διαδοχικών και αλληλοσυνδεδεμένων αποκρίσεων ανθρώπινων κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στην τοξική δράση του ειδικού αναστολέα του πρωτεασώματος Bortezomib. *Stress*: Στρες, *Target*: Στόχος, *Response*: Απόκριση, *Pathway*: Μονοπάτι, *Effect*: Επίδραση, *Proteasome Inactivation*: Απενεργοποίηση Πρωτεασώματος, *Programmed Cell Death Activation*: Ενεργοποίηση Προγραμματισμένου Κυτταρικού Θανάτου, *Signaling Deregulation*: Σηματοδοτική Απορρύθμιση, *Apoptosis*: Απόπτωση, *Autophagy*: Αυτοφαγία, *Induction*: Επαγωγή, *Suppression*: Καταστολή και *p53-Independent Eradication of Human Bladder Cancer Cells*: Εκρίζωση Ανθρώπινων Καρκινικών Κυττάρων Ουροδόχου Κύστης με p53-Ανεξάρτητο Τρόπο.

### 4.3 3-BrPA (3-Βρωμοपुरοσταφυλικό οξύ)

Με βάση τα συμπεράσματα μίας πλέον πρόσφατης μελέτης το μήνα Φεβρουάριο του έτους 2013 από τον Καθηγητή Ian Tannock του Princess Margaret Cancer Center στον Καναδά της Βορείου Αμερικής, αποκαλύφθηκε ότι ένα υψηλό ποσοστό (~60%) των κλινικών δοκιμών φάσης III για τη θεραπεία του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού που πραγματοποιήθηκαν κατά την χρονική περίοδο 1995-2011 υπερθεμάτιζε την θετική πρωτογενή αντι-ογκογόνο δράση των εκάστοτε υπό μελέτη φαρμάκων και υπο-αξιολογούσε την αναπτυσσόμενη συστηματική τοξικότητα, αν και εφόσον αυτή υπήρχε [574]. Είναι προφανές ότι τα εν λόγω ευρήματα όχι μόνο εγείρουν σοβαρά ερωτήματα για τον τρόπο διαχείρισης της χημειοθεραπευτικής τεχνολογίας, αλλά επιβάλλουν τη βελτίωση υπάρχοντων και ανάπτυξη καινούριων προσεγγίσεων επιτυχούς διαχείρισης και κλινικής αντιμετώπισης της ανθρώπινης κακοήθειας.

Στην ίδια κατεύθυνση, είναι πλέον ευρέως παραδεκτό ότι η μονογονιδιακή/μονο-πρωτεϊνική στόχευση του νεοπλασματικού κυττάρου στη μορφή υιοθέτησης μονο-σχημάτων θεραπείας δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα, δεδομένου ότι το καρκινικό κύτταρο στην πορεία της κλωνικής του εξέλιξης (*clonal evolution*) έχει αποκτήσει μία πληθώρα δομικών και λειτουργικών αλλαγών, οι οποίες, σε συνδυασμό με την ύπαρξη αντισταθμιστικών (*counterbalanced*) αποκρίσεων, του επιτρέπουν να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ακόμα και στα πιο στρεσογόνα περιβάλλοντα, όπως αυτά που δημιουργούνται απουσία οξυγόνου (ανοξία/υποξία) ή στέρησης τροφικών συστατικών. Ως εκ τούτου, το επιθυμητό πρωτόκολλο θεραπείας θα ήταν είτε η χρήση ενός σχήματος τύπου «κοκτέιλ», του οποίου τα επιμέρους φαρμακολογικά συστατικά θα στόχευαν συγκεκριμένους βιομοριακούς ρυθμιστές επιλεκτικά στο κακόηθες αλλά όχι στο υγιές κυτταρικό περιβάλλον, είτε η εφαρμογή στην προ-κλινική και κλινική πράξη με τη μορφή μονο-σχήματος νέων φαρμακολογικών σκευασμάτων, των οποίων η εκάστοτε δραστική ουσία θα μπορεί με ειδικό τρόπο να στοχεύει περισσότερους του ενός ενδοκυτταρικούς σηματοδότες του καρκινικού και όχι του υγιούς κυττάρου. Προς μεγάλο ενδιαφέρον και έκπληξη, και καλύπτοντας ένα μεγάλο κενό στην υπάρχουσα μέχρι σήμερα γνώση της διεθνούς βιβλιογραφίας, η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποδεικνύει την ικανότητα του μοναδικού στην προ-κλινική πράξη γλυκολυτικού

αναστολέα 3-BrPA να στοχεύει και να αλλοιώνει την δομική και λειτουργική ακεραιότητα πλήθους ενδοκυτταρικών ρυθμιστών, με ιδιαίτερη έμφαση σε αυτούς που ελέγχουν τα σηματοδοτικά δίκτυα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού του κακοήθους ουροθηλίου.

Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος μεταβολικός φαινότυπος που διαφορικά παρατηρείται στα κακοήθη, αλλά όχι στα υγιή κύτταρα αντιπροσωπεύεται στο ευρέως γνωστό “*Warburg effect*”, το οποίο ορίζεται ως μία αλλαγή του τρόπου παραγωγής ενδοκυτταρικού ATP από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση, ακόμα και υπό συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, γεγονός που ιστορικά οδήγησε στην δευτερογενή ονομασία του φαινομένου ως «αερόβια γλυκόλυση» [458]. Παρ’ όλα αυτά, έχει πολύ πρόσφατα αποκαλυφθεί ότι το “*Warburg effect*” δεν αποτελεί μόνο χαρακτηριστικό του «πολλαπλασιαστικού μεταβολισμού» (*proliferative metabolism*), αλλά μπορεί και επεμβαίνει καθοριστικά στις διαδικασίες μορφογένεσης του σπέρματος, του οφθαλμού και της εμβρυϊκής καρδιάς των θηλαστικών [575-577].

Αν και οι κεντρικοί ρυθμιστές των μεταβολικών προγραμμάτων που ενεργοποιούνται αποκλειστικά σε κακοήθη κυτταρικά περιβάλλοντα παραμένουν προς το παρόν μη-ταυτοποιημένοι, η σύγκλιση στρεσογόνων αποκρίσεων, διαφορικού μεταβολισμού και διαταραγμένης σηματοδότησης ενδέχεται να αποτελέσουν στο άμεσο μέλλον την «Αχίλλειο πτέρνα» του καρκίνου [578]. Οι μεταβολικές προσαρμογές των καρκινικών κυττάρων ελέγχονται από αλλαγές σε κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία εξαρτώνται από τη δράση κινασών, όπως οι Akt, p44/42 MAPK και AMPK, και μεταγραφικών παραγόντων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την p53 και τον HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*), καθώς και ομοειδών ρυθμιστών αυτών [458, 579]. Επιπρόσθετα, η γλυκολυτική τροφοδότηση (*glycolytic fueling*) έχει πρόσφατα δειχθεί να συσχετίζεται με την παράτυπη συστατική δράση ενεργοποιημένων ογκοπρωτεϊνών (*oncoproteins*), όπως αυτές της οικογένειας Ras, ή/και μεταλλαγμένων ογκο-κατασταλτικών ρυθμιστών (*tumor suppressors*), με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα την μεταλλαγμένη p53, οι αλλαγές των οποίων στα κακοήθη κύτταρα επιλέγονται πρωτογενώς για τα συγκριτικά πλεονεκτήματα που προσφέρουν στην ικανότητα απόκτησης αντοχής στο θάνατο, αποφυγής του κυτταροστατικού ελέγχου και διατήρησης του πολλαπλασιαστικού δυναμικού [580].

Δεδομένου ότι ένα κύριο χαρακτηριστικό των ουροθηλιακών όγκων είναι η εξαρτώμενη από τον βαθμό κακοήθειας εμφάνιση μεταλλαγών που οδηγούν στην συστατική ενεργοποίηση της H-Ras ογκοπρωτεΐνης και στην δομική/λειτουργική ανεπάρκεια του p53 μεταγραφικού παράγοντα [34], επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ως ένα κυτταρικό προ-κλινικό μοντέλο αξιόπιστης προσομοίωσης του ανθρώπινου καρκίνου ουροδόχου κύστης πέντε διαφορετικού βαθμού κακοήθειας και p53 γενετικού προφίλ κυτταρικές σειρές κακοήθους ουροθηλίου, τρεις εκ των οποίων μελετήθηκαν εκτενώς σε σχέση με την κυτταρική και μοριακή παθοφυσιολογία τους, παρουσία ή απουσία του γλυκολυτικού αναστολέα 3-BrPA. Εντυπωσιακά αποκαλύφθηκε ότι τα βαθμού κακοήθειας III T24 (και T24-X) κύτταρα χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα συστατικής (απουσία φαρμάκου) έκφρασης όλων των υπό μελέτη αυτοφαγικών πρωτεϊνών (Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1 και LC3B-I), καθώς και συστατικής (απουσία φαρμάκου) φωσφορυλίωσης των IGF-IR/IR υποδοχέων (ενεργοποίηση), της Akt κινάσης σερίνης/θρεονίνης (ενεργοποίηση), των GSK-3α/β κινασών σερίνης/θρεονίνης (απενεργοποίηση), των FoxO μεταγραφικών παραγόντων (απενεργοποίηση), των MAPK κινασών σερίνης/θρεονίνης p44/42 και p38 (ενεργοποίηση), της AMPK κινάσης σερίνης/θρεονίνης (ενεργοποίηση), της mTOR κινάσης σερίνης/θρεονίνης (ενεργοποίηση), της S6K κινάσης σερίνης/θρεονίνης (ενεργοποίηση), όπως αντανακλάται από τη φωσφορυλίωση του ομοειδούς υποστρώματος της S6 ριβοσωμικής πρωτεΐνης και της επακόλουθης ενίσχυσης της πρωτεϊνσύνθεσης, και του eIF2α παράγοντα έναρξης της πρωτεϊνσύνθεσης (ενεργοποίηση), η φωσφορυλιωμένη μορφή του οποίου μειορρυθμίζει δραστικά την απόδοση της πρωτεϊνσυνθετικής μηχανής. Παρόμοια προφίλ συστατικώς (*constitutively*) (απουσία φαρμάκου) φωσφορυλιωμένης -υψηλής- έκφρασης ανιχνεύθηκαν και για τον AS160 (απενεργοποίηση) αρνητικό ρυθμιστή της διακίνησης του GLUT4 μεταφορέα γλυκόζης στη μεμβράνη και, συγχρόνως, κρίσιμου υποστρώματος των Akt και AMPK κινασών [471]. Ως εκ τούτου, είναι προφανές ότι τα T24 (και T24-X) κύτταρα έχουν υιοθετήσει, μέσω μίας διαδικασίας κλωνικής επιλογής (*clonal selection*), μηχανισμούς ευρέως γνωστούς ως “oncogene addiction” («εθισμός σε ογκογονίδιο»), που θα μπορούσαν εύκολα να διακριθούν σε τρεις αλληλοσυσχετιζόμενες υπο-κατηγορίες τύπου “autophagy addiction” («αυτοφαγικός εθισμός»), “signaling addiction” («σηματοδοτικός εθισμός») και “metabolic

addiction” («μεταβολικός εθισμός»). Ο όρος “oncogene addiction” εισήχθη πρωτογενώς στην παγκόσμια βιβλιογραφία από τον Dr. Bernard Weinstein (1930-2008, Columbia University, NY, USA) στην προσπάθειά του να εξηγήσει το φαινόμενο της αποκλειστικής εξάρτησης μερικών τύπων καρκίνου από μία και μόνο (ενεργοποιημένη) ογκογόνο πρωτεΐνη, ή από ένα και μόνο (ενεργοποιημένο) ογκοσηματοδοτικό μονοπάτι, η(το) οποία(ο) προσέδιδε στα κακοήθη κύτταρα το συγκριτικό πλεονέκτημα της ανεξέλεγκτης αύξησης και πολλαπλασιασμού. Αν και τέτοιου είδους εξάρτηση αποδόθηκε αρχικά στις ογκογόνες μορφές των γονιδίων *Ras* και *Myc*, είναι σήμερα ευρέως αποδεκτό ότι διαφορετικοί τύποι κακοήθειας διατηρούν την κυτταρική τους ομοιότητα, και τη δυνατότητα σχηματισμού επιθετικών όγκων, μέσω συστατικής ενεργοποίησης περισσότερων του ενός ογκογονιδίων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις Akt και ERK κινάσες [581]. Δεδομένου ότι τα T24 (και T24-X) κύτταρα φέρουν την H-Ras<sup>G12V</sup> κρίσιμη μεταλλαγή, η οποία έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την GTPase ενεργότητα της εν λόγω -ενεργού- πρωτεΐνης, προάγοντας ισχυρά το δυναμικό κυτταρικού μετασχηματισμού αυτής, θα πρέπει να είναι η υπερ-ενεργοποιημένη H-Ras<sup>G12V</sup> μορφή η κύρια αιτία πρόκλησης «αυτοφαγικού εθισμού» και «σηματοδοτικού εθισμού» των υπό μελέτη κυττάρων. Με άλλα λόγια, η επιβίωση και ανάπτυξη των T24 (και T24-X) κυττάρων φαίνεται να εξαρτάται άμεσα από την συστατική (απουσία φαρμάκου) ενεργοποίηση της αυτοφαγικής μηχανής και επιλεγμένων σηματοδοτικών δικτύων, όπως αυτά ελέγχονται από την H-Ras<sup>G12V</sup> ογκογόνο (*oncogenic*) δραστηριότητα. Πράγματι, ισχυρή μειορρύθμιση, μέσω της RNAi τεχνολογίας, των Atg5 και Atg7 αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα T24 κύτταρα οδήγησε σε δραματική μείωση του βαθμού επιβίωσης αυτών, αποκαλύπτοντας έτσι τον καθοριστικό ρόλο της αυτοφαγίας -ως μηχανισμό εκκαθάρισης τοξικών πρωτεϊνών και οργανιδίων [μιτοχονδρίων (μιτοφαγία)], αλλά και βασικής τροφοδότησης με δομικούς λίθους- όχι μόνο στην ανάπτυξη κυτταρικής κακοήθειας, αλλά και στον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών σχημάτων στόχευσης αυτής [455]. Στην ίδια κατεύθυνση, η ικανότητα του 3-BiPA να καταστέλλει την συστατικού (απουσία φαρμάκου) τύπου αυτοφαγία, όπως διαφαίνεται από την δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση των Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1 και LC3B αυτοφαγικών πρωτεϊνών στα T24 (και T24-X) κύτταρα αποδεικνύει ότι η κυτταροτοξική δυναμική του εν λόγω φαρμάκου σχετίζεται άμεσα με την απώλεια λειτουργίας της αυτοφαγικής



μηχανής στο περιβάλλον του κακοήθους -μεταστατικού- ουροθηλίου. Αντίθετα, τα RT4 κύτταρα, τα οποία ακολουθούν ένα πρόγραμμα κυτταρικής εξόντωσης ως απόκριση στη δράση της Doxorubicin, αλλά όχι του 3-BrPA, μπορούν και ενεργοποιούν φαρμακο-επαγόμενους μηχανισμούς αυτοφαγίας, οι οποίοι συμβάλλουν, ενδεχομένως, καθοριστικά στον τελικό φαινότυπο του κυτταρικού θανάτου. Άρα, λοιπόν, αποκαλύπτεται ο διπλός διακριτός ρόλος της αυτοφαγίας στην κυτταρική παθοφυσιολογία του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης, με αυτήν (αυτοφαγία) στην συστατική της μορφή να υποστηρίζει την κυτταρική επιβίωση (T24 και T24-X) και στην επαγόμενη μορφή της να προκαλεί κυτταρικό θάνατο (RT4), γεγονός που μας επιτρέπει την μηχανιστική υιοθέτηση των όρων «συστατικός αυτοφαγικός εθισμός» και «επαγόμενος αυτοφαγικός θάνατος». Η προκαλούμενη από το 3-BrPA καταστολή της συστατικής αυτοφαγίας φαίνεται να αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του κακοήθους ουροθηλίου, και όχι άλλων μορφών καρκίνου, όπως αυτών του γλοιοβλαστώματος, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και του επιθηλιακού τραχηλικού καρκινώματος (HeLa κύτταρα), στα οποία έχει πρόσφατα αναφερθεί η φαρμακο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση αυτής (αυτοφαγίας) [453, 582, 583].

Το κυτταροτοξικό δυναμικό του 3-BrPA, εκτός από την αυτοφαγία, διαμορφώνεται καθοριστικά και από την φαρμακο-ειδική και δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή ενός μικτού προγράμματος αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου. Ανάλογα με τα επίπεδα του εφαρμοζόμενου στρες, όπως αυτά αντανακλώνονται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου, αποκαλύπτεται η δυνατότητα των T24 (και T24-X) κυττάρων να υπόκεινται σε διαδικασίες απόπτωσης σε χαμηλά επίπεδα στρες (75  $\mu\text{M}$ ) και νέκρωσης σε υψηλά επίπεδα αυτού (100 και 125  $\mu\text{M}$ ). Οι κύριοι ρυθμιστές που διαφοροποιούν μηχανιστικά τους δύο κυτταρικούς τύπους θανάτου στο κακοήθες ουροθήλιο είναι η ενεργότητα του ρεπερτορίου των Κασπάσων και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ATP βιο-ενεργητικού μορίου. Η απουσία ενεργοποιημένης Κασπάσης-8 στις συνθήκες υψηλού στρες (100 και 125  $\mu\text{M}$ ) όχι μόνο απαγορεύει την κατωροϊκή ενεργοποίηση των Κασπασών-9 και -3, αλλά μέσω ενός μηχανισμού που πιθανότατα εμπλέκει το σύμπλοκο των RIP1 και RIP3 κινασών προάγει τον νεκρωτικό θάνατο. Ειδικότερα, στη δόση 75  $\mu\text{M}$  του 3-BrPA, η ενεργή Κασπάση-8 στο κυτταρικό περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου, πιθανότατα υδρολύει την CYLD απο-ουμπικουϊτίνιση, καταστέλλοντας έτσι την απο-

ουμπικουϊτινίωση της RIP1, ενώ συγχρόνως η ίδια Κασπάση (-8) μπορεί να υδρολύει και αδρανοποιεί το προ-νεκρωτικό σύμπλοκο των RIP1 και RIP3 κινασών [284, 584], οδηγώντας τελικά τα T24 (και T24-X) κύτταρα στον αποπτωτικό θάνατο. Αντίθετα, στις συγκεντρώσεις 100 και 125  $\mu\text{M}$ , η απουσία ενεργού Κασπάσης-8 επιτρέπει, ενδεχομένως, την μέσω της CYLD πρωτεΐνης απο-ουμπικουϊτινίωση της RIP1 κινάσης και την διαδοχική συγκρότηση του RIP1/RIP3 νεκροσώματος/νεκροπυσώματος («ριποπυσώματος»: “*riproptosome*”) σε ενεργό μορφή [284, 584], η λειτουργία του οποίου οδηγεί σε πληθώρα μεταβολικών αλλαγών, σε -κατωροϊκή- εξάντληση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP και τελικά σε γενικευμένη βιο-ενεργειακή κατάρρευση του ανθρώπινου κακόηθους ουροθήλιου.

Όπως αναμενόταν, η παρουσία του ενεργοποιημένου ρεπερτορίου των Κασπασών στη χαμηλή δόση 3-BrPA οδηγεί σε πρωτεολυτική υδρόλυση και λειτουργική αδρανοποίηση του PARP (και Lamin A/C) πυρηνικού αντιγόνου, γεγονός που σηματοδοτεί την φαρμακο-ειδική εμπλοκή ενός προγράμματος αποπτωτικού θανάτου [219]. Αντίθετα, οι υψηλές δόσεις φαρμάκου αποδεικνύονται ικανές να επάγουν διακριτά πρότυπα πρωτεολυτικής επεξεργασίας της PARP πρωτεΐνης, τα οποία θα μπορούσαν να σχετίζονται ισχυρά με αλλοιωμένη λειτουργική δυναμική του εν λόγω ενζύμου. Πράγματι, η χρήση του ειδικού PARP αναστολέα PJ-34 και η ικανότητα αυτού να διασώζει σημαντικά τα T24 (και T24-X) κύτταρα από την τοξική δράση του 3-BrPA, εκλεκτικά στις συνθήκες υψηλού στρες, αποδεικνύει ότι το 3-BrPA στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο προκαλεί νεκρωτικό θάνατο μέσω υπερ-ενεργοποίησης του PARP πυρηνικού ενζύμου. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποιημένη μορφή της PARP πρωτεΐνης, ως απόκριση στην καταστροφή του γονιδιωματικού DNA, καταλύει τη μεταφορά της ομάδας ADP-ριβόζη από το  $\text{NAD}^+$  μόριο στις πρωτεΐνες στόχους του συστήματος επιδιόρθωσης και μεταγραφής DNA, με σκοπό τον σχηματισμό διακλαδισμένων πολυμερών ADP-ριβόζης, και την αναπόφευκτη μείωση των ενδοκυτταρικών  $\text{NAD}^+$  επιπέδων [219, 284, 585]. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι, εκτός από την εξάντληση του ενδοκυτταρικού ATP, το 3-BrPA μπορεί και προκαλεί νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στο κακόηθες ουροθήλιο μέσω δραματικής ελάττωσης των ενδοκυτταρικών  $\text{NAD}^+$  επιπέδων. Δεδομένου ότι το  $\text{NAD}^+$  απαιτείται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης για το μετασχηματισμό της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ (*pyruvate*), η είσοδος του οποίου στο μιτοχόνδριο οδηγεί στην παραγωγή ATP [586], συνάγεται ότι το 3-BrPA προκαλεί ισχυρή βιο-ενεργειακή

κρίση στο καρκινικό ουροθήλιο, καταστέλλοντας πρωτογενώς τη σύνθεση του πυροσταφυλικού οξέος και δευτερογενώς τον μιτοχονδριακό σχηματισμό του ATP. Η φαρμακο-εξαρτώμενη ελάττωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του λακτικού οξέος στο κακόηθες ουροθήλιο (T24), το οποίο (λακτικό οξύ) αποτελεί το άμεσο προϊόν καταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος με ταυτόχρονη παραγωγή  $\text{NAD}^+$ , και συγχρόνως το τελικό προϊόν της γλυκολυτικής διάσπασης, αποδεικνύει τον πλειοτροπικό μηχανισμό «γλυκολυτικο-κατασταλτικής» δράσης του 3-BrPA, όπως αυτός αποκαλύπτεται από την εξάντληση των ενδοκυτταρικών ενεργειακών πηγών των  $\text{NAD}^+$ , πυροσταφυλικού οξέος, ATP και λακτικού οξέος. Είναι πιθανόν ότι τα γλυκολυτικού χαρακτήρα κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου (T24 και T24-X) μπορούν σε υποξικό περιβάλλον να ενεργοποιούν το “*Warburg effect*”, και ως εκ τούτου να παράγουν και να εκκρίνουν λακτικό οξύ, η παραλαβή του οποίου από γειτονικά κακοήθη (αλλά και ενδοθηλιακά) κύτταρα «φυσιολογικής» οξυγόνωσης να επιτρέπει τον αντίστροφο μετασχηματισμό του λακτικού σε πυροσταφυλικό οξύ και την διαδοχική είσοδο αυτού στον κύκλο του τρι-καρβοξυλικού οξέος (*TCA cycle*), με στόχο την παραγωγή ATP, και τελικά την ενεργειακή τροφοδότηση της «οξυγονωμένης» περιοχής του όγκου [393]. Το προτεινόμενο αυτό μοντέλο θα μπορούσε να εφαρμοστεί ακόμα και στην ίδια *in vitro* καλλιέργεια των T24 (και T24-X) κυττάρων, όπου μέσω ενός μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης το κάθε κύτταρο δύναται να παράγει και να προσφέρει στο γειτονικό του λακτικό οξύ, το οποίον τώρα θα χρησιμοποιείται πρωτογενώς για την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών. Αυτό, όμως, προϋποθέτει την παρουσία ειδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων εισόδου-εξόδου του λακτικού οξέος, οι οποίοι θα μπορούν να ρυθμίζουν ανάλογα με το, κατά περίπτωση, γλυκολυτικό περιβάλλον τα τελικά ενδοκυτταρικά επίπεδα αυτού (λακτικού οξέος) ανά θέση κυττάρου στον όγκο, ανά χρονική στιγμή και ανά φάση απόκρισης στο φαρμακο-επαγόμενο στρες [587]. Οι εν λόγω μεταφορείς ανήκουν στην MCT (*monocarboxylate transporter*) οικογένεια, με τις MCT1 και MCT4 ισομορφές να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο κυρίως στην είσοδο (συνθήκες «φυσιολογικής» οξυγόνωσης, *normoxia*) και έξοδο (υποξικές συνθήκες, *hypoxia*) του λακτικού οξέος, αντίστοιχα, στο καρκινικό κύτταρο [393, 587, 588]. Στην ίδια κατεύθυνση, και με βάση μία πολύ πρόσφατη αναφορά, η οποία συσχετίζει την κυτταρο-ειδική ευαισθησία ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού στο 3-BrPA με τα επίπεδα έκφρασης της MCT1 πρωτεΐνης [589], διαφαίνεται ότι η

διαφορική ανθεκτικότητα των RT4 (υψηλή) και T24 (και T24-X) (χαμηλή/ανύπαρκτη) κυττάρων στο εν λόγω φάρμακο θα μπορούσε να αποδοθεί στην αδυναμία των πρώτων και ικανότητα των δεύτερων να εισάγουν σε μεγάλη ποσότητα και να διατηρούν σε υψηλά δραστικά επίπεδα (*effective concentrations*) το 3-BrPA, όπως αυτά (τα επίπεδα) θα ήταν δυνατόν να διαμορφώνονται από την συγκριτικά υψηλότερη υπερ-έκφραση του MCT1 μεταφορέα εισόδου 3-BrPA στα T24 (και T24-X), αλλά όχι στα RT4 κύτταρα, μηχανισμός ο οποίος αναμένεται να μελετηθεί στο άμεσο μέλλον. Επιπρόσθετα, η ενοχοποίηση του SLC5A8 (SMCT1) μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα στην είσοδο του 3-BrPA σε καρκινικά κύτταρα μαστού [590] υποδεικνύει την θεμελιώδη σημασία των διαμεμβρανικών μεταφορέων του φαρμάκου (MCT1, MCT4 και SMCT1) τόσο στην κυτταρο-ειδική (RT4 έναντι T24) τοξική ενεργότητα αυτού όσο και στην ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων στοχευμένης χημειοθεραπείας του ανθρώπινου καρκίνου (Professor John Cleveland, The Scripps Research Institute, Jupiter, FL, USA: προσωπική επικοινωνία).

Η υπερ-ενεργοποίηση του PARP και η ανεξέλεγκτη προσθήκη πολυμερών τύπου PAR [*poly(ADP-ribose)*] σε υποστρώματα στόχους εξισορροπείται ενδοκυτταρικά από την αντισταθμιστική δράση της υδρολυτικής απομάκρυνσης των εν λόγω PAR πολυμερών μέσω της PARG [*poly(ADP-ribose) glycohydrolase*] ενζυμικής ενεργότητας. Η μαζική απελευθέρωση ελεύθερων PAR ολιγομερών έχει ενοχοποιηθεί να προκαλεί απελευθέρωση του AIF παράγοντα από το μιτοχόνδριο και αναστολή της μεταβολικής λειτουργίας του GAPDH ενζύμου μέσω πολυ-ADP-ριβοζύλιωσης [*poly(ADP-ribosylation)*] αυτού, χωρίς να αποκλείεται το εναλλακτικό σενάριο της άμεσης προσθήκης ομάδων ADP-ριβόζης από το υπερ-ενεργοποιημένο PARP [452, 591]. Η μετακίνηση του AIF από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα προκαλεί ενεργοποίηση ενός -κατά κύριο λόγο- Κασπασο-ανεξάρτητου προγράμματος -αποπτωτικού/νεκρωτικού- θανάτου, το οποίον κυρίως χαρακτηρίζεται από φαινόμενα πυρηνικής συμπίκνωσης, θρυμματισμού γονιδιωματικού DNA μεγάλης κλίμακας και κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, με τελικό αποτέλεσμα τον σφοδρό κυτταρικό θάνατο [592, 593]. Στην κατεύθυνση αυτή, και δεδομένης σχετικά πρόσφατης αναφοράς, η οποία συσχετίζει την κυτταροτοξική δράση του 3-BrPA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου ηπατώματος με την απελευθέρωση από το μιτοχόνδριο και επακόλουθη πυρηνική διαμερισματοποίηση (*compartmentalization*) της AIF πρωτεΐνης [594, 595], προτείνεται μία παρόμοια μηχανιστική διαδοχή

μοριακών γεγονότων στο κακόηθες ουροθήλιο των T24 (και T24-X) κυττάρων, στα οποία η νεκρωτική ενεργότητα του 3-BrPA θα μπορούσε ενδεχομένως να επιτελείται μέσω της φαρμακο-επαγόμενης μετακίνησης του AIF από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα και της επακόλουθης εκτέλεσης ενός ισχυρού προγράμματος θανάτου. Το εν λόγω σενάριο χρήζει προφανώς ιδιαίτερης προσοχής και ανάγκης λεπτομερούς μελέτης, όχι μόνο για τη διαφώτιση λειτουργίας του μοριακού μονοπατιού τοξικής δράσης του 3-BrPA στο κακόηθες ουροθήλιο, αλλά κυρίως για την ανάπτυξη μίας νέας και πολλά υποσχόμενης φαρμακολογικής πλατφόρμας που θα στοχεύει στην επιτυχή θεραπευτική διαχείριση του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Εκτός από τον εν δυνάμει ρόλο του υπερ-ενεργοποιημένου PARP στην ενζυμική αναστολή της GAPDH ενεργότητας, είναι πιθανόν το 3-BrPA στο κακόηθες ουροθήλιο να ασκεί άμεση και πρωτογενή δράση στην δομική/λειτουργική ακεραιότητα κρίσιμων γλυκολυτικών ενζύμων που ελέγχουν καθοριστικά το “*Warburg effect*”. Πράγματι, αποκαλύφθηκε η ικανότητα των νεκρωτικών δόσεων (100 και 125  $\mu\text{M}$ ) του 3-BrPA και στους τρεις υπό μελέτη κυτταρικούς τύπους καρκίνου ουροδόχου κύστης να προκαλεί δόσο-εξαρτώμενη και δραματική μειορρύθμιση, μέσω φαρμακο-επαγόμενης πιθανής δομικής αποικοδόμησης, του GAPDH γλυκολυτικού ενζύμου, το οποίον καταλύει το μετασχηματισμό της 3-φωσφορικής γλυκερ(ιν)αλδεΐδης (*glyceraldehyde-3-phosphate*) σε 1,3-δι-φωσφο-γλυκερι(νι)κό (*1,3-biphosphoglycerate*) (με ταυτόχρονη κατανάλωση  $\text{NAD}^+$ ). Αντίθετα, η HK2 εξωκίνηση, η οποία διαμεσολαβεί στην μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (με ταυτόχρονη κατανάλωση ATP), φάνηκε κατά τη διάρκεια του νεκρωτικού θανάτου να παραμένει σχετικά αναλλοίωτη ως προς την δομική της ευστάθεια, αλλά ενδεχομένως να υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες οδηγούν στην δημιουργία μεγαλο-μοριακών συμπλόκων με υποβαθμισμένη λειτουργική αξία. Διαφαίνεται, λοιπόν, ότι το 3-BrPA στο κυτταρικό περιβάλλον του κακοήθους ουροθηλίου μπορεί και αλλοιώνει το γλυκολυτικό δυναμικό των GAPDH και HK2 ενζύμων με διακριτό τρόπο: ενώ προάγει την δομική αποικοδόμηση της GAPDH, προωθεί την λειτουργική, αλλά όχι δομική, αποδυνάμωση της HK2, το συνδυαστικό αποτέλεσμα των οποίων είναι η παρεμπόδιση της γλυκολυτικής διαδικασίας. Ένας πιθανός μηχανισμός θα ήταν η ομοιοπολική προσθήκη της πυρουβυλικής ομάδας του 3-BrPA σε κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης στα υπό μελέτη ένζυμα, με την κυστεΐνη 152 (*Cys*<sup>152</sup>) της GAPDH πρωτεΐνης να αποτελεί

τον πιθανότερο μοριακό στόχο του φαρμάκου, όπου η πυρουβλυωμένη μορφή αυτής (*Cys*<sup>152</sup>) θα μπορούσε να επάγει την ουμπικουϊτινίωση και επακόλουθη αποικοδόμηση του ενζύμου [405, 596]. Παρόλο που η HK2, ιστορικά, θεωρείται ως ο πρώτος γλυκολυτικός στόχος του 3-BrPA [405, 597], έχει αποδειχθεί ότι είναι η GAPDH το γλυκολυτικό εκείνο ένζυμο που σε συστήματα *in vitro* ανάλυσης ενζυμικής ενεργότητας αναστέλλεται λειτουργικά σε απόκριση στο φάρμακο [και στο νέας γενεάς συνθετικό παράγωγο αυτού 3-BrOP (*3-Bromopyruvate propyl ester*)] και, συγκριτικά, όχι η HK2 εξωκίνηση [405, 409, 412, 598]. Ωστόσο, είναι πιθανόν ότι το 3-BrPA, αν και αδυνατεί να αναστείλει την *in vitro* αξιολογημένη καταλυτική δράση του καθαρισμένου HK2 ενζύμου, δύναται να αναγνωρίζει εκλεκτικά και να καταργεί την εν λόγω ενζυμική ενεργότητα της *in vivo* στερεοδομής, όπως αυτή διαμορφώνεται αποκλειστικά από ειδικές δια-πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του γειτονικού μικρο-περιβάλλοντος.

Στην κατεύθυνση αυτή, έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση του 3-BrPA σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα HL-60 προκαλεί την απελευθέρωση της HK2 εξωκίνησης από τα μιτοχόνδρια και την ταυτόχρονη μείωση της μοριακής κινητικότητας της εν λόγω πρωτεΐνης σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυ-ακρυλαμίδης, η οποία ενδεχομένως αντανακλά και τον βαθμό μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, τύπου πυρουβυλίωσης, του ενζύμου υπό τη δράση του φαρμάκου [406]. Το υπάρχον μηχανιστικό μοντέλο υποστηρίζει ότι η μιτοχονδριακή HK2 συνδέεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (*OMM: outer mitochondrial membrane*) μέσω της αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με την VDAC (*voltage dependent anion channel*) διαμεμβρανική πρωτεΐνη, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα όχι μόνο την καταστολή απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c* και AIF [μέσω απαγόρευσης διάνοιξης του PTP (*permeability transition pore*)], με επακόλουθη παρεμπόδιση του κυτταρικού θανάτου, αλλά και την αποδοτικότερη διακίνηση του σχηματιζόμενου ATP από το μιτοχόνδριο προς την HK2 εξωκίνηση, με σκοπό την ταχύτερη και ανεμπόδιστη φωσφορυλίωση της διαθέσιμης γλυκόζης και τελικά την εύρυθμη κυτταρική προσαρμογή στο γλυκολυτικό μονοπάτι [389, 394]. Φαίνεται ότι η ενεργοποιημένη Akt κίνηση δια μέσου άμεσης φωσφορυλίωσης της HK2 στη θρεονίνη 473 (Thr<sup>473</sup>) προάγει ισχυρά τόσο την ενζυμική ενεργότητα της HK2, όσο και την ενίσχυση της σύνδεσης αυτής με την VDAC μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, αναδεικνύοντας έτσι τον αντι-αποπτωτικό αλλά και συγχρόνως γλυκολυτικό ρόλο της

Akt πρωτεΐνης. Αντίθετα, η απουσία ενεργού Akt προκαλεί την ενεργοποίηση του κατωροϊκού υποστρώματος GSK-3β κινάση, η οποία τώρα μπορεί και φωσφορυλιώνει τη VDAC πρωτεΐνη στη θρεονίνη 51 (*Thr<sup>51</sup>*), οδηγώντας ως εκ τούτου στην αποκόλληση της HK2 από τη VDAC και στην επακόλουθη επαγωγή κυτταρικού θανάτου [389, 599, 600]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί ο πρόσφατα προταθείς μηχανισμός που υποστηρίζει ότι η Akt φωσφορυλιώνει την HK2 με στόχο την προστασία της ενζυμικής ενεργότητας αυτής, και τη διατήρηση σύνδεσής της στο μιτοχόνδριο, από το ίδιο το προϊόν της, G-6-P (*glucose-6-phosphate*, 6-φωσφορική γλυκόζη), το οποίο σε συνθήκες κυτταροπλασματικής εντόπισης της HK2 μπορεί και αναστέλλει μέσω ανάδρομης αρνητικής ρύθμισης την ενζυμική ενεργότητα αυτής [600]. Αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι η μιτοχονδριακή και η κυτταροπλασματική HK2 διαφέρουν τόσο ως προς το πρότυπο μετα-μεταφραστικής τους φωσφορυλίωσης όσο και ως προς τις ενζυμικές τους ενεργότητες και φαρμακολογική τους ευαισθησία στους εκάστοτε γλυκολυτικούς αναστολείς. Σε συμφωνία, πρόσφατη αναφορά αποκαλύπτει την διαφορετική ευαισθησία της μιτοχονδριακής, συγκριτικά με αυτήν της κυτταροπλασματικής, HK2 εξωκινάσης στο 3-BrPA σε HepG2 κύτταρα ηπατώματος [601]. Επιπρόσθετα, η δια μέσου του 3-BrPA αναστολή της GAPDH θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερ-συσσώρευση G-6-P γλυκολυτικών προϊόντων, τα οποία τώρα είναι ενδεχομένως ικανά να αναστέλλουν την κυτταροπλασματική HK2, ενισχύοντας περαιτέρω τον αντι-γλυκολυτικό κυτταρικό φαινότυπο, αλλά καθιστώντας την εν λόγω ισομορφή δευτερογενώς ανθεκτική στην ανασταλτική ενεργότητα του 3-BrPA.

Με βάση τα προ-αναφερθέντα, προτείνουμε ότι οι νεκρωτικές δόσεις του 3-BrPA στο κακόηθες ουροθήλιο των T24 (και T24-X) κυττάρων επάγουν πρωτογενώς δραματική αποικοδόμηση της GAPDH, επακόλουθη υπερ-συσσώρευση G-6-P μεταβολικών προϊόντων και δευτερογενή λειτουργική ανάσχεση της κυτταροπλασματικής, και εν δυνάμει μη-φωσφορυλιωμένης, HK2 εξωκινάσης. Δεδομένου ότι οι νεκρωτικές δόσεις του φαρμάκου συνοδεύονται από παντελή απώλεια της συστατικώς φωσφορυλιωμένης, και άρα ενεργοποιημένης, Akt κινάσης, είναι πιθανόν, στο κυτταρικό περιβάλλον του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης, η HK2 πρωτεΐνη να εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (μη-φωσφορυλιωμένη) και ως εκ τούτου να αναστέλλεται από την G-6-P, αλλά ίσως όχι από το 3-BrPA. Με άλλα λόγια, αποκαλύπτεται ένας ισχυρός πλειοτροπικός μηχανισμός δράσης του φαρμάκου στο κακόηθες ουροθήλιο (T24 και T24-X

κύτταρα), όπου η μιτοχονδριακή HK2 (συστατικώς φωσφορυλιωμένη) αναστέλλεται εκλεκτικά από το 3-BiPA (αλλά όχι από την G-6-P), μετακινείται στο κυτταρόπλασμα (και λόγω φαρμακο-επαγόμενης καταστολής της Akt δράσης), όπου τώρα πλέον αναγνωρίζεται και παρεμποδίζεται λειτουργικά (σε μη-φωσφορυλιωμένη μορφή) από την G-6-P (αλλά όχι από το 3-BiPA), η οποία παρήχθη από την αποικοδόμηση της GAPDH λόγω ισχυρής στόχευσης αυτής από το 3-BiPA. Ανατροφοδοτώντας θετικά τον μηχανισμό, η αδρανής Akt κινάση επιτρέπει στο καρκινικό ουροθήλιο την απο-φωσφορυλίωση των GSK-3α/β κινασών, η επακόλουθη ενεργοποίηση των οποίων θα μπορούσε να οδηγεί σε φωσφορυλίωση της VDAC πρωτεΐνης και διαδοχική απελευθέρωση της (μη-φωσφορυλιωμένης πλέον) HK2 εξωκινάσης στο κυτταρόπλασμα, τελικό αποτέλεσμα των οποίων θα είναι η ισχυρή βιο-ενεργειακή κρίση (εξάντληση επιπέδων ATP) και υιοθέτηση ενός μη-αντιστρεπτού προγράμματος κυτταρικού θανάτου (διάνοιξη PTP πόρου).

Η ικανότητα του LY294002 ειδικού αναστολέα της PI3K κινάσης σερίνης θρεονίνης, η οποία αποτελεί ανωροϊκό ρυθμιστή της Akt κινάσης, να διασώζει ισχυρά τα -χαμηλής πυκνότητας κάλυψης υποστρώματος- T24 κύτταρα σε νεκρωτικές συνθήκες στρες, προκαλούμενες από το 3-BiPA, υποστηρίζει σθεναρά την καθοριστική συμμετοχή ενός εξαρτώμενου από την PI3K μηχανισμού φωσφορυλίωσης που ελέγχει διαφορετικά την κυτταρική ευαισθησία στο εν λόγω φάρμακο. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η αναστολή του PI3K-εξαρτώμενου μονοπατιού σηματοδότησης (μέσω του LY294002) προσφέρει στα κύτταρα του κακοήθους ουροθηλίου ένα ισχυρό συγκριτικό πλεονέκτημα επιβίωσης από την κυτταροτοξική δράση του 3-BiPA, το οποίον πιθανότατα διαμορφώνεται από την εξασθένηση του βαθμού αναγνώρισης και την ελάττωση της συγγένειας σύνδεσης του φαρμάκου με κρίσιμους ενδοκυτταρικούς μοριακούς στόχους. Ένας εξ αυτών προτείνεται να είναι η HK2 εξωκινάση, η φωσφορυλιωμένη μορφή της οποίας, στο περιβάλλον δράσης του LY294002, οφείλει να παρουσιάζει εμφανώς μειωμένα επίπεδα έκφρασης, τα οποία θα την προστατεύουν από την ανασταλτική δράση του 3-BiPA, αλλά συγχρόνως θα την προωθούν στο να παραμένει αγκυροβολημένη στο μιτοχόνδριο, ώστε να διατηρείται η αποδοτικότητα της γλυκολυτικής μηχανής (σχηματισμός G-6-P), να καταστέλλεται η δράση του VDAC (και άρα ο θάνατος) και να αποφεύγεται επιμελώς η ανάδρομη αναστολή από το G-6-P προϊόν αυτής, το οποίον δύναται πλέον να παρεμποδίζει διαφορετικά τη λειτουργία μόνο της διαρρέουσας στο κυτταρόπλασμα



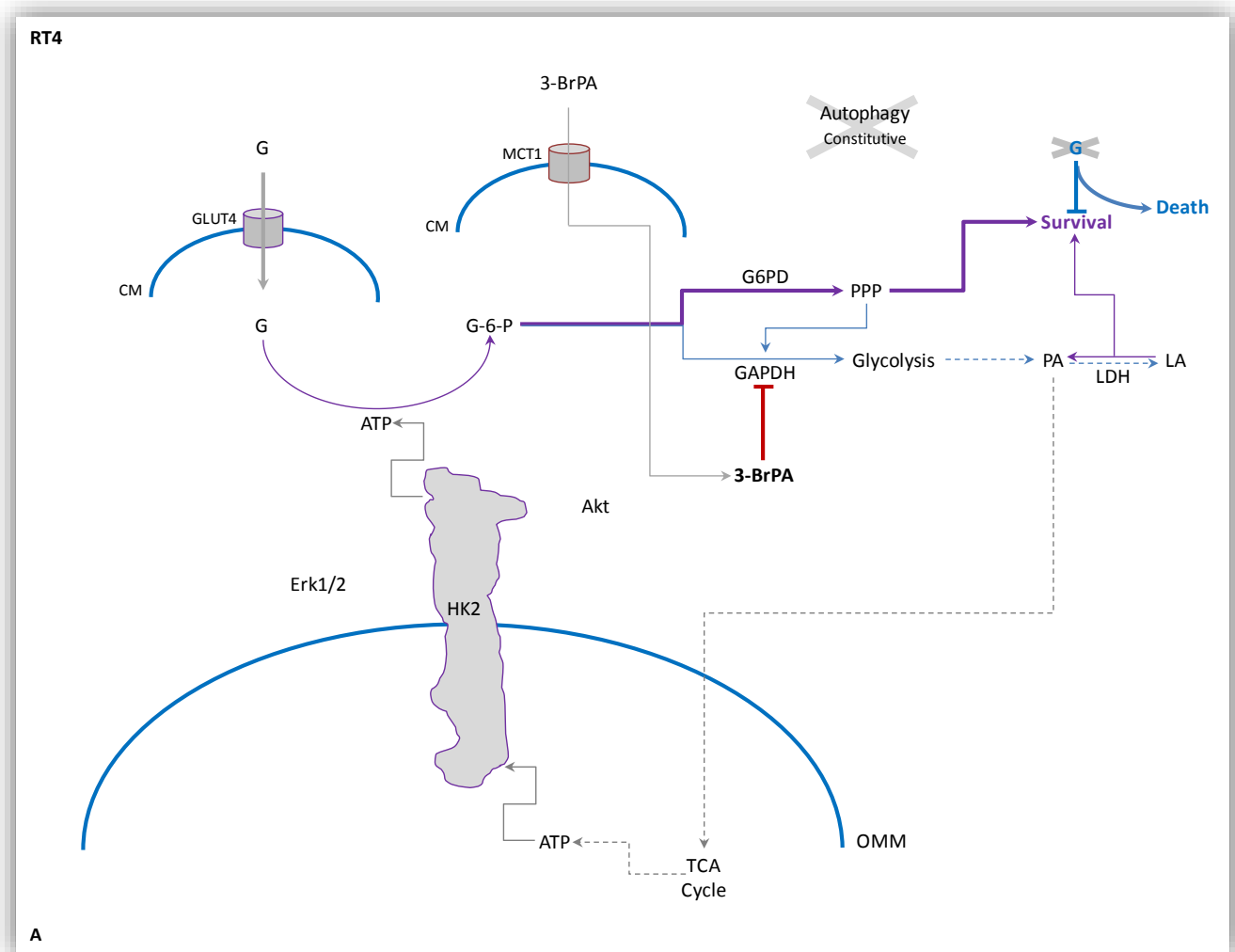
HK2 ισομορφής. Για την ικανοποίηση και μηχανιστική ενοποίηση όλων των προαναφερθέντων μοριακών απαιτήσεων είναι απαραίτητο να συμπεριλάβουμε στο προτεινόμενο μοντέλο μας και την ύπαρξη ενός PI3K-εξαρτώμενου, αλλά διακριτού από την Akt, σηματοδοτικού στοιχείου «X» (για παράδειγμα την PDK1 κινάση), το οποίο θα δύναται να φωσφορυλιώνει διαφορεικά κρίσιμους σηματοδοτικούς καθοριστές που ελέγχουν την ενεργότητα, τοπολογία και φαρμακολογική ευαισθησία της μιτοχονδριακής HK2 εξωκίνησης.

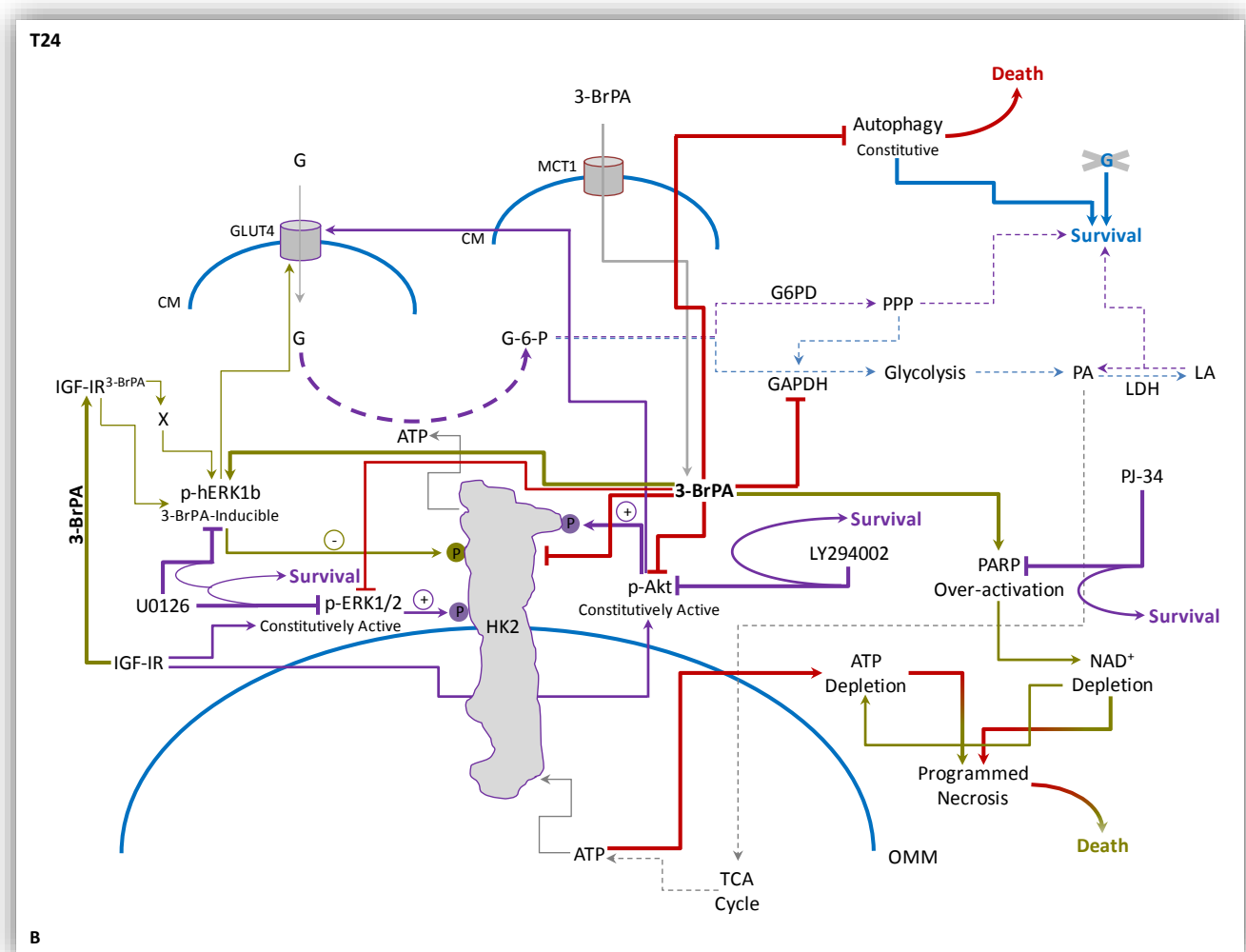
Δεδομένου ότι ο U0126 ειδικός αναστολέας των MEK1/2 (MAPKK1/2) κινασών σερίνης/θρεονίνης -ανωροϊκών ρυθμιστών των p44/42 MAPK (ERK1/2) κινασών σερίνης/θρεονίνης- μπορεί και διασώζει τα T24 κύτταρα από το νεκρωτικό στρες του 3-BrPA, αναδεικνύεται σθεναρά η προωθητική συμμετοχή του ERK1/2-εξαρτώμενου μονοπατιού σηματοδότησης στην κυτταροτοξική δυναμική του 3-BrPA. Είναι ενδιαφέρον ότι η δράση του U0126 μπορεί και καταργεί όχι μόνο την σηματοδοτική ενεργότητα των ERK1/2 κινασών, αλλά και αυτήν της υψηλότερου μοριακού βάρους φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης των ~47 kDa, αποδεικνύοντας έτσι ότι η εν λόγω πρωτεΐνη αποτελεί ενεργό ισομορφή των ERK1/2 μελών της οικογένειας. Χωρίς να αποκλείουμε το σενάριο της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης τύπου πυρουβλίωσης, είναι πιθανόν ότι η υπό μελέτη νέα ισομορφή προέρχεται από μία φαρμακο-επαγόμενη διαδικασία εναλλακτικού ματίσματος (*alternative splicing*), όπως ακριβώς έχει προταθεί και για την 46 kDa ERK1b κινάση στα τρωκτικά, η οποία έχει βρεθεί να εμφανίζει ισχυρά διαφοροποιημένες ενζυμικές ενεργότητες και τοπολογία από το πρωτότυπο πατρικό μέλος [141]. Σε συμφωνία, μία ERK-προσομοιάζουσα πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 50 kDa, έχει ανιχνευθεί στον ποντικό να αναστέλλεται λειτουργικά παρουσία U0126, ενώ για τον σχηματισμό αυτής ως μία νέα ERK ισομορφή έχει -πάλι- ενοχοποιηθεί ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος μεταγράφου [602]. Η δυνατότητα, λοιπόν, του 3-BrPA να επάγει ισχυρά, στις νεκρωτικές δόσεις, την παραγωγή της hERK1b ισομορφής, και η ευπάθεια αυτής να καταστέλλεται λειτουργικά παρουσία U0126, το οποίο αντισταθμίζει -μερικώς- το κυτταροτοξικό δυναμικό του 3-BrPA, αποδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο της hERK1b κινάσης στο νεκρωτικό δυναμικό του φαρμάκου.

Ως εκ τούτου, στην προσπάθεια ανάπτυξης ενός πραγματικά ενιαίου και μηχανιστικού μοντέλου που να περιγράφει όλα τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης και για τους δύο βαθμούς κακοήθειας των RT4 [χαμηλός (I)] και T24 [υψηλός (III)]

κυττάρων, προτείνονται τα ακόλουθα: (Α) Η έλλειψη συστατικής ενεργοποίησης των IGF-IR/Akt-GSK-3 και p44/42 MAPK μονοπατιών σηματοδότησης στα RT4 κύτταρα επιτρέπει την απουσία φωσφορυλίωσης της HK2 εξωκινάσης και την αγκυροβόληση αυτής στο μιτοχόνδριο, με τρόπο που η παραγωγή των G-6-P γλυκολυτικών προϊόντων να μην οδηγεί σε ανάδρομη αρνητική ρύθμιση του ενζύμου, αλλά να μπορεί να προάγει τον κατωροϊκό γλυκολυτικό μεταβολισμό. Έτσι, το 3-BrPA δεν μπορεί να επηρεάσει με οποιοδήποτε τρόπο την μη-φωσφορυλιωμένη HK2 εξωκινάση, ενώ δύναται να προκαλεί την αποικοδόμηση του GAPDH ενζύμου, γεγονός που, αν και παρεμποδίζει την περαιτέρω προαγωγή της γλυκόλυσης, αφήνει άθικτη τη διαδικασία του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (*PPP: pentose phosphate pathway*), η οποία μπορεί και υποστηρίζει την μεταβολική δραστηριότητα και επιβίωση των RT4 κυττάρων παρουσία του φαρμάκου. Αντίθετα, η απουσία γλυκόζης, η οποία οδηγεί τα RT4 στον θάνατο, διαμορφώνει ένα τέτοιο κυτταρικό περιβάλλον παντελούς έλλειψης G-6-P και επακόλουθης παρεμπόδισης λειτουργίας τόσο του μονοπατιού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης όσο και αυτών της γλυκόλυσης και των φωσφορικών πεντοζών. Η μη-φωσφορυλιωμένη και ενδεχομένως χαμηλής ενεργότητας HK2 ισομορφή θα μπορούσε να συσχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του παράτυπου GLUT4 υποδοχέα (~30 kDa), όπου η μειωμένη HK2 ενζυμική λειτουργία θα αντισταθμίζεται από την μαζική εισροή γλυκόζης στα εν λόγω κύτταρα (**Εικόνα 4.3Α**). (Β) Όσον αφορά στα T24 (και T24-X) κύτταρα, οι συστατικώς ενεργοποιημένοι IGF-IR/Akt-GSK-3 και p44/42 MAPK σηματοδοτικοί άξονες επιβάλλουν την συστατική φωσφορυλίωση της HK2 εξωκινάσης και την επακόλουθη παραμονή αυτής στην μιτοχονδριακή μεμβράνη, με τρόπο που να εξασφαλίζεται η αποδοτικότερη παραγωγή του G-6-P γλυκολυτικού προϊόντος, αλλά και η ειδική και στοχευμένη αναστολή της εν λόγω ισομορφής (φωσφορυλιωμένης HK2) από το 3-BrPA. Η ταυτόχρονη ισχυρή μειορρύθμιση και αποικοδόμηση των p-HK2 και GAPDH ενζύμων, αντίστοιχα, υπό τη δράση του φαρμάκου, σε συνδυασμό με την ισχυρή παρεμπόδιση της συστατικής αυτοφαγίας (του «αυτοφαγικού εθισμού»), δεν επιτρέπουν τη διάσωση κανενός βιο-ενεργειακού μονοπατιού, γεγονός που οδηγεί τελικά τα T24 κύτταρα στον θάνατο. Η επαγωγή της p-hERK1b κινάσης στις νεκρωτικές δόσεις του 3-BrPA, ενδεχομένως προκαλούμενη από τις φαρμακο-ειδικές μορφές των p-IGF-IR/p-IR υποδοχέων, σε συνδυασμό με την φαρμακο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του εναλλακτικού ματίσματος ERK

μεταγράφου, επιτρέπει τη διαμόρφωση της υπόθεσης ότι η hERK1b μπορεί και φωσφορυλιώνει την HK2 εξωκινάση με τρόπο που να αλλοιώνει την ενζυμική λειτουργία και ενδοκυτταρική τοπολογία αυτής. Μάλιστα, θα μπορούσε να αποτελεί και κρίσιμο καταωροϊκό στόχο του «X» σηματοδοτικού στοιχείου, το οποίον λαμβάνοντας σήματα από τις φαρμακο-ειδικές μορφές των p-IGF-IR/p-IR υποδοχέων, μέσω ανθεκτικών στο 3-BrPA PI3K ισομορφών, μπορεί και φωσφορυλιώνει/ενεργοποιεί την φαρμακο-επαγόμενη hERK1b κινάση, η οποία τώρα επάγει «νεκρωτικού τύπου φωσφορυλίωση» στην HK2 πρωτεΐνη. Με άλλα λόγια, η ενεργοποιημένη από το «X» στοιχείο hERK1b «νεκρωτική κινάση» φωσφορυλιώνει διαφορετικά την υπο-φωσφορυλιωμένη ή μη-φωσφορυλιωμένη HK2 εξωκινάση (λόγω φαρμακο-επαγόμενης μειορρύθμισης των p-Akt και p-p44/42 MAPK κινασών), ώστε να διασφαλίσει τόσο την λειτουργική της καταστολή όσο και την μετακίνησή της στο κυτταρόπλασμα, όπου θα μπορούσε περαιτέρω να αδρανοποιηθεί από τα υπάρχοντα G-6-P γλυκολυτικά προϊόντα (**Εικόνα 4.3B**).





**Εικόνα 4.3** Προτεινόμενο μηχανιστικό μοντέλο των εμπλεκόμενων μοριακών αποκρίσεων των RT4 (A) και T24 (B) κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στη δράση του 3-BrPA. *CM* (*Cell Membrane*): Κυτταρική μεμβράνη, *OMM* (*Outer Mitochondrial Membrane*): Εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, *Autophagy*: Αυτοφαγία, *Constitutive*: Συστατική, *Survival*: Επιβίωση, *Death*: Θάνατος, *PPP* (*Pentose Phosphate Pathway*): Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών, *G* (*Glucose*): Γλυκόζη, *Glycolysis*: Γλυκόλυση, *PA* [*Pyruvic Acid* (*Pyruvate*)]: Πυροσταφυλικό οξύ, *LA* [*Lactic Acid* (*Lactate*)]: Λακτικό οξύ, *TCA* (*Tricarboxylic Acid*) *cycle*: Κύκλος του τρι-καρβοξυλικού οξέος, *Inducible*: Επαγόμενη, *Constitutively active*: Συστατικώς ενεργή(ός), *Depletion*: Εξασθένιση επιπέδων, *Over-activation*: Υπερ-ενεργοποίηση και *Programmed Necrosis*: Προγραμματισμένη νέκρωση.

Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής εντοπίζεται στην αντίστροφη σχέση της ευαισθησίας των κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στο 3-BrPA με την ευαισθησία αυτών στην απουσία

γλυκόζης. Δηλαδή, όσα κύτταρα είναι ανθεκτικά στο 3-BrPA αποκαλύπτονται ιδιαίτερα εύαλωτα στην έλλειψη γλυκόζης (RT4 και RT112) και αντίστροφα (T24, T24-X και TCCSUP). Παρόμοιες αναστροφές συσχετίσεις έχουν αναφερθεί και για τα HCT116 και DLD1 κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου [468], στα οποία μάλιστα διαφάνηκε η καθοριστική συμμετοχή του γονιδιακού υποβάθρου των K-Ras (G13D) και B-Raf (V600E) μεταλλαγών [468]. Όμως, η ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA των αντίστοιχων γενετικών τόπων και στους πέντε υπό μελέτη τύπους κυττάρων ανθρώπινου καρκίνου ουροδόχου κύστης αποκάλυψε την απουσία ύπαρξης των εν λόγω μεταλλαγών, γεγονός που προφανώς αποσυνδέει μηχανιστικά τη σχέση ανάπτυξης ευαισθησίας στο 3-BrPA (και ανθεκτικότητας στην απουσία γλυκόζης) με μεταλλαγμένους K-Ras και B-Raf φαινοτύπους. Η ικανότητα, λοιπόν, των T24 (και T24-X) κυττάρων να επιβιώνουν σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης θα μπορούσε να αιτιολογηθεί από τη λειτουργία του συστατικώς ενεργοποιημένου αυτοφαγικού μηχανισμού («αυτοφαγικού εθισμού»), ο οποίος τώρα απουσία δράσης όλων των βιο-ενεργειακών μονοπατιών (οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, γλυκόλυσης και φωσφορικών πεντοζών) θα ήταν ικανός να υποστηρίξει, μέσω ρυθμιζόμενης υδρόλυσης υποστρωμάτων που εκλύουν ενέργεια, αλλά και βιοσυνθέτουν/παράγουν γλυκόζη (όπως το γλυκογόνο), την περαιτέρω επιβίωση (αλλά ακόμα και ανάπτυξη) των υψηλού βαθμού κακοήθειας ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων. Στην κατεύθυνση αυτή, η μέσω της συστατικής φωσφορυλίωσης (από τις p-Akt και p-p44/42 MAPK κινάσες) υψηλή ενζυμική ενεργότητα της HK2 εξωκινάσης στα T24 (και T24-X) κύτταρα θα μπορούσε, ενδεχομένως, να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα βιοσύνθεσης G-6-P προϊόντων, τα οποία, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα των RT4, θα μπορούσαν όχι μόνο να επιβάλλουν έναν ισχυρό γλυκολυτικό φαινότυπο, αλλά και να οδηγούν στον αντίστροφο δρόμο της αποθήκευσης της γλυκόζης σε γλυκογόνο (γλυκογονογένεση), αποτρέποντας συγχρόνως την -πιθανώς- ανάδρομη αναστολή της HK2 (αν και φωσφορυλιωμένη) από τις υψηλές συγκεντρώσεις του G-6-P μορίου. Ως εκ τούτου, τα T24 (και T24-X) κύτταρα επιβιώνουν σε συνθήκες απουσίας γλυκόζης επειδή μπορούν και κινητοποιούν τις ενδοκυτταρικές αποθήκες και εφεδρείες γλυκογόνου (όπως αυτές διαμορφώνονται από φαινόμενα «σηματοδοτικού εθισμού»), μέσω στοχευμένης υδρόλυσης αυτού (γλυκογόνου) από τα συστατικώς ενεργοποιημένα αυτοφαγικά του κακοήθους ουροθηλίου. Μάλιστα, η εν δυνάμει συγκριτικά υψηλότερη γλυκολυτική απόδοση της HK2, ενδεχομένως,

συσχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του παράτυπου GLUT4 υποδοχέα στα T24 κύτταρα, ώστε να αποφεύγεται η υπερβολική σύνθεση G-6-P που θα μπορούσε να αναστείλει ανάδρομα ακόμα και την μιτοχονδριακή HK2 εξωκινάση. Συμπερασματικά, οι νεκρωτικές δόσεις του 3-BtPA προκαλούν είτε στόχευση του φαρμάκου στην φωσφορυλιωμένη (μιτοχονδριακή) HK2 και μετακίνηση αυτής στο κυτταρόπλασμα, είτε στόχευση του φαρμάκου στην φωσφορυλιωμένη (ενεργό) Akt, επακόλουθη μειορρύθμιση αυτής, και -πάλι- μετακίνηση της (υποφωσφορυλιωμένης/μη-φωσφορυλιωμένης) HK2 στο κυτταρόπλασμα. Συγχρόνως, η hERK1b προάγει και αυτή την απελευθέρωση της HK2 από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα, δια μέσου διαφορετικής φωσφορυλίωσης και, πιθανώς, «λειτουργικής ανασχεσης» των δράσεων («γλυκολυτικής επιβίωσης») που προκαλούνται από τις Akt και p44/42 MAPK διαμεσολαβούμενες, αντίστοιχες, φωσφορυλίωσεις. Τελικά, η κυτταροπλασματική HK2 εξωκινάση υποβάλλεται σε περαιτέρω λειτουργική αναστολή από το G-6-P γλυκολυτικό προϊόν, όπως αυτό συσσωρεύεται από την αποικοδόμηση του GAPDH γλυκολυτικού ενζύμου, μέσω του 3-BtPA, στο υψηλής κακοήθειας καρκινικό ουροθήλιο. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι ο φαινότυπος του «σηματοδοτικού εθισμού» συνεργάζεται αρμονικά με αυτόν του «αυτοφαγικού εθισμού», με τρόπο που και οι δύο να συγκλίνουν στην ανάπτυξη ενός ισχυρού χαρακτήρα «γλυκολυτικού εθισμού», ο οποίος υπό τη δράση του “*Warburg effect*” διαμορφώνει ειδικού τύπου περιβάλλοντα κακοήθους ουροθηλίου με ιδιαίτερα υψηλή ευπάθεια στο 3-BtPA.

Τα υψηλά συστατικά επίπεδα της ενεργοποιημένης AMPK κινάσης, όπως αυτά καθορίζονται από την συστατική φωσφορυλίωση στο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνη στη θέση 172 (*Thr*<sup>172</sup>), επιβεβαιώνουν αδιαμφισβήτητα την ενεργοποίηση κυτταρο-ειδικών γλυκολυτικών προγραμμάτων τόσο στα RT4 όσο και στα T24 κύτταρα. Ωστόσο, η αδυναμία περαιτέρω αυξορρύθμισης, αλλά αντίθετα δραστηκής μειορρύθμισης, της p-AMPK (ενεργού) κινάσης στις νεκρωτικές δόσεις του 3-BtPA στα T24 (και T24-X) κύτταρα, οι οποίες (δόσεις) προκαλούν δραματική ελάττωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ATP και σύγχρονη αύξηση των αντίστοιχων του ADP μορίου, όπως συνήθως παρατηρείται σε περιπτώσεις βιο-ενεργειακού στρες και απώλειας επάρκειας ATP [149, 150], αποδεικνύει την ικανότητα του εν λόγω φαρμάκου να καταργεί δραστικά την ακεραιότητα των σηματοδοτικών εκείνων

δικτύων άμυνας που διασφαλίζουν τις απαραίτητες συνθήκες για την επιβίωση και ανάπτυξη των κυττάρων του καρκινικού ουροθηλίου σε συνθήκες στέρησης ATP.

Η γενικευμένη κατάρρευση του κακοήθους ουροθηλιακού «σηματοδοσώματος» (“*signalosome*”) επιβεβαιώνεται από την δοσο-εξαρτώμενη ισχυρή μειορρύθμιση της ενεργοποιημένης mTOR κινάσης σερίνης/θρεονίνης, καθώς και της φωσφορυλιωμένης S6 ριβοσωμικής πρωτεΐνης, ως ενός κρίσιμου κατωροϊκού μεταγωγέα σήματος (*signal transducer*) αυτής (mTOR), ο οποίος αντανakλά άμεσα τον βαθμό ενεργοποίησης της S6K κινάσης σερίνης/θρεονίνης [461]. Η συστατική φωσφορυλίωση της S6 πρωτεΐνης τόσο στα RT4 όσο και στα T24 (και T24-X) κύτταρα αντανakλά, ενδεχομένως, την απαίτηση υψηλής απόδοσης της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής, η οποία, όμως, φαίνεται να αντισταθμίζεται μερικώς από τα -αρνητικής επίδρασης- συστατικά επίπεδα έκφρασης του φωσφορυλιωμένου eIF2α παράγοντα έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Στην προσπάθεια «συστημικής» ταξινόμησης των δομικών και λειτουργικών αλλαγών που επάγονται από το 3-BrPA στο υπό εξέταση πρωτέωμα (*proteome*) και μεταγράφομα (*transcriptome*) του ανθρώπινου καρκινικού ουροθηλίου (T24 και T24-X), θα μπορούσαν να διακριθούν οι ακόλουθοι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί δοσο-εξαρτώμενης απόκρισης στην κυτταροτοξική (αποπτωτική/νεκρωτική) δράση του φαρμάκου: (Α) πρωτεολυτική διάσπαση (Κασπάση-8, Κασπάση-9, Κασπάση-3, PARP, Lamin A/C, ICAD, CAD και p-IGF-IRβ-Tyr<sup>1131</sup>/IRβ-Tyr<sup>1146</sup>), (Β) πρωτεϊνική μειορρύθμιση/αποικοδόμηση «συνολικής» (“*total*”) πρωτεΐνης (CAD, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1, LC3B-I, IGF-IRα, FoxO1, GSK-3α, p38 MAPK, AMPKα, mTOR, S6, eIF2α, H2AX, p53, AS160, Rab10, Tug, HK2, GAPDH και GLUT4), (Γ) πρωτεϊνική μειορρύθμιση/αποικοδόμηση φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης (p-IGF-IRβ-Tyr<sup>1131</sup>/IRβ-Tyr<sup>1146</sup>, p-Akt-Thr<sup>308</sup>, p-Akt-Ser<sup>473</sup>, p-FoxO1-Thr<sup>24</sup>/FoxO3a-Thr<sup>32</sup>, p-GSK-3α/β-Ser<sup>21/9</sup>, p-GSK-3β-Ser<sup>9</sup>, p-p44/42 MAPK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, p-p38 MAPK-Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>, p-AMPKα1-Ser<sup>485</sup>/AMPKα2-Ser<sup>491</sup>, p-AMPKα-Thr<sup>172</sup>, p-mTOR-Ser<sup>2448</sup>, p-S6-Ser<sup>235/236</sup>, p-eIF2α-Ser<sup>51</sup>, p-p53-Ser<sup>15</sup> και p-AS160-Thr<sup>642</sup>), (Δ) πρωτεϊνική επαγωγή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης (p-IGF-IRβ-Tyr<sup>1131</sup>/IRβ-Tyr<sup>1146</sup>, p-Akt-Thr<sup>308</sup>, p-p44/42 MAPK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, p-mTOR-Ser<sup>2448</sup> και p-H2AX-Ser<sup>139</sup>), (Ε) μετα-μεταφραστική τροποποίηση -τύπου πυρουβύλιωσης, φωσφορυλίωσης, παρυλίωσης, ακετυλίωσης, ουμπικουϊτινίωσης- «συνολικής» (“*total*”) πρωτεΐνης (ICAD, Bcl-X<sub>L</sub>, p44/42 MAPK, mTOR, HK2 και hnRNP K), (ΣΤ) εναλλακτικό

μάτισμα μεταγράφου (p-IGF-IRβ-Tyr<sup>1131</sup>/IRβ-Tyr<sup>1146</sup>, p-p44/42 MAPK-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, mTOR, p-mTOR-Ser<sup>2448</sup>, HK2 και hnRNP K), (Z) μεταγραφική μειορρύθμιση γονιδίου (*cIAP-1*, *cIAP-2*, *Survivin*, *XIAP*, *Rab2A*, *Rab8A*, *Rab14*, *GLUT1* και *GLUT3*), (H) γονιδιακή ενεργοποίηση μεταγραφής (*Rab2A*, *Rab8A*, *Rab14*, *GLUT3*, *GLUT4* και *FasL*), (Θ) αποσιώπηση ματίσματος εξωνίου (*ESS: exon splicing silencing*) (*GLUT4* και *G6PD*) και (I) καταστολή NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) μηχανισμού (*GLUT4*).

Δεδομένου ότι ουσιαστικά οποιαδήποτε μορφή -ενδογενούς ή εξωγενούς- στρες θα μπορούσε, εν δυνάμει, να ενεργοποιεί τον p53 μεταγραφικό παράγοντα, ως κρίσιμο αισθητήρα της γονιδιωματικής ακεραιότητας, δεν εκπλήσσει το γεγονός πως οι μεταβολικές αποκρίσεις που σχετίζονται με διατροφική ένδεια, υποξία και βιο-ενεργειακή κρίση εμπλέκουν την ενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης και των γονιδίων στόχων αυτής [183]. Η δυνατότητα της p53 να συνδέεται ισχυρά στα ομοειδή DNA *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία αυτής παρουσία υψηλών ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ADP, και να αποσυνδέεται από αυτά υπό την επίδραση υψηλών επιπέδων ATP [603], την καθιστά, επιπλέον, καθοριστικό μοριακό αισθητήρα της βιο-ενεργειακής επάρκειας και μεταβολικής ακεραιότητας του κυττάρου. Παρ' όλα αυτά, στο κυτταρικό περιβάλλον του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου (T24), το 3-BrPA, αν και προκαλεί δραματική ελάττωση των ενδοκυτταρικών ATP εφεδρειών, αδυνατεί να ενεργοποιήσει τόσο την ενδογενή μεταλλαγμένη (p53-ΔY<sup>126</sup>), όσο και την -παροδικά- διαμολυσμένη (*-transient- transfected*) φυσικού τύπου p53 ανθρώπινη πρωτεΐνη. Αντίθετα, επάγει μία δοσο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση τόσο της συνολικής όσο και της -συστατικώς- φωσφορυλιωμένης αντίστοιχης -φυσικού τύπου- p53 ισομορφής, γεγονός που αποκαλύπτει ότι το 3-BrPA δρα με διττό τρόπο στην εξόντωση του ανθρώπινου κακοήθους ουροθηλίου: όχι μόνο προκαλεί ισχυρή γονιδιωματική τοξικότητα, όπως διαφαίνεται από την φαρμακο-ειδική συσσώρευση της p-H2AX-Ser<sup>139</sup> ιστόνης, αλλά μέσω της ισχυρής μειορρύθμισης της p53 πρωτεΐνης ακυρώνει τους βασικούς μηχανισμούς άμυνας που αφορούν στην ανίχνευση και επιδιόρθωση των δημιουργούμενων δομικών αλλοιώσεων και βλαβών, με αποτέλεσμα το κύτταρο, πλέον, να καταρρέει συνολικά με ταχύτατο, δραματικό και ανεπίστρεπτο τρόπο. Ως εκ τούτου, δεν είναι το διακριτό p53 γονιδιακό προφίλ αυτό που ελέγχει την διαφορική ευαισθησία των RT4 και T24 (και T24-X) κυττάρων στο 3-BrPA (αλλά και στην έλλειψη γλυκόζης), αλλά, όπως -επίσης- διαφαίνεται από τις



φαρμακολογικές (3-BrPA) και μεταβολικές (στέρηση γλυκόζης) ιδιαιτερότητες των RT112 και TCCSUP, είναι ο διαφορετικός βαθμός κακοήθειας των κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου αυτός που καθιστά τους καρκινικούς πληθυσμούς ευάλωτους στο 3-BrPA. Υψηλής κακοήθειας κύτταρα (T24, T24-X και TCCSUP) παρουσιάζουν μεγάλη ευπάθεια στο φάρμακο, ενώ χαμηλής κακοήθειας κύτταρα (RT4 και RT112) εμφανίζονται ουσιαστικά ανεπηρέαστα από την κυτταροτοξική δράση αυτού. Η αδυναμία του 3-BrPA να ενεργοποιεί την p53 πρωτεΐνη στο περιβάλλον των HCT116-p53<sup>+/+</sup> κυττάρων, σε συνδυασμό με την συγκριτικά υψηλότερη ανθεκτικότητα της HCT116-p53<sup>-/-</sup> ισογονιακής (*isogenic*) κυτταρικής σειράς στο εν λόγω φάρμακο, αναδεικνύουν τον μη-θεμελιώδη (*non-essential*) ή πλεονάζοντα (*redundant*) βιολογικό ρόλο του p53 μεταγραφικού παράγοντα στην, επαγόμενη από το 3-BrPA, κατάρρευση της μεταβολικής ομοιόστασης του καρκίνου τόσο της ουροδόχου κύστης όσο και του παχέος εντέρου. Είναι εντυπωσιακό, ότι παρ' όλη την αδυναμία του 3-BrPA να ενεργοποιεί την φυσικού τύπου p53 πρωτεΐνη, αποδεικνύεται ικανό να συνεργάζεται αποδοτικά με την ενεργοποιημένη μορφή αυτής και να θανατώνει ισχυρά σε μη-νεκρωτικές δόσεις τα υψηλής (T24 και T24-X), αλλά όχι τα χαμηλής (RT4), κακοήθειας κύτταρα του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Δεδομένης της πλέον ευρέως αποδεκτής ικανότητας του PRIMA-1 να συνδέεται ομοιοπολικά με μεταλλαγμένες μορφές του p53 μεταγραφικού παράγοντα, αποκαθιστώντας την ογκο-κατασταλτική τους ενεργότητα [467], ενδεικνύεται η ισχυρή συνεργατική δράση του 3-BrPA και της επανενεργοποιημένης (*re-activated*) - «φυσικού τύπου»- p53 μορφής, η οποία (δράση) προφανώς αποτελεί μία ισχυρή προκλινική πλατφόρμα για την ανάπτυξη νέων, επιτυχημένων, ασφαλών και στοχευμένων στον υψηλού βαθμού κακοήθειας, και φέροντα μεταλλαγές στον p53 γονιδιακό τόπο, ανθρώπινο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Η ανθεκτικότητα των RT4 κυττάρων (φυσικού τύπου p53) στο PRIMA-1 και η φαρμακο-εξαρτώμενη επαγωγή του MDM2 γονιδίου στόχου της (επαν)ενεργοποιημένης p53 πρωτεΐνης στα T24 κύτταρα (μεταλλαγμένου τύπου p53) αποδεικνύουν εμφανώς την ειδικότητα της μοριακής δράσης του φαρμάκου. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η, μέσω του PRIMA-1, επανενεργοποίηση (επαναφορά στην «φυσικού τύπου» στερεοδιάταξη) της μεταλλαγμένης p53-ΔY<sup>126</sup> μορφής μπορεί και ενισχύει σημαντικά το κυτταροτοξικό δυναμικό του 3-BrPA στα κύτταρα του κακοήθους ουροθηλίου (T24 και T24-X), χωρίς αυτό να αποκλείει και p53-ανεξάρτητες αποκρίσεις στη δράση του PRIMA-1.

Η νεκρωτική, συγκριτικά με την αποπτωτική, ισχύ του 3-BrPA στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο αποδεικνύεται να συσχετίζεται άρρηκτα με την: (Α) απουσία ενεργού Κασπάσης-8 (και όλου του ρεπερτορίου των Κασπασών), (Β) υπερ-ενεργοποίηση της PARP πρωτεΐνης, (Γ) μη-αποικοδόμηση, αλλά πυρουβλίωση ή παρυλίωση ή ουμπικουϊτινίωση, του ICAD αναστολέα, (Δ) πρωτεόλυση της CAD νουκλεάσης, (Ε) πυρουβλίωση ή φωσφορυλίωση της Bcl-X<sub>L</sub> πρωτεΐνης, (ΣΤ) μεταγραφική καταστολή των *cIAP-1*, *cIAP-2* και *XIAP* γονιδίων (εν δυνάμει συνεργατικός ρόλος της απουσίας ενεργού Κασπάσης-8 και *cIAP-1/2* στον σχηματισμό λειτουργικού νεκροσώματος/νεκροπρωσώματος), (Ζ) απώλεια της LC3B-I αυτοφαγικής πρωτεΐνης (κατάργηση αυτοφαγίας), (Η) κατάρρευση του σηματοδοτικού ιστού και σύγχρονη ενεργοποίηση παράτυπων σηματοδοτικών μονοπατιών, (Θ) επαγωγή σύνθεσης παράτυπων φωσφορυλιωμένων μορφών των IGF-IR/IR υποδοχέων, των p44/42 MAPK κινασών (hERK1b) και της mTOR κινάσης, (Ι) μειορρύθμιση των Rab10 και Tug γλυκολυτικών πρωτεϊνών, (Κ) πυρουβλίωση ή ουμπικουϊτινίωση της HK2 εξωκινάσης (χωρίς να αποκλείεται το διαφορετικό σενάριο εναλλακτικού ματίσματος), (Λ) αποικοδόμηση του GAPDH γλυκολυτικού ενζύμου, (Μ) μεταγραφική καταστολή των *Rab2A*, *Rab8A*, *Rab14*, *GLUT1* και *GLUT3* μεταβολικών γονιδίων, (Ν) πυρουβλίωση (χωρίς να αποκλείεται το διαφορετικό σενάριο εναλλακτικού ματίσματος ή τριμερισμού) της hnRNP K πρωτεΐνης και (Ξ) εξάντληση των διαθέσιμων ενδοκυτταρικών αποθεμάτων ATP.

Η αντι-γλυκολυτική δυναμική του 3-BrPA στο κακόηθες ουροθήλιο (T24), που καταλήγει σε δραματική ελάττωση των διαθέσιμων ATP επιπέδων, αποδίδεται κυρίως στην: (Α) λειτουργική και τοπολογική αλλοίωση της HK2 εξωκινάσης, (Β) μειορρύθμιση/αποικοδόμηση του GAPDH γλυκολυτικού ενζύμου, του GLUT4 μεταφορέα γλυκόζης, καθώς και των Rab10 και Tug ενδοκυτταρικών ρυθμιστών στόχευσης της GLUT4 πρωτεΐνης στη μεμβράνη, με την φαρμακο-επαγόμενη απώλεια της AS160 πρωτεΐνης (αρνητικός ρυθμιστής μετακίνησης του GLUT4 κυστιδίου στην μεμβράνη) να διαδραματίζει, ενδεχομένως, αντισταθμιστικό ρόλο, και (Γ) καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων *Rab2A*, *Rab8A*, *Rab14* (ρύθμιση στόχευσης της GLUT4 στη μεμβράνη), *GLUT1* και *GLUT3* που ελέγχουν την ομοιόσταση της γλυκόζης, με την κυτταρο-ειδική έκφραση των *GLUT1* και *GLUT3* γονιδίων να σφραγίζει τις μεταβολικές ιδιαιτερότητες των RT4 (συγκριτικά

υψηλότερη *GLUT1* έκφραση) και T24 (και T24-X) (συγκριτικά υψηλότερη *GLUT3* έκφραση) κυττάρων μεταξύ τους.

Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η ισχυρή σηματοδοτική κατάρρευση και μεταγραφική καταστολή στις νεκρωτικές δόσεις του 3-BrPA είναι απλά ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα της απώλειας διαθέσιμου ενδοκυτταρικού ATP, το οποίο αποτελεί καθοριστικό τροφοδοτικό στοιχείο για τους μηχανισμούς φωσφορυλίωσης πρωτεΐνης και παραγωγής RNA μεταγράφου. Πειστικά επιχειρήματα έναντι αυτής της συσχέτισης είναι: (Α) ο σχηματισμός ισχυρά φωσφορυλιωμένων ισομορφών των IGF-IR/IR υποδοχέων και των p44/42 MAPK κινασών σερίνης/θρεονίνης, (Β) η άθικτη και ουσιαστικά ανεπηρέαστη μεταγραφική δραστηριότητα του *GAPDH* γονιδίου (και *Noxa* γονιδίου, μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα) σε όλες τις δόσεις του φαρμάκου (χωρίς να αποκλείεται το εναλλακτικό σενάριο της υψηλής σταθερότητας RNA μεταγράφου), (Γ) η ισχυρή δοσο-εξαρτώμενη μεταγραφική επαγωγή του *FasL* γονιδίου (χωρίς να αποκλείεται το εναλλακτικό σενάριο της φαρμακο-επαγόμενης σταθεροποίησης RNA μεταγράφου) και (Δ) η ισχυρή ενεργοποίηση του μηχανισμού αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου (*ESS*) του *GLUT4* γονιδίου σε αποπτωτικές και νεκρωτικές δόσεις φαρμάκου.

Ίσως, το πλέον ενδιαφέρον και εντυπωσιακό εύρημα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτελεί η ικανότητα του 3-BrPA να προκαλεί κυτταροειδική και δοσο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του μηχανισμού αποσιώπησης ματίσματος εξωνίου, ευρέως γνωστού ως *ESS*. Με βάση την υπάρχουσα γνώση, είναι η πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία που ένα μη-φυσικό συνθετικό χημικό μόριο, ή φάρμακο, μπορεί και καταστέλλει την συνολική διαδικασία ματίσματος (*splicing*) ενός ολόκληρου γονιδίου, όπως αυτό του *GLUT4* στο κακόηθες ουροθήλιο, και όχι επιλεγμένου -«εξωνικού/εσωνικού»- τμήματος αυτού [604]. Φαίνεται, ότι το 3-BrPA, ενώ στα RT4 μπορεί και επάγει την ενεργοποίηση τόσο της μεταγραφής του *GLUT4* γονιδίου όσο και του *ESS* μηχανισμού του ομοειδούς RNA -πρόδρομου- μεταγράφου, στα T24 και T24-X εμφανίζεται να εμπλέκεται συγκριτικά περισσότερο στην φαρμακο-επαγόμενη *ESS* αυξορρύθμιση, με τα T24-X να χαρακτηρίζονται από ισχυρότερους φαινοτύπους, σε σχέση με τα T24 κύτταρα, στις συνθήκες νεκρωτικής δράσης του φαρμάκου. Η εν λόγω, ιδιαίτερα σημαντική, διαφορά των T24 και T24-X στον βαθμό εκδήλωσης του *ESS* φαινομένου αντανάκλα, προφανώς, τις γενικότερες γονιδιακές, μεταγραφικές, σηματοδοτικές και γλυκολυτικές ιδιαιτερότητες των δύο

κυτταρικών τύπων μεταξύ τους, οι οποίες στο σύνολό τους ευθύνονται για την παρατηρούμενη συγκριτικά υψηλότερη ανθεκτικότητα των T24-X στο 3-BrPA. Σε συμφωνία, η λεπτομερής κυτταρογενετική (*cytogenetic*) μελέτη των T24 και T24-X καρυοτύπων (*karyotypes*) μεταξύ τους αποκάλυψε την κλωνική προέλευση της T24-X από την T24 πατρική κυτταρική σειρά, και την απόκτηση νέων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων (τύπου ελλείψεων, μεταθέσεων και διπλασιασμών) στα κρίσιμα, για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ανθρώπινα χρωμοσώματα 3 και 7, γεγονός που αποδεικνύει ότι το *in vivo* ανοσο-ανεπαρκές περιβάλλον των SCID ποντικών επέτρεψε την κλωνική επιλογή (*clonal selection*) και εμπλουτισμό (*enrichment*) καρκινικών πληθυσμών υψηλότερου βαθμού κακοήθειας και μεταστατικότητας από τους αντίστοιχους των πατρικών κυττάρων (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα). Δεδομένου ότι το εξόνιο 12 του *G6PD* mRNA μεταγράφου περιέχει ριβο(ζο)-νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (43-72 bp) που παρουσία αραχιδονικού οξέος οδηγούν σε αποσιώπηση ματίσματος του αντίστοιχου γονιδίου μέσω σύνδεσης των hnRNP K, L και A2/B1 ετερογενών πυρηνικών ριβο(ζο)-νουκλεοπρωτεϊνών [474], θα είχε ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον η, στατιστικά σημαντική, βιο-πληροφορική ανίχνευση *G6PD* ομόλογων αλληλουχιών της περιοχής του «αποσιωπητή» (“*silencer*”) στο μη-ματισμένο (*unspliced*) -πρόδρομο- *GLUT4* RNA, καθώς και η ταυτοποίηση ενδεχόμενων δομικών αλλοιώσεων της hnRNP πρωτεϊνικής οικογένειας. Αν και το δοσο-εξαρτώμενο προφίλ εμφάνισης των, από το 3-BrPA επαγόμενων, δομικών αλλαγών (πυρουβυλίωση ή τριμερισμός ή ενεργοποίηση εναλλακτικού ματίσματος) που ενδεχομένως οδηγούν στην απώλεια λειτουργικής ακεραιότητας της hnRNP K πρωτεΐνης δεν ταυτίζεται με το αντίστοιχο εκδήλωσης του ESS μηχανισμού, αυτό δεν αποκλείει την πιθανότητα καθοριστικής συμμετοχής της hnRNP K στην αποσιώπηση ματίσματος εξωνίου του *GLUT4* RNA μεταγράφου στα κύτταρα του κακοήθους ουροθηλίου. Αν και ο ESS μηχανισμός εμφανίζει έντονο γονιδιο-ειδικό χαρακτήρα, εντούτοις, δύναται να ενεργοποιείται εκτός από το 3-BrPA και από την Taxol, γεγονός που ενδεχομένως συσχετίζεται με την ανάγκη μοριακής κίνησης του *GLUT4* κυστιδίου -προς την μεμβράνη- επάνω στην επιφάνεια δομημένων μικροσωληνίσκων, τα μονομερή συστατικά των οποίων αποτελούν κρίσιμους μοριακούς στόχους σύνδεσης της Taxol. Φαίνεται, δηλαδή, ότι το 3-BrPA και η Taxol, αν και έχουν διακριτούς πρωτογενείς στόχους, καταλήγουν να

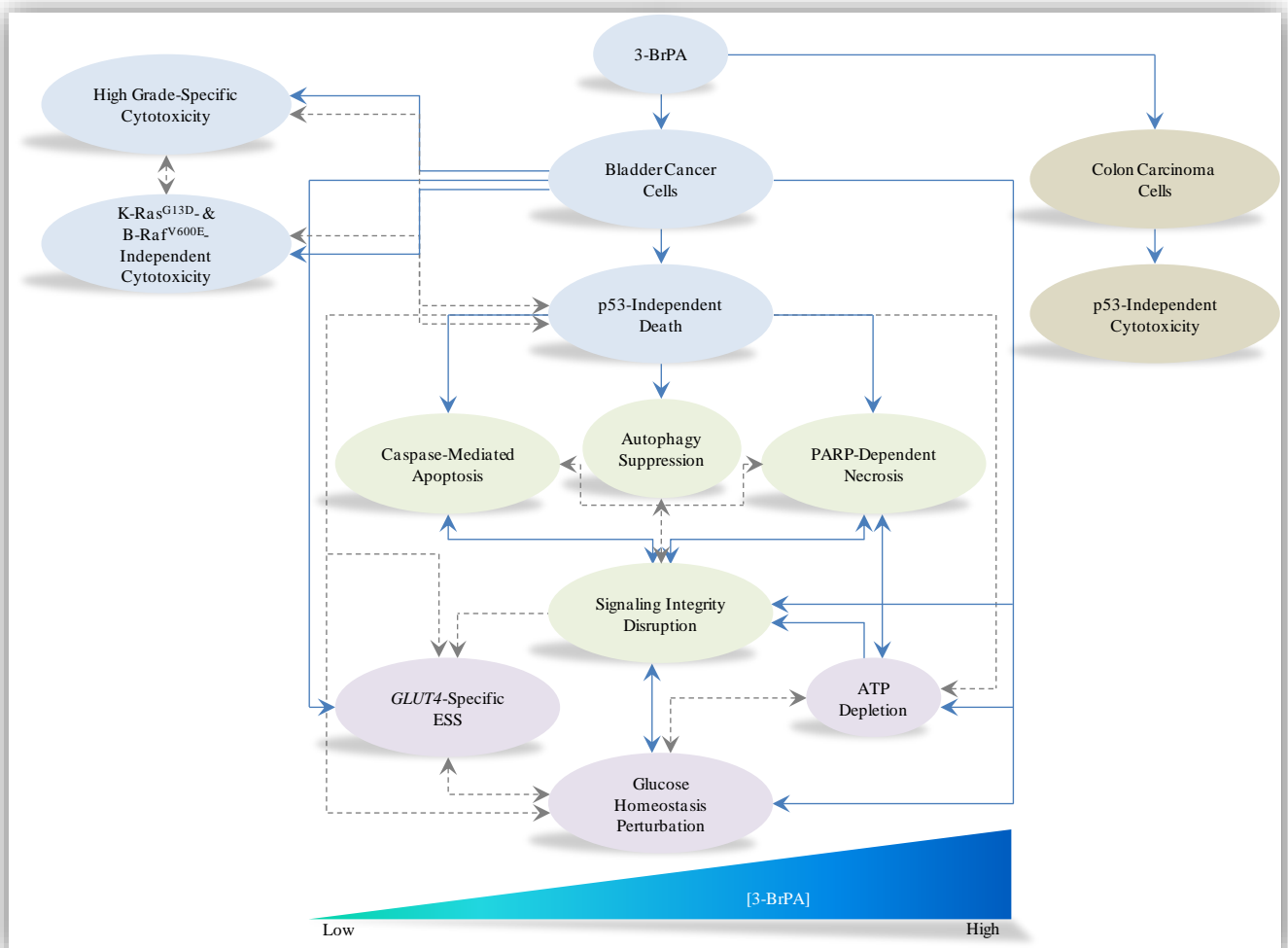
συγκλίνουν στο *GLUT4* ESS, στην προσπάθεια απόλυτης διασφάλισης της γλυκολυτικής κατάρρευσης.

Με βάση τον ρυθμιστικό μηχανισμό -ελέγχου ποιότητας μεταγράφου- NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), ο οποίος επιβάλλει την αποικοδόμηση mRNA μεταγράφων που φέρουν πρώιμα κωδικόνια τερματισμού της μετάφρασης (*PTC: premature termination codons*) [472], είναι πραγματικά εντυπωσιακό ότι το 3-BrPA επιτρέπει την υψηλή συσσώρευση ανεπεξέργαστων (μη-ματισμένων) πρόδρομων *GLUT4* RNA μεταγράφων τα οποία φέρουν πολλαπλά και παράτυπα PTC λόγω μη-απομάκρυνσης των «εσωνικών» («αντρονικών», “*intronic*”) αλληλουχιών τους (μη-παρουσιάσιμα αποτελέσματα). Ως εκ τούτου, είναι προφανές ότι το 3-BrPA απενεργοποιεί με ενδεχομένως γονιδιο-ειδικό τρόπο την NMD νουκλεολυτική μηχανή, πυρουβυλιώνοντας, πιθανώς, τα συστατικά αυτής, και οδηγώντας τελικά στον κυτταρικό θάνατο, ο οποίος προκαλείται από την συσσώρευση μεταλλαγμένων και τοξικών πρωτεϊνών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιδέξιας διαφυγής από τον NMD μηχανισμό είναι το RNA του RSV (*Rous sarcoma virus*) ιού, το οποίο μέσω ειδικών τριτοταγών δομών της RSE (*RSV stability element*) περιοχής σταθεροποίησης μεταγράφου απαγορεύει την αναγνώριση του *gag* PTC από τον Upr1 καθοριστικό παράγοντα της NMD μηχανής [473]. Υπό την προϋπόθεση εύρεσης ομόλογης(ων) με την RSE περιοχής(ών) στο πρόδρομο και μη-ματισμένο *GLUT4* RNA μετάγραφο, είναι πιθανόν ότι εκτός από την καταστροφή του NMD μηχανισμού, το 3-BrPA θα μπορούσε, εναλλακτικά, να επιτρέπει ειδικού τύπου διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που απλά να προστατεύουν το εν λόγω μετάγραφο, χωρίς, όμως, να επηρεάζουν την γενικότερη λειτουργική επάρκεια του NMD μονοπατιού.

Ολοκληρώνοντας την αξιολόγηση των δομικών αλλοιώσεων του πρωτεώματος του κακοήθους ουροθηλίου υπό την επίδραση του 3-BrPA, προτείνουμε και ένα νέο ρυθμιστικό επίπεδο αποσυντονισμένης δράσης των πυρουβυλιωμένων πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι η προσθήκη πυρουβυλικής ομάδας στο πολυ-σακχαρικό κλάσμα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση και σύνδεση πρωτεϊνών που φέρουν το χαρακτηριστικό *S-layer homology (SLH) domain* μοτίβο [605], θα είχε πραγματικά μεγάλο ενδιαφέρον να ταυτοποιηθούν αλληλεπιδράσεις πυρουβυλιωμένων πρωτεϊνών με πρωτεΐνες φέρουσες SLH δομές στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο, υπό τη δράση του 3-BrPA, αν και εφόσον αυτές υπάρχουν, αποτέλεσμα των οποίων θα ήταν η

αλλοιωμένη ενδοκυτταρική τοπολογία ή/και λανθασμένη διαμερισματοποίηση (*compartmentalization*) με προφανείς αρνητικές συνέπειες στην εκτέλεση του λειτουργικού τους (πυρροβυλιωμένων πρωτεϊνών) έργου.

Με βάση, λοιπόν, το αποπτωτικό, νεκρωτικό, αντι-αυτοφαγικό, αντι-σηματοδοτικό και αντι-γλυκολυτικό δυναμικό του 3-BrPA στα υψηλού βαθμού κακοήθειας κύτταρα του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης (**Εικόνα 4.4**), προτείνουμε την ανάπτυξη ενός νέου, ασφαλούς, επιτυχούς, στοχευμένου και βασισμένου στο 3-BrPA θεραπευτικού πρωτοκόλλου για την εν λόγω ασθένεια. Η δυνατότητα αυτού (πρωτοκόλλου) να συνεργάζεται αποδοτικά με το PRIMA-1 θα επιτρέψει περαιτέρω την εκλεκτική εξόντωση των κλωνικά επιλεγμένων εκείνων υποπληθυσμών κακοήθους ουροθηλίου που αναπτύσσουν p53 μεταλλάξεις οι οποίες συνήθως σχετίζονται με την ανάπτυξη χημειο-ανθεκτικότητας.



**Εικόνα 4.4** Διάγραμμα ροής των συστημικών κυτταροτοξικών δράσεων του 3-BrPA στο ανθρώπινο καρκινικό ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης. *High Grade-Specific Cytotoxicity*: Κυτταροτοξικότητα ειδική για τον υψηλό βαθμό κακοήθειας,

*Independent Cytotoxicity*: Κυτταροτοξικότητα ανεξάρτητη από, *Bladder Cancer Cells*: Καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης, *Colon Carcinoma Cells*: Καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, *Independent Death*: Θάνατος ανεξάρτητος από, *Caspase-Mediated Apoptosis*: Απόπτωση μεσολαβούμενη από Κασπάσες, *Autophagy Suppression*: Καταστολή αυτοφαγίας, *Dependent Necrosis*: Νέκρωση εξαρτώμενη από, *Signaling Integrity Disruption*: Διάρρηξη σηματοδοτικής ακεραιότητας, *Specific ESS*: Μηχανισμός ESS ειδικός στο, *ATP Depletion*: Εξασθένηση επιπέδων ATP, *Glucose Homeostasis Perturbation*: Διατάραξη ομοιόστασης γλυκόζης, *ESS (Exon Splicing Silencing)*: Αποσιώπηση ματίσματος εξωνίου, *Low*: Χαμηλή και *High*: Υψηλή.

*Επίλογος*



## Επίλογος

Αξιολογώντας και συνεκτιμώντας συνολικά όλα τα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής καθίσταται εμφανής η ανάγκη σύγκλισης στην κλινική πράξη του κυτταρικού και μοριακού χαρακτηρισμού του όγκου με την κατάλληλη επιλογή του θεραπευτικού σχήματος που θα «εκμεταλλεύεται» και θα «χρησιμοποιεί» τους ειδικούς εκείνους στόχους και μονοπάτια για την επιτυχή εξόντωση του κακοήθους ιστού και την σύγχρονη διάσωση των υγιών κυττάρων. Όπως εντυπωσιακά αποκαλύπτεται στην περίπτωση του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ανάλογα με το κατά περίπτωση κυτταρικό περιβάλλον, βαθμό κακοήθειας, γενετικό περιεχόμενο (π.χ. *p53* και *H-Ras*) και προφίλ «αυτοφαγικού», «πρωτεασωμικού», «σηματοδοτικού» και «γλυκολυτικού» εθισμού, ο κάθε κυτταρικός τύπος κακοήθους ουροθηλίου παρουσιάζεται με διαφορετικό επίπεδο κυτταροτοξικής ευαισθησίας στη δράση της εκάστοτε εφαρμοζόμενης χημειοθεραπευτικής αγωγής [Cisplatin, Bortezomib, 3-BtPA (απουσία ή παρουσία PRIMA-1)] ή μορφής στρες (απουσία γλυκόζης) (Πίνακας E1), γεγονός που επιβάλλει την ανάπτυξη νέων, στοχευμένων και ασφαλών φαρμακολογικών σχημάτων, που θα επιλέγονται με βάση τα συγκεκριμένα κυτταροβιολογικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση όγκου, με τελικό στόχο την επιτυχή εκρίζωση αυτού χωρίς παράπλευρη συστηματική τοξικότητα.

**Πίνακας Ε1** Συγκεντρωτική παράθεση των πλέον καθοριστικών χαρακτηριστικών που αφορούν στην κυτταροτοξική απόκριση των RT4 και T24 κυττάρων κακοήθους ουροθηλίου στη δράση των Cisplatin, Bortezomib, 3-BrPA, PRIMA-1 και απουσία γλυκόζης. *Human Urinary Bladder Cancer Cells*: Ανθρώπινα Καρκινικά Κύτταρα Ουροδόχου Κύστης, *Malignancy Type*: Τύπος Κακοήθειας, *Genetic Background*: Γενετικό Υπόβαθρο, *Cytopathic Stress*: Κυτ(ταρ)οπαθικό Στρες, *“Functional Addiction”*: «Λειτουργικός Εθισμός», *Cell Line*: Κυτταρική Σειρά, *Grade*: Βαθμός, *No Glucose*: Απουσία Γλυκόζης, *Autophagic*: Αυτοφαγικός, *Proteasomic*: Πρωτεασωμικός, *Signaling*: Σηματοδοτικός, *Glycolytic*: Γλυκολυτικός, *wt* (*wild-type*): φυσικός τύπος και *mt* (*mutant*): μεταλλαγμένος τύπος.

Human Urinary Bladder Cancer Cells													
Malignancy Type		Genetic Background				Cytopathic Stress					“Functional Addiction”		
Cell Line	Grade	<i>p53</i> <i>ΔY26</i>	<i>K-Ras</i> <i>G13D</i>	<i>B-Raf</i> <i>V600E</i>	<i>H-Ras</i> <i>G12V</i>	Cisplatin	Bortezomib	3-BrPA	No Glucose	PRIMA-1	Autophagic	Proteasomic	Signaling & Glycolytic
RT4	I	wt	wt	wt	wt	++	+	-	+	-	-	-	-
T24	III	mt	wt	wt	mt	+	++	+	-	+	+	+	+



## *Βιβλιογραφία*

## Βιβλιογραφία

1. Campbell-Walsh, *Urology, 10th Edition*. Saunders, Elsevier Inc., 2012.
2. Andersson, K.E. and M.C. Michel, *Urinary tract, 1st Edition*. Springer, 2011.
3. Clemente, C.D., *Gray's Anatomy, 30th American Edition*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985.
4. Hinman, F.J., *Atlas of urosurgical anatomy*. Philadelphia: WB Saunders, 1993.
5. Snell, R.S., *Κλινική Ανατομική, 8η Έκδοση*. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2009.
6. Parker, S., *Το Ανθρώπινο Σώμα*. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007.
7. Williams, P.L., et al., *Gray's Anatomy, 37th Edition*. New York: Churchill Livingstone, 1989.
8. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Color Textbook of Histology, 2nd Edition*. W.B. Saunders, 2001.
9. Stevens, A., J.S. Lowe, and B. Young, *Wheater's Basic Histology, 4th Edition*. Churchill Livingstone, 2002.
10. Wong-You-Cheong, J.J., et al., *From the Archives of the AFIP: neoplasms of the urinary bladder: radiologic-pathologic correlation*. Radiographics, 2006. 26(2): p. 553-80.
11. Brandt, W.D., et al., *Urothelial carcinoma: stem cells on the edge*. Cancer Metastasis Rev, 2009. 28(3-4): p. 291-304.
12. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. Histopathology, 2002. 40(5): p. 403-39.
13. De La Rosette, J., et al., *Changing patterns of keratin expression could be associated with functional maturation of the developing human bladder*. J Urol, 2002. 168(2): p. 709-17.
14. Lewis, S.A., *Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. 278(6): p. F867-74.
15. Martin, B.F., *Cell replacement and differentiation in transitional epithelium: a histological and autoradiographic study of the guinea-pig bladder and ureter*. J Anat, 1972. 112(Pt 3): p. 433-55.
16. Wu, X.R., et al., *Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation*. J Biol Chem, 1990. 265(31): p. 19170-9.
17. Yang, Y.M. and J.W. Chang, *Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells*. Cancer Invest, 2008. 26(7): p. 725-33.
18. Czerniak, B., *Molecular pathology and biomarkers of bladder cancer*. Cancer Biomark, 2010. 9(1-6): p. 159-76.
19. McConkey, D.J., et al., *Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression*. Urol Oncol, 2010. 28(4): p. 429-40.
20. Pashos, C.L., et al., *Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management*. Cancer Pract, 2002. 10(6): p. 311-22.
21. Downing, J.R., et al., *The Pediatric Cancer Genome Project*. Nat Genet, 2012. 44(6): p. 619-22.
22. Pui, C.H., et al., *Challenging issues in pediatric oncology*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. 8(9): p. 540-9.
23. Castillo-Martin, M., et al., *Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis*. Urol Oncol, 2010. 28(4): p. 401-8.

24. Theodorescu, D., *Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer*. *Histol Histopathol*, 2003. 18(1): p. 259-74.
25. Eble, J.N. and R.H. Young, *Carcinoma of the urinary bladder: a review of its diverse morphology*. *Semin Diagn Pathol*, 1997. 14(2): p. 98-108.
26. Jacobs, B.L., C.T. Lee, and J.E. Montie, *Bladder cancer in 2010: how far have we come?* *CA Cancer J Clin*, 2010. 60(4): p. 244-72.
27. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. *CA Cancer J Clin*, 2010. 60(5): p. 277-300.
28. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2012. 62(1): p. 10-29.
29. Clark, P.E., *Bladder cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2007. 19(3): p. 241-7.
30. Cohen, S.M., T. Shirai, and G. Steineck, *Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes*. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2000(205): p. 105-15.
31. Mitra, N. and A. Indurkha, *A propensity score approach to estimating the cost-effectiveness of medical therapies from observational data*. *Health Econ*, 2005. 14(8): p. 805-15.
32. Jung, I. and E. Messing, *Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression*. *Cancer Control*, 2000. 7(4): p. 325-34.
33. Sadetzki, S., et al., *Selected risk factors for transitional cell bladder cancer*. *Med Oncol*, 2000. 17(3): p. 179-82.
34. Wu, X.R., *Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(9): p. 713-25.
35. Kadlubar, F.F. and A.F. Badawi, *Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis*. *Toxicol Lett*, 1995. 82-83: p. 627-32.
36. Butler, M.A., et al., *Human cytochrome P-450A (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(20): p. 7696-700.
37. Risch, A., et al., *Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer*. *Hum Mol Genet*, 1995. 4(2): p. 231-6.
38. Marcus, P.M., et al., *Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. 9(5): p. 461-7.
39. Tuttle, T.M., G.M. Williams, and F.F. Marshall, *Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient*. *J Urol*, 1988. 140(5): p. 1009-11.
40. Fernandes, E.T., et al., *Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases*. *J Urol*, 1996. 156(6): p. 1931-3.
41. Cohen, S.M., et al., *Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis*. *Cancer Res*, 1992. 52(13): p. 3577-81.
42. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. *Int J Cancer*, 2006. 118(12): p. 3030-44.
43. Golijanin, D.J., et al., *Chemoprevention of bladder cancer*. *World J Urol*, 2006. 24(5): p. 445-72.
44. Groeneveld, A.E., W.W. Marszalek, and C.F. Heyns, *Bladder cancer in various population groups in the greater Durban area of KwaZulu-Natal, South Africa*. *Br J Urol*, 1996. 78(2): p. 205-8.
45. Warren, W., et al., *Mutations in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumours from Egyptian patients and a comparison between mutational*

- spectra from schistosomal and non-schistosomal urothelial tumours.* Carcinogenesis, 1995. 16(5): p. 1181-9.
46. Stonehill, W.H., et al., *Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients.* J Urol, 1996. 155(4): p. 1248-50.
  47. Tamir, S. and S.R. Tannenbaum, *The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process.* Biochim Biophys Acta, 1996. 1288(2): p. F31-6.
  48. Mostafa, M.H., S.A. Sheweita, and P.J. O'Connor, *Relationship between schistosomiasis and bladder cancer.* Clin Microbiol Rev, 1999. 12(1): p. 97-111.
  49. Shokeir, A.A., *Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment.* BJU Int, 2004. 93(2): p. 216-20.
  50. Sandhu, J.S., et al., *Clinical characteristics of bladder cancer in patients previously treated with radiation for prostate cancer.* BJU Int, 2006. 98(1): p. 59-62.
  51. Kleinerman, R.A., et al., *Second primary cancer after treatment for cervical cancer. An international cancer registries study.* Cancer, 1995. 76(3): p. 442-52.
  52. Neugut, A.I., et al., *Bladder carcinoma and other second malignancies after radiotherapy for prostate carcinoma.* Cancer, 1997. 79(8): p. 1600-4.
  53. Steinmaus, C.M., S. Nunez, and A.H. Smith, *Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables.* Am J Epidemiol, 2000. 151(7): p. 693-702.
  54. Chiou, H.Y., et al., *Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan.* Am J Epidemiol, 2001. 153(5): p. 411-8.
  55. Smith, A.H., et al., *Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water.* Am J Epidemiol, 1998. 147(7): p. 660-9.
  56. Su, H.J., et al., *The NAT2\* slow acetylator genotype is associated with bladder cancer in Taiwanese, but not in the Black Foot Disease endemic area population.* Pharmacogenetics, 1998. 8(2): p. 187-90.
  57. Hopenhayn-Rich, C., et al., *Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina.* Epidemiology, 1996. 7(2): p. 117-24.
  58. Dinney, C.P., et al., *Focus on bladder cancer.* Cancer Cell, 2004. 6(2): p. 111-6.
  59. Reuter, V.E., *The pathology of bladder cancer.* Urology, 2006. 67(3 Suppl 1): p. 11-7; discussion 17-8.
  60. Mitra, A.P. and R.J. Cote, *Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer.* Annu Rev Pathol, 2009. 4: p. 251-85.
  61. Montironi, R. and A. Lopez-Beltran, *The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary.* Int J Surg Pathol, 2005. 13(2): p. 143-53.
  62. Sanchez-Carbayo, M. and C. Cordon-Cardo, *Molecular alterations associated with bladder cancer progression.* Semin Oncol, 2007. 34(2): p. 75-84.
  63. Eble, J.N., et al., *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.* World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press, 2004.
  64. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.* Ann Surg Oncol, 2010. 17(6): p. 1471-4.
  65. Epstein, J.I., et al., *The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee.* Am J Surg Pathol, 1998. 22(12): p. 1435-48.
  66. Lopez-Beltran, A., *Bladder cancer: clinical and pathological profile.* Scand J Urol Nephrol Suppl, 2008(218): p. 95-109.

67. Lopez-Beltran, A., et al., *Morphological and molecular profiles and pathways in bladder neoplasms*. *Anticancer Res*, 2008. 28(5B): p. 2893-900.
68. Williams, S.G. and J.P. Stein, *Molecular pathways in bladder cancer*. *Urol Res*, 2004. 32(6): p. 373-85.
69. Zieger, K., *High throughput molecular diagnostics in bladder cancer - on the brink of clinical utility*. *Mol Oncol*, 2008. 1(4): p. 384-94.
70. Mitra, A.P., R.H. Datar, and R.J. Cote, *Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification*. *J Clin Oncol*, 2006. 24(35): p. 5552-64.
71. Netto, G.J., *Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet?* *Nat Rev Urol*, 2012. 9(1): p. 41-51.
72. Ahmad, I., O.J. Sansom, and H.Y. Leung, *Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models*. *Dis Model Mech*, 2012. 5(3): p. 323-32.
73. Knowles, M.A., *Molecular pathogenesis of bladder cancer*. *Int J Clin Oncol*, 2008. 13(4): p. 287-97.
74. Li, M., et al., *Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder*. *Am J Pathol*, 1996. 149(1): p. 229-35.
75. Takle, L.A. and M.A. Knowles, *Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer*. *Oncogene*, 1996. 12(5): p. 1083-7.
76. Wagner, U., et al., *Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer*. *Am J Pathol*, 1997. 151(3): p. 753-9.
77. Habuchi, T., et al., *Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci*. *Oncogene*, 1995. 11(8): p. 1671-4.
78. Keen, A.J. and M.A. Knowles, *Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder*. *Oncogene*, 1994. 9(7): p. 2083-8.
79. Simoneau, A.R., et al., *Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations*. *Cancer Res*, 1996. 56(21): p. 5039-43.
80. McBride, O.W., et al., *Localization of the normal allele of T24 human bladder carcinoma oncogene to chromosome 11*. *Nature*, 1982. 300(5894): p. 773-4.
81. Czerniak, B., et al., *Ha-ras gene codon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma*. *Br J Cancer*, 1990. 62(5): p. 762-3.
82. Koskinen, P.J. and K. Alitalo, *Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death*. *Semin Cancer Biol*, 1993. 4(1): p. 3-12.
83. Kotake, T., et al., *Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer*. *Jpn J Cancer Res*, 1990. 81(12): p. 1198-201.
84. Lipponen, P.K., *Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer*. *J Pathol*, 1995. 175(2): p. 203-10.
85. Underwood, M., et al., *C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors?* *Cancer Res*, 1995. 55(11): p. 2422-30.
86. Gorgoulis, V.G., et al., *Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in Greek patients*. *Mod Pathol*, 1995. 8(7): p. 758-64.
87. Mellon, J.K., et al., *C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value*. *J Urol*, 1996. 155(1): p. 321-6.



88. Sato, K., et al., *An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma*. *Cancer*, 1992. 70(10): p. 2493-8.
89. Chatterjee, S.J., et al., *Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer*. *J Pathol*, 2004. 203(3): p. 762-70.
90. Cordon-Cardo, C., *Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression*. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 2008(218): p. 154-65.
91. Sarkis, A.S., et al., *Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(1): p. 53-9.
92. George, B., et al., *p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(34): p. 5352-8.
93. Sanchez-Carbayo, M., et al., *Genomic and proteomic profiles reveal the association of gelsolin to TP53 status and bladder cancer progression*. *Am J Pathol*, 2007. 171(5): p. 1650-8.
94. Di Cristofano, A. and P.P. Pandolfi, *The multiple roles of PTEN in tumor suppression*. *Cell*, 2000. 100(4): p. 387-90.
95. Puzio-Kuter, A.M., et al., *Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer*. *Genes Dev*, 2009. 23(6): p. 675-80.
96. Cully, M., et al., *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(3): p. 184-92.
97. Mo, L., et al., *Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis*. *J Clin Invest*, 2007. 117(2): p. 314-25.
98. Popov, Z., et al., *Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information*. *Br J Cancer*, 2000. 83(2): p. 209-14.
99. Rieger-Christ, K.M., et al., *Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway*. *Oncogene*, 2004. 23(27): p. 4745-53.
100. Shariat, S.F., et al., *E-cadherin expression predicts clinical outcome in carcinoma in situ of the urinary bladder*. *Urology*, 2001. 57(1): p. 60-5.
101. Izawa, J.I., et al., *Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder*. *Oncol Rep*, 2001. 8(1): p. 9-15.
102. Kanayama, H., *Matrix metalloproteinases and bladder cancer*. *J Med Invest*, 2001. 48(1-2): p. 31-43.
103. Vihinen, P. and V.M. Kahari, *Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets*. *Int J Cancer*, 2002. 99(2): p. 157-66.
104. Campbell, S.C., et al., *Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer*. *Cancer Res*, 1998. 58(6): p. 1298-304.
105. Grossfeld, G.D., et al., *Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(3): p. 219-27.
106. Komhoff, M., et al., *Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas*. *Am J Pathol*, 2000. 157(1): p. 29-35.
107. Goebell, P.J. and M.A. Knowles, *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium*. *Urol Oncol*, 2010. 28(4): p. 409-28.
108. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(3): p. 235-53.
109. Johnson, D.E. and L.T. Williams, *Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family*. *Adv Cancer Res*, 1993. 60: p. 1-41.

110. di Martino, E., D.C. Tomlinson, and M.A. Knowles, *A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges*. *Adv Urol*, 2012. 2012: p. 429213.
111. Klint, P. and L. Claesson-Welsh, *Signal transduction by fibroblast growth factor receptors*. *Front Biosci*, 1999. 4: p. D165-77.
112. Cappellen, D., et al., *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas*. *Nat Genet*, 1999. 23(1): p. 18-20.
113. Catto, J.W., et al., *Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer*. *Cancer Res*, 2009. 69(21): p. 8472-81.
114. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. *Genome Biol*, 2001. 2(3): p. REVIEWS3005.
115. Wilkie, A.O., et al., *FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations*. *Am J Med Genet*, 2002. 112(3): p. 266-78.
116. Sibley, K., P. Stern, and M.A. Knowles, *Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours*. *Oncogene*, 2001. 20(32): p. 4416-8.
117. Rieger-Christ, K.M., et al., *Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection*. *Cancer*, 2003. 98(4): p. 737-44.
118. van Rhijn, B.W., et al., *FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2004. 64(6): p. 1911-4.
119. van Rhijn, B.W., et al., *Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma*. *J Pathol*, 2002. 198(2): p. 245-51.
120. Bakkar, A.A., et al., *FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder*. *Cancer Res*, 2003. 63(23): p. 8108-12.
121. Billerey, C., et al., *Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors*. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 1955-9.
122. Wallerand, H., et al., *Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens*. *Carcinogenesis*, 2005. 26(1): p. 177-84.
123. Diez de Medina, S.G., et al., *Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas*. *Oncogene*, 1997. 14(3): p. 323-30.
124. Ricol, D., et al., *Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer*. *Oncogene*, 1999. 18(51): p. 7234-43.
125. Sleeman, M., et al., *Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5*. *Gene*, 2001. 271(2): p. 171-82.
126. Trueb, B., *Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. 68(6): p. 951-64.
127. Feng, Z., *p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(2): p. a001057.
128. Schultze, S.M., et al., *PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis*. *Expert Rev Mol Med*, 2012. 14: p. e1.
129. Vanhaesebroeck, B., L. Stephens, and P. Hawkins, *PI3K signalling: the path to discovery and understanding*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(3): p. 195-203.
130. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. 129(7): p. 1261-74.
131. Schultze, S.M., et al., *Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism*. *Arch Physiol Biochem*, 2011. 117(2): p. 70-7.
132. Hanada, M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1697(1-2): p. 3-16.

133. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. 91(2): p. 231-41.
134. Bhaskar, P.T. and N. Hay, *The two TORCs and Akt*. Dev Cell, 2007. 12(4): p. 487-502.
135. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(11): p. 657-64.
136. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. 75(1): p. 50-83.
137. Boulton, T.G., et al., *An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control*. Science, 1990. 249(4964): p. 64-7.
138. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. 101(8): p. 2449-76.
139. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. 81(2): p. 807-69.
140. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. 22(2): p. 153-83.
141. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3100-12.
142. Chung, E. and M. Kondo, *Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development*. Immunol Res, 2011. 49(1-3): p. 248-68.
143. Geest, C.R., et al., *Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival, and cytokine production of CD34+-derived neutrophil progenitors*. Blood, 2009. 114(16): p. 3402-12.
144. Zheng, C.F. and K.L. Guan, *Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases*. J Biol Chem, 1993. 268(32): p. 23933-9.
145. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. 24(1): p. 21-44.
146. Kolch, W., et al., *The role of Raf kinases in malignant transformation*. Expert Rev Mol Med, 2002. 4(8): p. 1-18.
147. Μαργαρίτης, Α.Χ., et al., *Βιολογία Κυττάρου, 4η Έκδοση*. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 2004.
148. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. 13(9): p. 1016-23.
149. Hardie, D.G., D. Carling, and S.J. Gamblin, *AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?* Trends Biochem Sci, 2011. 36(9): p. 470-7.
150. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(4): p. 251-62.
151. Ferri, N., *AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease*. Vascul Pharmacol, 2012. 56(1-2): p. 9-13.
152. Carling, D., et al., *AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor*. Nat Chem Biol, 2011. 7(8): p. 512-8.
153. Xiao, B., et al., *Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP*. Nature, 2011. 472(7342): p. 230-3.
154. Oakhill, J.S., et al., *AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase*. Science, 2011. 332(6036): p. 1433-5.
155. Zhou, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. 108(8): p. 1167-74.
156. Hardie, D.G., *AMP-activated protein kinase as a drug target*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. 47: p. 185-210.

157. Fogarty, S., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP*. *Biochem J*, 2010. 426(1): p. 109-18.
158. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. *J Biol*, 2003. 2(4): p. 28.
159. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. *Cell Metab*, 2005. 2(1): p. 9-19.
160. Hurley, R.L., et al., *The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases*. *J Biol Chem*, 2005. 280(32): p. 29060-6.
161. Shaw, R.J., et al., *The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(10): p. 3329-35.
162. Woods, A., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. *Cell Metab*, 2005. 2(1): p. 21-33.
163. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Curr Biol*, 2003. 13(22): p. 2004-8.
164. Woods, A., et al., *Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis*. *J Biol Chem*, 2003. 278(31): p. 28434-42.
165. Stahmann, N., et al., *Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta*. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(16): p. 5933-45.
166. Tamas, P., et al., *Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca<sup>2+</sup> in T lymphocytes*. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1665-70.
167. Thornton, C., A. Sardini, and D. Carling, *Muscarinic receptor activation of AMP-activated protein kinase inhibits orexigenic neuropeptide mRNA expression*. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): p. 17116-22.
168. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint*. *Mol Cell*, 2008. 30(2): p. 214-26.
169. Kalender, A., et al., *Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner*. *Cell Metab*, 2010. 11(5): p. 390-401.
170. Pacholec, M., et al., *SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. *J Biol Chem*, 2010. 285(11): p. 8340-51.
171. Brown, M.S., G.Y. Brunschede, and J.L. Goldstein, *Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. An adenine nucleotide-dependent reaction catalyzed by a factor in human fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1975. 250(7): p. 2502-9.
172. Corkey, B.E., et al., *Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria*. *J Biol Chem*, 1986. 261(6): p. 2567-74.
173. Bensaad, K. and K.H. Vousden, *Savior and slayer: the two faces of p53*. *Nat Med*, 2005. 11(12): p. 1278-9.
174. Bensaad, K. and K.H. Vousden, *p53: new roles in metabolism*. *Trends Cell Biol*, 2007. 17(6): p. 286-91.
175. Liu, G. and X. Chen, *Regulation of the p53 transcriptional activity*. *J Cell Biochem*, 2006. 97(3): p. 448-58.
176. Sablina, A.A., et al., *The antioxidant function of the p53 tumor suppressor*. *Nat Med*, 2005. 11(12): p. 1306-13.

177. Stambolsky, P., et al., *Regulation of AIF expression by p53*. Cell Death Differ, 2006. 13(12): p. 2140-9.
178. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-10.
179. Vousden, K.H., *Outcomes of p53 activation--spoilt for choice*. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 24): p. 5015-20.
180. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. 126(1): p. 107-20.
181. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(10): p. 749-58.
182. Mitra, A.P., M. Birkhahn, and R.J. Cote, *p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer*. World J Urol, 2007. 25(6): p. 563-71.
183. Vousden, K.H. and K.M. Ryan, *p53 and metabolism*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(10): p. 691-700.
184. Kondoh, H., et al., *Glycolytic enzymes can modulate cellular life span*. Cancer Res, 2005. 65(1): p. 177-85.
185. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. 312(5780): p. 1650-3.
186. Crighton, D., et al., *DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis*. Cell, 2006. 126(1): p. 121-34.
187. Green, D.R. and J.E. Chipuk, *p53 and metabolism: Inside the TIGAR*. Cell, 2006. 126(1): p. 30-2.
188. Lum, J.J., R.J. DeBerardinis, and C.B. Thompson, *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(6): p. 439-48.
189. Aylon, Y. and M. Oren, *New plays in the p53 theater*. Curr Opin Genet Dev, 2011. 21(1): p. 86-92.
190. Li, T., et al., *Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence*. Cell, 2012. 149(6): p. 1269-83.
191. Feng, Z. and A.J. Levine, *The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein*. Trends Cell Biol, 2010. 20(7): p. 427-34.
192. Gottlieb, E. and K.H. Vousden, *p53 regulation of metabolic pathways*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(4): p. a001040.
193. Hu, W., et al., *Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(16): p. 7455-60.
194. Kawauchi, K., et al., *p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation*. Nat Cell Biol, 2008. 10(5): p. 611-8.
195. Suzuki, S., et al., *Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(16): p. 7461-6.
196. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni, and E. Karnieli, *The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression*. Cancer Res, 2004. 64(7): p. 2627-33.
197. Wang, P.Y., J. Zhuang, and P.M. Hwang, *p53: exercise capacity and metabolism*. Curr Opin Oncol, 2012. 24(1): p. 76-82.
198. Vaseva, A.V. and U.M. Moll, *The mitochondrial p53 pathway*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1787(5): p. 414-20.
199. Green, D.R. and G. Kroemer, *Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53*. Nature, 2009. 458(7242): p. 1127-30.
200. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. 124(3215): p. 269-70.

201. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. 123(3191): p. 309-14.
202. Bui, T. and C.B. Thompson, *Cancer's sweet tooth*. Cancer Cell, 2006. 9(6): p. 419-20.
203. Fantin, V.R., J. St-Pierre, and P. Leder, *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance*. Cancer Cell, 2006. 9(6): p. 425-34.
204. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. 4(11): p. 891-9.
205. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect*. Cancer Res, 2006. 66(18): p. 8927-30.
206. Hamanaka, R.B. and N.S. Chandel, *Targeting glucose metabolism for cancer therapy*. J Exp Med, 2012. 209(2): p. 211-5.
207. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. 27: p. 441-64.
208. Pfeiffer, T., S. Schuster, and S. Bonhoeffer, *Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways*. Science, 2001. 292(5516): p. 504-7.
209. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. 324(5930): p. 1029-33.
210. Marie, S.K. and S.M. Shinjo, *Metabolism and brain cancer*. Clinics (Sao Paulo), 2011. 66 Suppl 1: p. 33-43.
211. Chen, Z., et al., *The Warburg effect and its cancer therapeutic implications*. J Bioenerg Biomembr, 2007. 39(3): p. 267-74.
212. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(9): p. 705-13.
213. Dang, C.V., et al., *The interplay between MYC and HIF in cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(1): p. 51-6.
214. Brandon, M., P. Baldi, and D.C. Wallace, *Mitochondrial mutations in cancer*. Oncogene, 2006. 25(34): p. 4647-62.
215. Carew, J.S. and P. Huang, *Mitochondrial defects in cancer*. Mol Cancer, 2002. 1: p. 9.
216. Gottlieb, E. and I.P. Tomlinson, *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(11): p. 857-66.
217. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(1): p. 38-47.
218. Wilson, J.E., *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function*. J Exp Biol, 2003. 206(Pt 12): p. 2049-57.
219. Degterev, A. and J. Yuan, *Expansion and evolution of cell death programmes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(5): p. 378-90.
220. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. 19(1): p. 107-20.
221. Kreuzaler, P. and C.J. Watson, *Killing a cancer: what are the alternatives?* Nat Rev Cancer, 2012. 12(6): p. 411-24.
222. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. 26(4): p. 239-57.
223. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. 16(1): p. 3-11.

224. Fadeel, B., A. Ottosson, and S. Pervaiz, *Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance*. *Cell Death Differ*, 2008. 15(3): p. 443-52.
225. MacFarlane, M. and A.C. Williams, *Apoptosis and disease: a life or death decision*. *EMBO Rep*, 2004. 5(7): p. 674-8.
226. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. *Anat Embryol (Berl)*, 1990. 181(3): p. 195-213.
227. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. *Cell*, 1997. 88(3): p. 347-54.
228. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. *Cell*, 2004. 116(2): p. 205-19.
229. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors*. *Eur J Biochem*, 1998. 254(3): p. 439-59.
230. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. *Cell*, 2003. 114(2): p. 181-90.
231. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. *Semin Immunol*, 2003. 15(3): p. 185-93.
232. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2000. 1(6): p. 469-74.
233. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. *Cell*, 1998. 94(4): p. 481-90.
234. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. *Cell*, 1998. 94(4): p. 491-501.
235. Adams, J.M., *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*. *Genes Dev*, 2003. 17(20): p. 2481-95.
236. Adams, J.M. and S. Cory, *Apoptosomes: engines for caspase activation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. 14(6): p. 715-20.
237. Hill, M.M., et al., *Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes*. *EMBO J*, 2004. 23(10): p. 2134-45.
238. Wei, M.C., et al., *tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c*. *Genes Dev*, 2000. 14(16): p. 2060-71.
239. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 304(3): p. 437-44.
240. Willis, S.N., et al., *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak*. *Science*, 2007. 315(5813): p. 856-9.
241. Degtarev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. *Oncogene*, 2003. 22(53): p. 8543-67.
242. Cande, C., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all*. *Cell Death Differ*, 2004. 11(6): p. 591-5.
243. Cregan, S.P., V.L. Dawson, and R.S. Slack, *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2785-96.
244. David, K.K., et al., *EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2006. 13(7): p. 1147-55.
245. Chautan, M., et al., *Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway*. *Curr Biol*, 1999. 9(17): p. 967-70.
246. Galluzzi, L., et al., *Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis*. *Apoptosis*, 2007. 12(5): p. 803-13.

247. Arnoult, D., et al., *Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization*. EMBO J, 2003. 22(17): p. 4385-99.
248. Arnoult, D., et al., *Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli*. J Cell Biol, 2002. 159(6): p. 923-9.
249. Susin, S.A., et al., *Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease*. J Exp Med, 1996. 184(4): p. 1331-41.
250. Tsujimoto, Y., *Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria*. J Cell Physiol, 2003. 195(2): p. 158-67.
251. Yu, S.W., et al., *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. Science, 2002. 297(5579): p. 259-63.
252. van Loo, G., et al., *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet*. Cell Death Differ, 2002. 9(10): p. 1031-42.
253. Janku, F., et al., *Autophagy as a target for anticancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. 8(9): p. 528-39.
254. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. 21(22): p. 2861-73.
255. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. 6(4): p. 463-77.
256. Uttenweiler, A. and A. Mayer, *Microautophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Methods Mol Biol, 2008. 445: p. 245-59.
257. White, E., *Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(6): p. 401-10.
258. Kondo, Y., et al., *The role of autophagy in cancer development and response to therapy*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(9): p. 726-34.
259. Lee, J.W., et al., *The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy*. PLoS One, 2010. 5(11): p. e15394.
260. Ogier-Denis, E. and P. Codogno, *Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer*. Biochim Biophys Acta, 2003. 1603(2): p. 113-28.
261. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. Oncogene, 2004. 23(16): p. 2891-906.
262. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. 290(5497): p. 1717-21.
263. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. 132(1): p. 27-42.
264. Clague, M.J. and S. Urbe, *Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways*. Cell, 2010. 143(5): p. 682-5.
265. Mathew, R. and E. White, *Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night*. Curr Opin Genet Dev, 2011. 21(1): p. 113-9.
266. Rabinowitz, J.D. and E. White, *Autophagy and metabolism*. Science, 2010. 330(6009): p. 1344-8.
267. Levine, B., *Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense*. Cell, 2005. 120(2): p. 159-62.
268. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. 451(7182): p. 1069-75.
269. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Eaten alive: a history of macroautophagy*. Nat Cell Biol, 2010. 12(9): p. 814-22.
270. Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell, 2010. 40(2): p. 280-93.



271. Lee, J.S., et al., *FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control*. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(11): p. 1355-62.
272. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy*. *Cell*, 2005. 122(6): p. 927-39.
273. Baehrecke, E.H., *Autophagy: dual roles in life and death?* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(6): p. 505-10.
274. Eskelinen, E.L., *The dual role of autophagy in cancer*. *Curr Opin Pharmacol*, 2011. 11(4): p. 294-300.
275. Chen, N. and V. Karantza, *Autophagy as a therapeutic target in cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2011. 11(2): p. 157-68.
276. Kimmelman, A.C., *The dynamic nature of autophagy in cancer*. *Genes Dev*, 2011. 25(19): p. 1999-2010.
277. Levy, J.M. and A. Thorburn, *Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes*. *Pharmacol Ther*, 2011. 131(1): p. 130-41.
278. Ryan, K.M., *p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome*. *Eur J Cancer*, 2011. 47(1): p. 44-50.
279. Galluzzi, L., et al., *Programmed necrosis from molecules to health and disease*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011. 289: p. 1-35.
280. Cho, Y.S., et al., *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. *Cell*, 2009. 137(6): p. 1112-23.
281. Feng, S., et al., *Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain*. *Cell Signal*, 2007. 19(10): p. 2056-67.
282. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. *Cell*, 2009. 137(6): p. 1100-11.
283. Hitomi, J., et al., *Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway*. *Cell*, 2008. 135(7): p. 1311-23.
284. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(10): p. 700-14.
285. Christofferson, D.E. and J. Yuan, *Necroptosis as an alternative form of programmed cell death*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(2): p. 263-8.
286. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. *Nat Chem Biol*, 2008. 4(5): p. 313-21.
287. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. *Science*, 2009. 325(5938): p. 332-6.
288. Papatrifiantayfyllou, M., *Cell death: Programmed necrosis: putting the pieces together*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(3): p. 135.
289. Sun, L., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase*. *Cell*, 2012. 148(1-2): p. 213-27.
290. Wang, Z., et al., *The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways*. *Cell*, 2012. 148(1-2): p. 228-43.
291. Bano, D., et al., *The plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1099: p. 451-5.
292. Bano, D., et al., *Cleavage of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in excitotoxicity*. *Cell*, 2005. 120(2): p. 275-85.
293. Temkin, V., et al., *Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis*. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(6): p. 2215-25.
294. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. *Physiol Rev*, 2007. 87(1): p. 99-163.

295. Andrabi, S.A., et al., *Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(48): p. 18308-13.
296. Yu, S.W., et al., *Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(48): p. 18314-9.
297. David, K.K., et al., *Parthanatos, a messenger of death*. Front Biosci, 2009. 14: p. 1116-28.
298. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. 54(3): p. 375-429.
299. Cummings, K.B., J.G. Barone, and W.S. Ward, *Diagnosis and staging of bladder cancer*. Urol Clin North Am, 1992. 19(3): p. 455-65.
300. Holzbeierlein, J.M. and J.A. Smith, Jr., *Surgical management of noninvasive bladder cancer (stages Ta/T1/CIS)*. Urol Clin North Am, 2000. 27(1): p. 15-24, vii-viii.
301. Rene, N.J., F.B. Cury, and L. Souhami, *Conservative treatment of invasive bladder cancer*. Curr Oncol, 2009. 16(4): p. 36-47.
302. Duque, J.L. and K.R. Loughlin, *An overview of the treatment of superficial bladder cancer. Intravesical chemotherapy*. Urol Clin North Am, 2000. 27(1): p. 125-35, x.
303. Sternberg, C.N. and F. Calabro, *Chemotherapy, management of bladder tumours*. BJU Int, 2000. 85(5): p. 611-3.
304. Losa, A., R. Hurle, and A. Lembo, *Low dose bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results*. J Urol, 2000. 163(1): p. 68-71; discussion 71-2.
305. Walther, M.M., *The role of photodynamic therapy in the treatment of recurrent superficial bladder cancer*. Urol Clin North Am, 2000. 27(1): p. 163-70.
306. Kelland, L., *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(8): p. 573-84.
307. Drayton, R.M. and J.W. Catto, *Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2012. 12(2): p. 271-81.
308. Rosenberg, B., et al., *The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes*. J Biol Chem, 1967. 242(6): p. 1347-52.
309. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(4): p. 307-20.
310. Ho, Y.P., S.C. Au-Yeung, and K.K. To, *Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives*. Med Res Rev, 2003. 23(5): p. 633-55.
311. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. Cancer Treat Rev, 2007. 33(1): p. 9-23.
312. Zorbas, H. and B.K. Keppler, *Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell?* ChemBiochem, 2005. 6(7): p. 1157-66.
313. Zhu, G., et al., *Monofunctional platinum-DNA adducts are strong inhibitors of transcription and substrates for nucleotide excision repair in live mammalian cells*. Cancer Res, 2012. 72(3): p. 790-800.
314. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. 22(47): p. 7265-79.
315. Gately, D.P. and S.B. Howell, *Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review*. Br J Cancer, 1993. 67(6): p. 1171-6.
316. Stewart, D.J., *Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 63(1): p. 12-31.
317. Holzer, A.K., G.H. Manorek, and S.B. Howell, *Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin*. Mol Pharmacol, 2006. 70(4): p. 1390-4.

318. Ishikawa, T., *The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump*. Trends Biochem Sci, 1992. 17(11): p. 463-8.
319. Mistry, P., et al., *The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines*. Br J Cancer, 1991. 64(2): p. 215-20.
320. Safaei, R., et al., *The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs*. J Inorg Biochem, 2004. 98(10): p. 1607-13.
321. Ishida, S., et al., *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(22): p. 14298-302.
322. Kasherman, Y., S. Sturup, and D. Gibson, *Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts*. J Med Chem, 2009. 52(14): p. 4319-28.
323. Samimi, G., et al., *Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2004. 10(14): p. 4661-9.
324. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(16): p. 1295-302.
325. Katano, K., et al., *Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper*. Cancer Res, 2002. 62(22): p. 6559-65.
326. Komatsu, M., et al., *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance*. Cancer Res, 2000. 60(5): p. 1312-6.
327. Albertella, M.R., et al., *A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage*. Cancer Res, 2005. 65(21): p. 9799-806.
328. Ferry, K.V., T.C. Hamilton, and S.W. Johnson, *Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF*. Biochem Pharmacol, 2000. 60(9): p. 1305-13.
329. Reed, E., *ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy*. Clin Cancer Res, 2005. 11(17): p. 6100-2.
330. Arora, S., et al., *Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells*. DNA Repair (Amst), 2010. 9(7): p. 745-53.
331. Koberle, B., et al., *Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1806(2): p. 172-82.
332. Xu, X.S., et al., *Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer*. J Hematol Oncol, 2011. 4: p. 17.
333. Nagatani, G., et al., *Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells*. Cancer Res, 2001. 61(4): p. 1592-7.
334. Dragovich, T., et al., *A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. 58(6): p. 759-64.
335. Holford, J., et al., *In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473*. Br J Cancer, 1998. 77(3): p. 366-73.
336. Sharp, S.Y., P.M. Rogers, and L.R. Kelland, *Transport of cisplatin and bis-acetato-ammine-dichlorocyclohexylamine Platinum(IV) (JM216) in human ovarian carcinoma cell lines: identification of a plasma membrane protein associated with cisplatin resistance*. Clin Cancer Res, 1995. 1(9): p. 981-9.
337. Stewart, D.J., et al., *Phase II study of alternating chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2004. 44(2): p. 241-9.
338. Plumb, J.A., et al., *Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter*. Cancer Res, 2000. 60(21): p. 6039-44.

339. Steele, N., et al., *Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo*. Br J Cancer, 2009. 100(5): p. 758-63.
340. Adams, J. and M. Kauffman, *Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib)*. Cancer Invest, 2004. 22(2): p. 304-11.
341. Bonvini, P., et al., *Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma*. Leukemia, 2007. 21(4): p. 838-42.
342. Chauhan, D., G. Bianchi, and K.C. Anderson, *Targeting the UPS as therapy in multiple myeloma*. BMC Biochem, 2008. 9 Suppl 1: p. S1.
343. Corn, P.G., *Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma*. BMC Biochem, 2007. 8 Suppl 1: p. S4.
344. Voorhees, P.M., et al., *The proteasome as a target for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2003. 9(17): p. 6316-25.
345. Cusack, J.C., *Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib*. Cancer Treat Rev, 2003. 29 Suppl 1: p. 21-31.
346. Jackson, G., et al., *Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies*. Cancer Treat Rev, 2005. 31(8): p. 591-602.
347. Adams, J., *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat Rev, 2003. 29 Suppl 1: p. 3-9.
348. Moore, B.S., A.S. Eustaquio, and R.P. McGlinchey, *Advances in and applications of proteasome inhibitors*. Curr Opin Chem Biol, 2008. 12(4): p. 434-40.
349. McCloskey, S.M., et al., *The therapeutic potential of the proteasome in leukaemia*. Hematol Oncol, 2008. 26(2): p. 73-81.
350. Rajkumar, S.V., et al., *Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer*. J Clin Oncol, 2005. 23(3): p. 630-9.
351. Richardson, P.G., et al., *Proteasome inhibition in the treatment of cancer*. Cell Cycle, 2005. 4(2): p. 290-6.
352. da Fonseca, P.C., J. He, and E.P. Morris, *Molecular model of the human 26S proteasome*. Mol Cell, 2012. 46(1): p. 54-66.
353. Frankland-Searby, S. and S.R. Bhaumik, *The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1825(1): p. 64-76.
354. Elsasser, S., et al., *Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome*. J Biol Chem, 2004. 279(26): p. 26817-22.
355. Glickman, M.H., et al., *A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3*. Cell, 1998. 94(5): p. 615-23.
356. Bhaumik, S.R. and S. Malik, *Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2008. 43(6): p. 419-33.
357. Groll, M., et al., *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 1997. 386(6624): p. 463-71.
358. Brooks, S.A., *Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. 1(2): p. 240-52.
359. Adams, J., et al., *Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. 8(4): p. 333-8.
360. Groll, M., et al., *The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(20): p. 10976-83.

361. Heinemeyer, W., et al., *The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing*. J Biol Chem, 1997. 272(40): p. 25200-9.
362. Petroski, M.D., *The ubiquitin system, disease, and drug discovery*. BMC Biochem, 2008. 9 Suppl 1: p. S7.
363. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1695(1-3): p. 55-72.
364. Guedat, P. and F. Colland, *Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system*. BMC Biochem, 2007. 8 Suppl 1: p. S14.
365. Vucic, D., V.M. Dixit, and I.E. Wertz, *Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(7): p. 439-52.
366. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. Science, 2007. 315(5809): p. 201-5.
367. Ohta, T. and M. Fukuda, *Ubiquitin and breast cancer*. Oncogene, 2004. 23(11): p. 2079-88.
368. Pickart, C.M., *Ubiquitin enters the new millennium*. Mol Cell, 2001. 8(3): p. 499-504.
369. Yang, Y., et al., *Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy*. Cancer Sci, 2009. 100(1): p. 24-8.
370. Groll, M., et al., *A gated channel into the proteasome core particle*. Nat Struct Biol, 2000. 7(11): p. 1062-7.
371. Navon, A. and A.L. Goldberg, *Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome*. Mol Cell, 2001. 8(6): p. 1339-49.
372. Eddins, M.J., et al., *Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation*. Nat Struct Mol Biol, 2006. 13(10): p. 915-20.
373. Rodrigo-Brenni, M.C., S.A. Foster, and D.O. Morgan, *Catalysis of lysine 48-specific ubiquitin chain assembly by residues in E2 and ubiquitin*. Mol Cell, 2010. 39(4): p. 548-59.
374. Hurley, J.H., S. Lee, and G. Prag, *Ubiquitin-binding domains*. Biochem J, 2006. 399(3): p. 361-72.
375. Braun, T., et al., *Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies*. Cell Death Differ, 2006. 13(5): p. 748-58.
376. McConkey, D.J. and K. Zhu, *Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer*. Drug Resist Updat, 2008. 11(4-5): p. 164-79.
377. Luqman, S. and J.M. Pezzuto, *NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention*. Phytother Res, 2010. 24(7): p. 949-63.
378. Montagut, C., A. Rovira, and J. Albanell, *The proteasome: a novel target for anticancer therapy*. Clin Transl Oncol, 2006. 8(5): p. 313-7.
379. Pajonk, F. and W.H. McBride, *The proteasome in cancer biology and treatment*. Radiat Res, 2001. 156(5 Pt 1): p. 447-59.
380. Allende-Vega, N. and M.K. Saville, *Targeting the ubiquitin-proteasome system to activate wild-type p53 for cancer therapy*. Semin Cancer Biol, 2010. 20(1): p. 29-39.
381. Weissman, A.M., N. Shabek, and A. Ciechanover, *The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(9): p. 605-20.
382. Carter, S., et al., *C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53*. Nat Cell Biol, 2007. 9(4): p. 428-35.
383. Marchenko, N.D., et al., *Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation*. EMBO J, 2007. 26(4): p. 923-34.

384. Mendrysa, S.M. and M.E. Perry, *The p53 tumor suppressor protein does not regulate expression of its own inhibitor, MDM2, except under conditions of stress.* Mol Cell Biol, 2000. 20(6): p. 2023-30.
385. Barnard, J.P., B. Reynafarje, and P.L. Pedersen, *Glucose catabolism in African trypanosomes. Evidence that the terminal step is catalyzed by a pyruvate transporter capable of facilitating uptake of toxic analogs.* J Biol Chem, 1993. 268(5): p. 3654-61.
386. Pedersen, P.L., *The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview.* J Bioenerg Biomembr, 2007. 39(1): p. 1-12.
387. Pedersen, P.L., *Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen.* J Bioenerg Biomembr, 2007. 39(3): p. 211-22.
388. Pastorino, J.G. and J.B. Hoek, *Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis.* Curr Med Chem, 2003. 10(16): p. 1535-51.
389. Pastorino, J.G. and J.B. Hoek, *Regulation of hexokinase binding to VDAC.* J Bioenerg Biomembr, 2008. 40(3): p. 171-82.
390. Bustamante, E. and P.L. Pedersen, *High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(9): p. 3735-9.
391. Gottlob, K., et al., *Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase.* Genes Dev, 2001. 15(11): p. 1406-18.
392. Pastorino, J.G., N. Shulga, and J.B. Hoek, *Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis.* J Biol Chem, 2002. 277(9): p. 7610-8.
393. Porporato, P.E., et al., *Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review.* Front Pharmacol, 2011. 2: p. 49.
394. Pedersen, P.L., *Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer.* J Bioenerg Biomembr, 2008. 40(3): p. 123-6.
395. da-Silva, W.S., et al., *Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria.* J Biol Chem, 2004. 279(38): p. 39846-55.
396. Shoshan-Barmatz, V. and D. Ben-Hail, *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target.* Mitochondrion, 2012. 12(1): p. 24-34.
397. Sun, L., et al., *Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II.* Mol Cell Biol, 2008. 28(3): p. 1007-17.
398. Majewski, N., et al., *Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak.* Mol Cell, 2004. 16(5): p. 819-30.
399. Miyamoto, S., A.N. Murphy, and J.H. Brown, *Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II.* Cell Death Differ, 2008. 15(3): p. 521-9.
400. Pastorino, J.G., J.B. Hoek, and N. Shulga, *Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity.* Cancer Res, 2005. 65(22): p. 10545-54.

401. Jope, R.S. and G.V. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends Biochem Sci, 2004. 29(2): p. 95-102.
402. Juhaszova, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore*. J Clin Invest, 2004. 113(11): p. 1535-49.
403. Murphy, E., *Inhibit GSK-3beta or there's heartbreak dead ahead*. J Clin Invest, 2004. 113(11): p. 1526-8.
404. Nishihara, M., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection*. J Mol Cell Cardiol, 2007. 43(5): p. 564-70.
405. Cardaci, S., E. Desideri, and M.R. Ciriolo, *Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug*. J Bioenerg Biomembr, 2012. 44(1): p. 17-29.
406. Chen, Z., et al., *Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1787(5): p. 553-60.
407. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. 25(34): p. 4633-46.
408. Xu, R.H., et al., *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia*. Cancer Res, 2005. 65(2): p. 613-21.
409. Ganapathy-Kanniappan, S., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death*. Anticancer Res, 2009. 29(12): p. 4909-18.
410. Ko, Y.H., et al., *Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 324(1): p. 269-75.
411. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen, *Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy*. Semin Cancer Biol, 2009. 19(1): p. 17-24.
412. Pereira da Silva, A.P., et al., *Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate*. Biochem J, 2009. 417(3): p. 717-26.
413. Buijs, M., et al., *Specificity of the anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate confirmed by FDG uptake in a rat model of breast cancer*. Invest New Drugs, 2009. 27(2): p. 120-3.
414. Cao, X., et al., *Non-invasive MRI tumor imaging and synergistic anticancer effect of HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor in RIP1-Tag2 transgenic pancreatic tumor model*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. 62(6): p. 985-94.
415. Geschwind, J.F., et al., *Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production*. Cancer Res, 2002. 62(14): p. 3909-13.
416. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. 25: p. 585-621.
417. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
418. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med, 1995. 182(5): p. 1545-56.
419. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. 148(7): p. 2207-16.

420. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 39-51.
421. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
422. Rodgers, K.J. and R.T. Dean, *Assessment of proteasome activity in cell lysates and tissue homogenates using peptide substrates*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(5): p. 716-27.
423. Meng, X.W., S.H. Lee, and S.H. Kaufmann, *Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept?* Curr Opin Cell Biol, 2006. 18(6): p. 668-76.
424. Fraser, M., T. Bai, and B.K. Tsang, *Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function*. Int J Cancer, 2008. 122(3): p. 534-46.
425. Fraser, M., et al., *p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2003. 63(21): p. 7081-8.
426. Mujoo, K., et al., *Status of p53 phosphorylation and function in sensitive and resistant human cancer models exposed to platinum-based DNA damaging agents*. J Cancer Res Clin Oncol, 2003. 129(12): p. 709-18.
427. Pabla, N., et al., *ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2008. 283(10): p. 6572-83.
428. Cooper, M.J., et al., *p53 mutations in bladder carcinoma cell lines*. Oncol Res, 1994. 6(12): p. 569-79.
429. Hinata, N., et al., *Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type- p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells*. Urol Res, 2003. 31(6): p. 387-96.
430. Dan, H.C., et al., *Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)*. J Biol Chem, 2004. 279(7): p. 5405-12.
431. Yang, X., et al., *Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway*. Cancer Res, 2006. 66(6): p. 3126-36.
432. Stravopodis, D.J., L.H. Margaritis, and G.E. Voutsinas, *Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex*. Curr Med Chem, 2007. 14(29): p. 3122-38.
433. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(10): p. 761-72.
434. Hostetter, D.R., et al., *Hip is a pro-survival substrate of granzyme B*. J Biol Chem, 2007. 282(38): p. 27865-74.
435. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2005. 17(6): p. 617-25.
436. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. 7(3): p. 683-94.
437. Okazaki, T. and D. Sakamuro, *Induction of Fas (CD95/APO-1) ligand is essential for p53-dependent apoptosis in an in vitro renal carcinoma model system*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. 133(9): p. 581-8.
438. Riley, T., et al., *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(5): p. 402-12.
439. Tsuruya, K., et al., *Involvement of p53-transactivated Puma in cisplatin-induced renal tubular cell death*. Life Sci, 2008. 83(15-16): p. 550-6.
440. Gong, B. and A. Almasan, *Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 278(3): p. 747-52.



441. Modur, V., et al., *FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer.* J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47928-37.
442. Borst, P., J. Jonkers, and S. Rottenberg, *What makes tumors multidrug resistant?* Cell Cycle, 2007. 6(22): p. 2782-7.
443. Itamochi, H., J. Kigawa, and N. Terakawa, *Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma.* Cancer Sci, 2008. 99(4): p. 653-8.
444. Borst, P., S. Rottenberg, and J. Jonkers, *How do real tumors become resistant to cisplatin?* Cell Cycle, 2008. 7(10): p. 1353-9.
445. Coley, H.M., *Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer.* Cancer Treat Rev, 2008. 34(4): p. 378-90.
446. Kuo, M.T., et al., *The roles of copper transporters in cisplatin resistance.* Cancer Metastasis Rev, 2007. 26(1): p. 71-83.
447. Lutsenko, S., et al., *Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance.* Arch Biochem Biophys, 2008. 476(1): p. 22-32.
448. Safaei, R., *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs.* Cancer Lett, 2006. 234(1): p. 34-9.
449. Cavaletti, G., *Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy.* Nat Rev Cancer, 2008. 8(1): p. 1p following 71; author reply 1p following 71.
450. Pasetto, L.M., et al., *The development of platinum compounds and their possible combination.* Crit Rev Oncol Hematol, 2006. 60(1): p. 59-75.
451. de Wilt, L.H., et al., *Bortezomib and TRAIL: A perfect match for apoptotic elimination of tumour cells?* Crit Rev Oncol Hematol, 2012.
452. Jagtap, P. and C. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors.* Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(5): p. 421-40.
453. Macchioni, L., et al., *Mitochondrial dysfunction and effect of antiglycolytic bromopyruvic acid in GL15 glioblastoma cells.* J Bioenerg Biomembr, 2011. 43(5): p. 507-18.
454. Stravopodis, D.J., et al., *Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines.* Int J Oncol, 2009. 34(1): p. 137-60.
455. Guo, J.Y., et al., *Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis.* Genes Dev, 2011. 25(5): p. 460-70.
456. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia.* Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 915-28.
457. Karkoulis, P.K., et al., *17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells.* BMC Cancer, 2010. 10: p. 481.
458. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism.* Nat Rev Cancer, 2011. 11(2): p. 85-95.
459. Ferreira, L.M., *Cancer metabolism: the Warburg effect today.* Exp Mol Pathol, 2010. 89(3): p. 372-80.
460. Rayasam, G.V., et al., *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake.* Br J Pharmacol, 2009. 156(6): p. 885-98.
461. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR.* Genes Dev, 2004. 18(16): p. 1926-45.
462. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks.* Biochem J, 2012. 441(1): p. 1-21.

463. Grallert, B. and E. Boye, *The Gcn2 kinase as a cell cycle regulator*. Cell Cycle, 2007. 6(22): p. 2768-72.
464. Levine, A.J., et al., *Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways*. Genes Dev, 2006. 20(3): p. 267-75.
465. Gottlieb, E., *p53 guards the metabolic pathway less travelled*. Nat Cell Biol, 2011. 13(3): p. 195-7.
466. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 957-67.
467. Lambert, J.M., et al., *PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain*. Cancer Cell, 2009. 15(5): p. 376-88.
468. Yun, J., et al., *Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells*. Science, 2009. 325(5947): p. 1555-9.
469. Wellen, K.E., et al., *The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism*. Genes Dev, 2010. 24(24): p. 2784-99.
470. Ko, Y.H., P.L. Pedersen, and J.F. Geschwind, *Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase*. Cancer Lett, 2001. 173(1): p. 83-91.
471. Huang, S. and M.P. Czech, *The GLUT4 glucose transporter*. Cell Metab, 2007. 5(4): p. 237-52.
472. Schoenberg, D.R. and L.E. Maquat, *Regulation of cytoplasmic mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2012. 13(4): p. 246-59.
473. Withers, J.B. and K.L. Beemon, *The structure and function of the rous sarcoma virus RNA stability element*. J Cell Biochem, 2011. 112(11): p. 3085-92.
474. Szeszel-Fedorowicz, W., et al., *An exonic splicing silencer is involved in the regulated splicing of glucose 6-phosphate dehydrogenase mRNA*. J Biol Chem, 2006. 281(45): p. 34146-58.
475. Han, S.P., Y.H. Tang, and R. Smith, *Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives*. Biochem J, 2010. 430(3): p. 379-92.
476. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading*. Semin Cancer Biol, 2005. 15(4): p. 300-8.
477. Wu, X., et al., *The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion*. BJU Int, 2004. 93(1): p. 143-50.
478. Blanc, C., et al., *Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells*. Cancer Res, 2000. 60(16): p. 4386-90.
479. Seki, K., et al., *Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. 45(3): p. 199-206.
480. Wang, P., et al., *Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis*. Cell Signal, 2006. 18(9): p. 1528-35.
481. Cummings, B.S. and R.G. Schnellmann, *Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(1): p. 8-17.
482. Henkels, K.M. and J.J. Turchi, *Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines*. Cancer Res, 1999. 59(13): p. 3077-83.
483. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death Differ, 2003. 10(4): p. 431-42.

484. Vekris, A., et al., *Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of in silico research*. *Cancer Res*, 2004. 64(1): p. 356-62.
485. Kanamori, Y., et al., *A newly developed adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene increases sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) in p53-deleted ovarian cancer cells*. *Eur J Cancer*, 1998. 34(11): p. 1802-6.
486. Kigawa, J., et al., *Effect of p53 gene transfer and cisplatin in a peritonitis carcinomatosa model with p53-deficient ovarian cancer cells*. *Gynecol Oncol*, 2002. 84(2): p. 210-5.
487. Perego, P., et al., *Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems*. *Cancer Res*, 1996. 56(3): p. 556-62.
488. Fan, J. and J.R. Bertino, *Modulation of cisplatin cytotoxicity by p53: effect of p53-mediated apoptosis and DNA repair*. *Mol Pharmacol*, 1999. 56(5): p. 966-72.
489. Zamble, D.B., T. Jacks, and S.J. Lippard, *p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(11): p. 6163-8.
490. Ullrich, S.J., et al., *Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(13): p. 5954-8.
491. Shangary, S. and S. Wang, *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(17): p. 5318-24.
492. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. *Cell*, 1997. 91(3): p. 325-34.
493. Shouse, G.P., X. Cai, and X. Liu, *Serine 15 phosphorylation of p53 directs its interaction with B56gamma and the tumor suppressor activity of B56gamma-specific protein phosphatase 2A*. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(1): p. 448-56.
494. Matsumoto, M., M. Furihata, and Y. Ohtsuki, *Posttranslational phosphorylation of mutant p53 protein in tumor development*. *Med Mol Morphol*, 2006. 39(2): p. 79-87.
495. Oster, B., et al., *Human herpesvirus 6B induces phosphorylation of p53 in its regulatory domain by a CK2- and p38-independent pathway*. *J Gen Virol*, 2008. 89(Pt 1): p. 87-96.
496. Radhakrishnan, S.K. and A.L. Gartel, *CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392*. *Cell Cycle*, 2006. 5(5): p. 519-21.
497. Pommier, Y., et al., *Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks*. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2934-49.
498. Nakashio, A., et al., *Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 2000. 60(18): p. 5303-9.
499. Karpinich, N.O., et al., *The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c*. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 16547-52.
500. Tang, D., et al., *Akt is activated in response to an apoptotic signal*. *J Biol Chem*, 2001. 276(32): p. 30461-6.
501. Carpten, J.D., et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer*. *Nature*, 2007. 448(7152): p. 439-44.
502. Liu, J., et al., *Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens*. *Mol Carcinog*, 2000. 29(3): p. 143-50.

503. Cheng, J.Q., et al., *Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway*. *Drug Resist Updat*, 2002. 5(3-4): p. 131-46.
504. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. 61(5): p. 1862-8.
505. Deveraux, Q.L., et al., *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases*. *EMBO J*, 1999. 18(19): p. 5242-51.
506. Ishida, R., et al., *Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90*. *FEBS Lett*, 2008. 582(28): p. 3879-83.
507. Beck, R., et al., *Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death*. *Biochem Pharmacol*, 2009. 77(3): p. 375-83.
508. Meslin, F., et al., *Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells*. *J Biol Chem*, 2007. 282(45): p. 32991-9.
509. Putzer, B.M., *E2F1 death pathways as targets for cancer therapy*. *J Cell Mol Med*, 2007. 11(2): p. 239-51.
510. Stanelle, J. and B.M. Putzer, *E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics*. *Trends Mol Med*, 2006. 12(4): p. 177-85.
511. Ianari, A., et al., *Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage*. *J Biol Chem*, 2004. 279(29): p. 30830-5.
512. Lin, W.C., F.T. Lin, and J.R. Nevins, *Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation*. *Genes Dev*, 2001. 15(14): p. 1833-44.
513. Yu, F., et al., *Involvement of the CDK2-E2F1 pathway in cisplatin cytotoxicity in vitro and in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. 293(1): p. F52-9.
514. Biswas, S.C., D.X. Liu, and L.A. Greene, *Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway*. *J Neurosci*, 2005. 25(37): p. 8349-58.
515. Eischen, C.M., et al., *Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1*. *Oncogene*, 2001. 20(48): p. 6983-93.
516. Gaviraghi, M., et al., *Identification of a candidate alternative promoter region of the human Bcl2L11 (Bim) gene*. *BMC Mol Biol*, 2008. 9: p. 56.
517. Hershko, T. and D. Ginsberg, *Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. 279(10): p. 8627-34.
518. Real, P.J., et al., *Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells*. *FEBS Lett*, 2006. 580(25): p. 5905-9.
519. Jiang, M., et al., *Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis*. *Oncogene*, 2006. 25(29): p. 4056-66.
520. Muller, M., et al., *p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs*. *J Exp Med*, 1998. 188(11): p. 2033-45.
521. Timmer, T., E.G. de Vries, and S. de Jong, *Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?* *J Pathol*, 2002. 196(2): p. 125-34.
522. Zalcenstein, A., et al., *Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants*. *Oncogene*, 2003. 22(36): p. 5667-76.
523. Fulda, S., et al., *Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system*. *Int J Cancer*, 1998. 76(1): p. 105-14.

524. Toyozumi, Y., et al., *Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human laryngeal squamous cell carcinoma, HEp-2 cells*. *Int J Oncol*, 2004. 25(3): p. 721-8.
525. Oka, N., et al., *Role of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. *Cancer Sci*, 2006. 97(10): p. 1093-8.
526. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. *J Leukoc Biol*, 2003. 73(6): p. 689-701.
527. Greer, E.L. and A. Brunet, *FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression*. *Oncogene*, 2005. 24(50): p. 7410-25.
528. Lam, E.W., R.E. Francis, and M. Petkovic, *FOXO transcription factors: key regulators of cell fate*. *Biochem Soc Trans*, 2006. 34(Pt 5): p. 722-6.
529. Nebbioso, A., et al., *Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells*. *Nat Med*, 2005. 11(1): p. 77-84.
530. Xu, J., et al., *Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cells to adriamycin*. *Cancer Res*, 2007. 67(3): p. 1203-11.
531. Abaan, O.D. and J.A. Toretsky, *PTPL1: a large phosphatase with a split personality*. *Cancer Metastasis Rev*, 2008. 27(2): p. 205-14.
532. Wieckowski, E., et al., *FAP-1-mediated activation of NF-kappaB induces resistance of head and neck cancer to Fas-induced apoptosis*. *J Cell Biochem*, 2007. 100(1): p. 16-28.
533. Song, I.S., et al., *Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells*. *Mol Cancer Ther*, 2004. 3(12): p. 1543-9.
534. Holzer, A.K., et al., *The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells*. *Mol Pharmacol*, 2004. 66(4): p. 817-23.
535. Nakayama, K., et al., *Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines*. *Oncol Rep*, 2001. 8(6): p. 1285-7.
536. Kalayda, G.V., et al., *Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells*. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 175.
537. Noon, A.P. and J.W. Catto, *Bladder cancer in 2012: Challenging current paradigms*. *Nat Rev Urol*, 2012. 10(2): p. 67-8.
538. Iyer, G., et al., *Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity*. *Science*, 2012. 338(6104): p. 221.
539. Toyoshima, M., et al., *Functional genomics identifies therapeutic targets for MYC-driven cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(24): p. 9545-50.
540. Kesselheim, A.S., J.A. Myers, and J. Avorn, *Characteristics of clinical trials to support approval of orphan vs nonorphan drugs for cancer*. *JAMA*, 2011. 305(22): p. 2320-6.
541. Kisselev, A.F., W.A. van der Linden, and H.S. Overkleeft, *Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target*. *Chem Biol*, 2012. 19(1): p. 99-115.
542. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 231-41.
543. Kirkin, V., et al., *A role for ubiquitin in selective autophagy*. *Mol Cell*, 2009. 34(3): p. 259-69.

544. Bauer, S., et al., *Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells*. *Cancer Res*, 2010. 70(1): p. 150-9.
545. Hagenbuchner, J., et al., *The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression*. *J Biol Chem*, 2010. 285(10): p. 6904-12.
546. Selimovic, D., et al., *Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells*. *Cell Signal*, 2013. 25(1): p. 308-18.
547. Li, C. and D.E. Johnson, *Bortezomib induces autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells via JNK activation*. *Cancer Lett*, 2012. 314(1): p. 102-7.
548. Rubinsztein, D.C., P. Codogno, and B. Levine, *Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. 11(9): p. 709-30.
549. Laussmann, M.A., et al., *Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8*. *Cell Death Differ*, 2011. 18(10): p. 1584-97.
550. Balyasnikova, I.V., et al., *Therapeutic effect of neural stem cells expressing TRAIL and bortezomib in mice with glioma xenografts*. *Cancer Lett*, 2011. 310(2): p. 148-59.
551. Johnson, T.R., et al., *The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells*. *Oncogene*, 2003. 22(32): p. 4953-63.
552. Papageorgiou, A., et al., *Combination therapy with IFN-alpha plus bortezomib induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human bladder cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(12): p. 3032-41.
553. Chari, A., A. Mazumder, and S. Jagannath, *Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma*. *Biologics*, 2010. 4: p. 273-87.
554. Jane, E.P., D.R. Premkumar, and I.F. Pollack, *Bortezomib sensitizes malignant human glioma cells to TRAIL, mediated by inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway*. *Mol Cancer Ther*, 2011. 10(1): p. 198-208.
555. Kashkar, H., et al., *NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs*. *Blood*, 2007. 109(9): p. 3982-8.
556. Du, H.F., et al., *Norcantharidin enhances bortezomib-antimyeloma activity in multiple myeloma cells in vitro and in nude mouse xenografts*. *Leuk Lymphoma*, 2013. 54(3): p. 607-18.
557. Perez-Galan, P., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status*. *Blood*, 2006. 107(1): p. 257-64.
558. Baker, R., et al., *Site-specific monoubiquitination activates Ras by impeding GTPase-activating protein function*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. 20(1): p. 46-52.
559. Chen, K.F., et al., *Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2008. 68(16): p. 6698-707.
560. Morgillo, F., et al., *Antitumor activity of bortezomib in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors*. *Lung Cancer*, 2011. 71(3): p. 283-90.
561. Lopez-Otin, C. and T. Hunter, *The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(4): p. 278-92.
562. Piazza, F., et al., *Glycogen Synthase Kinase-3 regulates multiple myeloma cell growth and bortezomib-induced cell death*. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 526.

563. Yang, F., et al., *Bortezomib induces apoptosis and growth suppression in human medulloblastoma cells, associated with inhibition of AKT and NF- $\kappa$ B signaling, and synergizes with an ERK inhibitor*. *Cancer Biol Ther*, 2012. 13(6): p. 349-57.
564. Xu, L., L. Su, and X. Liu, *PKCdelta regulates death receptor 5 expression induced by PS-341 through ATF4-ATF3/CHOP axis in human lung cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2012. 11(10): p. 2174-82.
565. Yu, C., et al., *The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib*. *Exp Cell Res*, 2004. 295(2): p. 555-66.
566. Lioni, M., et al., *Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(9): p. 2866-75.
567. Shi, Y.Y., G.W. Small, and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 100(1): p. 33-47.
568. Hunter, T., *The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond*. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 730-8.
569. Li, C., et al., *Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent I $\kappa$ B(alpha) degradation*. *J Biol Chem*, 2010. 285(21): p. 16096-104.
570. Mitsiades, N., et al., *Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(22): p. 14374-9.
571. Konstantakou, E.G., et al., *Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses*. *Int J Oncol*, 2009. 35(2): p. 401-16.
572. Teicher, B.A., et al., *The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy*. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(9): p. 2638-45.
573. Nakata, W., et al., *Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor bortezomib in gastric cancer*. *Int J Oncol*, 2011. 39(6): p. 1529-36.
574. Rodwell, C., *Drug trials: in a spin*. *Nat Rev Cancer*, 2012. 13(2): p. 78.
575. Rato, L., et al., *Metabolic regulation is important for spermatogenesis*. *Nat Rev Urol*, 2012. 9(6): p. 330-8.
576. Fiske, B.P. and M.G. Vander Heiden, *Seeing the Warburg effect in the developing retina*. *Nat Cell Biol*, 2012. 14(8): p. 790-1.
577. Tohyama, S., et al., *Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*. *Cell Stem Cell*, 2013. 12(1): p. 127-37.
578. Bayley, J.P. and P. Devilee, *The Warburg effect in 2012*. *Curr Opin Oncol*, 2012. 24(1): p. 62-7.
579. Tennant, D.A., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(4): p. 267-77.
580. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
581. Torti, D. and L. Trusolino, *Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils*. *EMBO Mol Med*, 2011. 3(11): p. 623-36.
582. Ganapathy-Kanniappan, S., et al., *3-Bromopyruvate induces endoplasmic reticulum stress, overcomes autophagy and causes apoptosis in human HCC cell lines*. *Anticancer Res*, 2010. 30(3): p. 923-35.

583. Cardaci, S., et al., *Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1*. *Cancer Res*, 2012. 72(17): p. 4526-36.
584. Long, J.S. and K.M. Ryan, *New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy*. *Oncogene*, 2012. 31(49): p. 5045-60.
585. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx, *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(4): p. 225-38.
586. Borst, P. and S. Rottenberg, *Cancer cell death by programmed necrosis? Drug Resist Updat*, 2004. 7(6): p. 321-4.
587. Sonveaux, P., et al., *Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice*. *J Clin Invest*, 2008. 118(12): p. 3930-42.
588. Draoui, N. and O. Feron, *Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments*. *Dis Model Mech*, 2011. 4(6): p. 727-32.
589. Birsoy, K., et al., *MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors*. *Nat Genet*, 2013. 45(1): p. 104-8.
590. Thangaraju, M., et al., *Transport by SLC5A8 with subsequent inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC3 underlies the antitumor activity of 3-bromopyruvate*. *Cancer*, 2009. 115(20): p. 4655-66.
591. Wang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos*. *Exp Neurol*, 2009. 218(2): p. 193-202.
592. Hong, S.J., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. 25(5): p. 259-64.
593. Gibson, B.A. and W.L. Kraus, *New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(7): p. 411-24.
594. Kim, J.S., et al., *Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells : ROS-mediated cell death by 3-BrPA*. *J Bioenerg Biomembr*, 2008. 40(6): p. 607-18.
595. Shoshan, M.C., *3-Bromopyruvate: targets and outcomes*. *J Bioenerg Biomembr*, 2012. 44(1): p. 7-15.
596. Oronsky, B.T., et al., *The scarlet letter of alkylation: a mini review of selective alkylating agents*. *Transl Oncol*, 2012. 5(4): p. 226-9.
597. Pedersen, P.L., *3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue*. *J Bioenerg Biomembr*, 2012. 44(1): p. 1-6.
598. Tang, Z., et al., *Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester*. *J Bioenerg Biomembr*, 2012. 44(1): p. 117-25.
599. Yeluri, S., et al., *Cancer's craving for sugar: an opportunity for clinical exploitation*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009. 135(7): p. 867-77.
600. John, S., J.N. Weiss, and B. Ribalet, *Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose*. *PLoS One*, 2011. 6(3): p. e17674.
601. Rodrigues-Ferreira, C., A.P. da Silva, and A. Galina, *Effect of the antitumoral alkylating agent 3-bromopyruvate on mitochondrial respiration: role of mitochondrially bound hexokinase*. *J Bioenerg Biomembr*, 2012. 44(1): p. 39-49.
602. Ben-David, H., et al., *A 50-kDa ERK-like protein is up-regulated by a dual altered peptide ligand that suppresses myasthenia gravis-associated responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(48): p. 18232-7.
603. Okorokov, A.L. and J. Milner, *An ATP/ADP-dependent molecular switch regulates the stability of p53-DNA complexes*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(11): p. 7501-10.



604. Bonnal, S., L. Vigevani, and J. Valcarcel, *The spliceosome as a target of novel antitumour drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. 11(11): p. 847-59.
605. Mesnage, S., et al., *Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation*. *EMBO J*, 2000. 19(17): p. 4473-84.

*Παράρτημα*

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

Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

**ΚΥΤΤΑΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ  
ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ**

Υποψήφια Διδάκτωρ  
**ΕΥΜΟΡΦΙΑ Γ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΑΚΟΥ, B.Sc.**  
Βιολόγος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ι. ΣΤΡΑΒΟΠΟΛΗΣ**, Επίκουρος Καθηγητής – Επιβλέπων  
**ΙΣΙΔΩΡΑ Σ. ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
**ΛΟΥΚΑΣ Χ. ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ**, Ομότιμος Καθηγητής

Αθήνα, 2013

## Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες (2012) του «Οργανισμού Εποπτείας, Επιδημιολογίας και Τελικών Αποτελεσμάτων» (“SEER”), οι κακοήθειες του ουροποιητικού συστήματος καταλαμβάνουν το ~7.2% στους ενήλικες και το ~4.5% στα παιδιά του συνόλου των ανθρώπινων κακοηθειών, με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης να αποτελεί την συχνότερη μορφή κακοήθειας του ουροποιητικού συστήματος, και να κατέχει την 4<sup>η</sup> θέση σε συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες και την 9<sup>η</sup> στις γυναίκες.

Κύριο περιορισμό στην επιτυχή αντιμετώπιση του ανθρώπινου καρκίνου συνιστά η, ενδεχόμενη, ανάπτυξη ανθεκτικότητας των κυττάρων του εκάστοτε όγκου στην, κατά περίπτωση, εφαρμοζόμενη χημειοθεραπεία, γεγονός που αναγκαστικά επιβάλλει τόσο την λεπτομερή αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών δράσης του κάθε φαρμάκου όσο και την ανάπτυξη νέας γενεάς μορίων με ισχυρό θεραπευτικό δυναμικό και μειωμένη «συστημική» τοξικότητα. Η *Cisplatin* (Σισπλατίνη), μία από τις 1<sup>η</sup>ς γενεάς συνθέσεις με βάση την «Πλατίνα» (*Pt*) και ένα σημαντικό συστατικό των *MVAC* (*Methotrexate-Vinblastine-Adriamycin-Cisplatin*) και *GC* (*Gemcitabine-Cisplatin*) φαρμακολογικών κοκτέιλ θεραπευτικής διαχείρισης του κακοήθους μεταστατικού ουροθηλίου της ουροδόχου κύστης, δύναται να προκαλεί αλλοιώσεις στην δομική ακεραιότητα του γονιδιωματικού *DNA*, μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικών διασυνδέσεων είτε εντός του ίδιου κλώνου είτε ανάμεσα σε συμπληρωματικούς κλώνους *DNA*, ευρέως γνωστές ως «*DNA adducts*», αποτέλεσμα των οποίων είναι η καταστροφή του προσβεβλημένου κυττάρου. Το *Bortezomib* (Βορτεζομίδη), μία 2<sup>η</sup>ς γενεάς φαρμακολογική σύνθεση βασισμένη στο «Βόριο» (*B*) και ένα πολύτιμο θεραπευτικό εργαλείο του ανθρώπινου πολλαπλού μυελώματος, διαμέσου της ικανότητάς του να αναστέλλει εκλεκτικά την προσομοιάζουσα στη χυμοθρυψίνη πρωτεολυτική ενεργότητα του πρωτεασώματος, έχει πρόσφατα ενταχθεί σε ένα σύνολο κλινικών δοκιμών για διαφορετικούς τύπους καρκίνου, με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αυτούς του πνεύμονα και του προστάτη. Το *3-BrPA* (*3-Bromopyruvate* {*3-Bromopyruvic Acid*}: 3-Βρωμοπυροσταφυλικό Οξύ), μία 3<sup>η</sup>ς γενεάς, ως προς τη λειτουργική της δυναμική, σύνθεση και δομικό ανάλογο του (γα)λακτικού οξέος, μέσω της δράσης του ως ειδικός αναστολέας των μεταβολικών

ενζύμων *HK2* (*Hexokinase II*: Εξωκινάση 2) και *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*: Αφυδρογονάση της 3-Φωσφορικής Γλυκερ(ιν)αλδεΐδης), οδηγεί στην παρεμπόδιση της γλυκολυτικής διαδικασίας, από την οποία, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται συνήθως ως άμεσα εξαρτώμενα για την παραγωγή ενέργειας στη μορφή του *ATP*, φαινόμενο ευρέως γνωστό ως “*Warburg Effect*”.

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διερεύνηση της ενεργοποίησης προγραμμάτων κυτταρικού θανάτου τύπου απόπτωσης, αυτοφαγίας και νέκρωσης, σε συνδυασμό με τη μελέτη της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας κρίσιμων μονοπατιών σηματοδότησης, ως θεμελιώδεις βιο-μοριακές αποκρίσεις ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων στην συμβατική (*Cisplatin*) και στοχευμένη (*Bortezomib* και *3-BrPA*) δράση επιλεγμένων φαρμακολογικού τύπου χημικών ενώσεων, με τελικό στόχο την ανάπτυξη αξιόπιστων προ-κλινικών, κυτταρικών και ζωικών, προτύπων με ισχυρή θεραπευτική δυναμική έναντι διακριτών μορφών ανθρώπινης κακοήθειας και ειδικότερα αυτής της ουροδόχου κύστης.

Το βασικό βιολογικό σύστημα που επιλέχθηκε να αναλυθεί περιελάμβανε τις τέσσερις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ουροδόχου κύστης *RT4* (βαθμού κακοήθειας *I*), *RT112* (βαθμού κακοήθειας *I-II*), *T24* (βαθμού κακοήθειας *III*) και *TCCSUP* (βαθμού κακοήθειας *IV*), οι οποίες χαρακτηρίζονται, κυρίως, εκτός από το διαφορετικό βαθμό κακοήθειας, και από ένα διακριτό γενετικό υπόβαθρο του *p53* γονιδιακού τύπου, ενώ, κατά περίπτωση, εξετάστηκαν και οι «ισογονιδιακές» ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου *HCT116-p53<sup>+/+</sup>* και *HCT116-p53<sup>-/-</sup>*. Η πειραματική στρατηγική που υιοθετήθηκε αφορούσε στην εφαρμογή μίας σειράς τεχνικών που, κυρίως, περιελάμβαναν: α) καλλιέργειες κυτταρικών σειρών *in vitro*, β) δοκιμασίες προσδιορισμού κυτταρικής βιωσιμότητας (*MTT*), γ) αντιδράσεις κυτταρομετρίας ροής (*FACS*), δ) ανάλυση πρωτεϊνών μέσω *SDS-PAGE* και ανοσο-στυπώματος *Western*, ε) ημι-ποσοτικές αλυσ(ιδ)ωτές αντιδράσεις πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή (*sqRT-PCR*) για έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, στ) παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης γονιδίων, ζ) απομόνωση γονιδιωματικού *DNA*, η) αντιδράσεις αλληλούχισης (*sequencing*) *DNA*, θ) δοκιμασίες προσδιορισμού ενεργότητας πρωτεασώματος, ι) αντιδράσεις ποσοτικοποίησης της βιο-ενεργειακής αναλογίας *ADP/ATP*, κ) δοκιμασίες ποσοτικού προσδιορισμού (γα)λακτικού οξέος, λ) ανάπτυξη

πειραματικών όγκων τύπου αλλομοσχεύματος (“*Xenograft*”) σε *SCID* (*severe combined immunodeficiency*) ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς και μ) δοκιμασίες *in vivo* χορήγησης χημειοθεραπευτικού παράγοντα σε *SCID* ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς φέροντες όγκους τύπου “*Xenograft*”, και περαιτέρω αξιολόγηση της θεραπευτικής – κυτταροτοξικής δράσης αυτού στη βιωσιμότητα του όγκου.

Τόσο τα *RT4* όσο και τα *T24* κύτταρα αποδείχθηκαν ευάλωτα στην κυτταροτοξική δράση της *Cisplatin*, με τα *T24* να εμφανίζονται συγκριτικά ανθεκτικότερα σε όλες τις δόσεις του φαρμάκου. Έκθεση στη *Cisplatin* είχε ως άμεσο αποτέλεσμα την πρωτεολυτική επεξεργασία και επακόλουθη ενεργοποίηση του ρεπερτορίου των Κασπασών, με σημαντικότερους αντιπροσώπους τις *Caspase-8*, *Caspase-9* και *Caspase-3*, γεγονός που αντανάκλα την φαρμακο-επαγόμενη δραστηριοποίηση τόσο του «εξωγενούς» (εξαρτώμενου από μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου) όσο και του «ενδογενούς» (εξαρτώμενου από το μιτοχόνδριο) μονοπατιού κυτταρικού θανάτου τύπου απόπτωσης. Η διαφορική ευαισθησία των *RT4* και *T24* κυττάρων στο αποπτωτικό δυναμικό της *Cisplatin* φάνηκε να συσχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητα των πρώτων να επάγουν ισχυρά τα συνολικά και φωσφορυλιωμένα, στις θέσεις *Ser*<sup>15</sup> και *Ser*<sup>392</sup>, επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *p53*, και την αδυναμία των δεύτερων να κινητοποιούν *p53*-εξαρτώμενα μονοπάτια μετά από έκθεση στο φάρμακο. Επιπρόσθετα, η *RT4*-ειδική πρωτεόλυση της *Akt* κινάσης σερίνης/θρεονίνης και η αντίστοιχη του *XIAP* αποπτωτικού αναστολέα, ως απόκριση στη χορήγηση της *Cisplatin*, δύνανται να καθιστούν τα κύτταρα περισσότερο ευάλωτα στο γενοτοξικό στρες του φαρμάκου, κυρίως μέσω ενίσχυσης του αποπτωτικού μηχανισμού καταστροφής αυτών. Η αποκλειστικά στα *T24* ανιχνεύσιμη έκφραση της φωσφορυλιωμένης, στη σερίνη 473 (*Ser*<sup>473</sup>), και άρα ενεργοποιημένης μορφής της *Akt* κινάσης αντανάκλα έντονα το ισχυρό μεταστατικό δυναμικό, αλλά και την συγκριτικά υψηλότερη ανθεκτικότητα, αυτών στη δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Η κυτταροτοξική δυναμική της *Cisplatin* στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο φάνηκε να συνοδεύεται από μία δοσο-εξαρτώμενη πρωτεόλυση της μοριακής συνοδού *Hsp90* και επακόλουθη δημιουργία ενός μοριακού θραύσματος ~65 *kDa*, με εν δυνάμει «αρνητικά επικρατή» λειτουργικό ρόλο, μόνο στα *RT4* αλλά όχι στα *T24* κύτταρα, ενδεχόμενο αποτέλεσμα των οποίων θα ήταν η δομική αστάθεια επιλεγμένων μελών του πρωτεώματος, όπως αυτή που παρατηρήθηκε για τους *Akt* και *XIAP* αντι-αποπτωτικούς σηματοδότες. Κρίνοντας

από το πρότυπο επαγωγικής έκφρασης της *Granzyme B* πρωτεάσης σερίνης, ως απόκριση στο φάρμακο, αποκλειστικά στα *RT4* κύτταρα, υποδείχθηκε η δυνατότητα αυτής να πρωτεολύει εκλεκτικά την *Hsp90* και να οδηγεί, ενδεχομένως, το προσβεβλημένο κύτταρο σε απώλεια της πρωτεωμικής του σταθερότητας. Αντίθετα, η *Cisplatin* δεν αποδείχθηκε ικανή να προκαλεί γενικευμένη αποδυνάμωση της μεταγραφικής μηχανής, αλλά να επηρεάζει τη λειτουργία αυτής με έναν αυστηρά γονιδιο-ειδικό τρόπο. Ειδικότερα, βασιζόμενοι στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης, σε απόκριση της έκθεσης των υπό μελέτη κυττάρων του κακοήθους ουροθηλίου στο φάρμακο, κατέστη δυνατόν να διακριθούν τρεις κατηγορίες γονιδίων: α) γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση με *p53*-ανεξάρτητο τρόπο (π.χ. *Bik*, *Bim* και *Bcl-2*), β) *p53*-εξαρτώμενα γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση (π.χ. *FasL* και *TRAIL*) και γ) γονίδια που ελέγχουν την εισροή/εκροή («διακίνηση») της *Cisplatin* ανεξάρτητα από το *p53* γενετικό υπόβαθρο (π.χ. *ATP7A/B* και *CTR1*). Συνολικά, αποκαλύφθηκε ότι η κυτταροτοξική δυναμική του φαρμάκου συσχετίζεται άμεσα με τις μεταγραφικές αποκρίσεις γονιδίων που ρυθμίζουν τόσο την απόπτωση όσο και την εκροή, αλλά όχι την εισροή, αυτού στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Είναι εντυπωσιακό ότι η συγκριτική ανάλυση των νέας γενεάς σκευασμάτων τύπου «Πλατίνας» (*Pt*), *Carboplatin* (Καρβοπλατίνη) και *Oxaliplatin* (Οξαλιπλατίνη), ως προς την τοξική τους επίδραση στο βαθμό επιβίωσης των *T24* κυττάρων, ανέδειξε την υποδεέστερη χημειοθεραπευτική τους δυναμική σε σχέση με τη *Cisplatin* σε όλες τις κλινικά συμβατές δόσεις και χρόνους χορήγησης αυτών.

Διερευνώντας τις χημειοθεραπευτικές επιδράσεις του στοχευμένου φαρμάκου *Bortezomib* στο ανθρώπινο κακόηθες ουροθήλιο αποδείχθηκε η ικανότητά του να:

- προκαλεί κυτταρο-ειδική τοξικότητα ενδιάμεσου «χρονισμού», με τη μορφή Κασπασο-εξαρτώμενου αποπτωτικού θανάτου, μέσω ενεργοποίησης τόσο του «εξωγενούς» (εμπλοκή μεμβρανικών υποδοχέων θανάτου) όσο και του «ενδογενούς» (εμπλοκή μιτοχονδρίων) μονοπατιού αποπτωτικής σηματοδότησης,
- κινητοποιεί τόσο προαγωγικές όσο και αντισταθμιστικές κυτταρο-ειδικές αποκρίσεις θανάτου που βασίζονται στα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης και μεταμεταφραστικής τροποποίησης των αντι-αποπτωτικών ρυθμιστών *Bcl-2*, *Bcl-X<sub>L</sub>*, *XIAP*, *cIAP-1*, *Survivin* και *Livin*, με τον *XIAP* αναστολέα να υπόκειται σε ισχυρή φαρμακο-επαγόμενη συμπικουϊτινίωση,

- επάγει έντονη γονιδιωματική τοξικότητα, με τη μορφή σχηματισμού -κυρίως- δίκλωνων θραυσμάτων DNA, όπως αποκαλύπτουν τα υψηλά επίπεδα συσσώρευσης της φωσφορυλιωμένης H2AX ιστόνης ως απόκριση στο φάρμακο,
- εξοντώνει τα διαφορετικού βαθμού κακοήθειας (I, I-II, III και IV) κύτταρα καρκίνου ουροδόχου κύστης με έναν p53-ανεξάρτητο μηχανισμό, δεδομένου ότι μόνο ο RT4 (βαθμού κακοήθειας I), και όχι οι υπόλοιποι τύποι κυττάρων, αποδείχθηκε ικανός να σταθεροποιεί, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον p53 μεταγραφικό παράγοντα μετά από έκθεση στο Bortezomib,
- ρυθμίζει τη βιογένεση του αυτοφαγосώματος, με τρόπο που να εξαρτάται από το κυτταρο-ειδικό μικρο-περιβάλλον, όπως αποδεικνύεται από την φαρμακο-επαγόμενη αυξορρύθμιση της αυτοφαγίας στα χαμηλής κακοήθειας κύτταρα (RT4 και RT112) και την φαρμακο-επαγόμενη μειορρύθμιση της -υψηλής- συστατικής ενεργότητας αυτής (“autophagy addiction”) στα υψηλής κακοήθειας κύτταρα (T24),
- διαταράσσει κυτταρο-ειδικά την δομική και λειτουργική ακεραιότητα κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως χαρακτηριστικά αποκαλύπτεται από την ισχυρή πρωτεολυτική σχάση της Akt κινάσης, καθώς και από την έντονη αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των φωσφορυλιωμένων GSK-3β και p38 MAPK κινασών στα RT4 και RT112 κύτταρα ως απόκριση στο φάρμακο,
- οδηγεί στην Granzyme B-ανεξάρτητη πρωτεολυτική σχάση των κρίσιμων μοριακών συνοδών Hsp70 και Hsp90 -ακολουθώντας ένα αυστηρά κυτταρο-ειδικό προφίλ- προάγοντας, πιθανώς, μία γενικευμένη δομική «ευπάθεια» του κακοήθους ουροθηλιακού πρωτεώματος και ειδικότερα του αντίστοιχου «κινώματος» (“kinome”),
- ρυθμίζει διαφορικά την μεταγραφική έκφραση γονιδίων στόχων, χωρίς -γενικά- να αλλοιώνει την λειτουργική δυναμική της μεταγραφικής μηχανής,
- αναστέλλει δραστικά την προσομοιάζουσα της χυμοθρυψίνης ενεργότητα του πρωτεασώματος και να προκαλεί την φαρμακο-επαγόμενη συσσώρευση (πολυ-) ουμπικουϊτινωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες συγκροτούνται σε μορφή πολυμοριακών συσσωματωμάτων,
- μειώνει ισχυρά, *in vivo*, τον ρυθμό εμφάνισης και αύξησης T24 (βαθμού κακοήθειας III) και RT112 (βαθμού κακοήθειας I-II) πειραματικών όγκων τύπου



αλλομοσχεύματος (“*Xenograft*”) σε *SCID* (*severe combined immunodeficiency*) ανοσο-ανεπαρκείς ποντικούς,

- ελαττώνει δραματικά το ποσοστό σχηματισμού δευτερογενών μεταστατικών εστιών *T24* -κακοήθων- όγκων τύπου “*Xenograft*”, *in vivo*, όπως αποδεικνύεται από την αδυναμία ανίχνευσης μεταστάσεων στους *SCID/T24* ποντικούς που εκτέθηκαν στο Bortezomib.

Επιπρόσθετα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αφορούν στην ισχυρή συσχέτιση του υψηλού βαθμού κακοήθειας των *T24* (*III*) ως προς τον αντίστοιχο των *RT4* (*I*) κυττάρων του κακοήθους ανθρώπινου ουροθηλίου με τα υψηλά συστατικά (*constitutive*) επίπεδα πρωτεασωμικής, αυτοφαγικής και σηματοδοτικής -όπως αντανακλώνται από τα ποσοστά φωσφορυλίωσης κρίσιμων κινασών- ενεργότητας που ανιχνεύονται στον πρώτο (*T24*), αλλά όχι στον δεύτερο (*RT4*) τύπο κυττάρων.

Στοχεύοντας στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών δράσης του *3-BrPA* στα κύτταρα του ανθρώπινου καρκίνου της ουροδόχου κύστης (αλλά και του παχέος εντέρου) αποκαλύφθηκε η ικανότητά του να:

- προκαλεί ταχεία, βαθμο-ειδική και εξαρτώμενη από την κυτταρική πυκνότητα ισχυρή κυτταροτοξικότητα, με έναν αυστηρά δοσο-ελεγχόμενο τρόπο, όπως αποκαλύπτεται από την ευπάθεια των *T24*, *T24-X* (νέα κυτταρική σειρά προερχόμενη από *SCID/T24* “*Xenograft*”) και *TCCSUP*, και την ανθεκτικότητα των *RT4* και *RT112* κυττάρων στην έκθεση στο φάρμακο,
- επάγει δοσο-εξαρτώμενη απόπτωση και προγραμματισμένη νέκρωση στα υψηλής αλλά όχι στα χαμηλής κακοήθειας κύτταρα, με την απόπτωση να ενεργοποιείται σε χαμηλές ενώ η νέκρωση σε υψηλές συγκεντρώσεις *3-BrPA*,
- κινητοποιεί μηχανισμούς προγραμματισμένης νέκρωσης που χαρακτηρίζονται από: α) απουσία ενεργότητας Κασπάσης, β) διαφορετικό προφίλ πρωτεολυτικής σχάσης των *PARP* και *Lamin A/C* πυρηνικών πρωτεϊνών και γ) αναστροφή του κυτταροτοξικού φαινοτύπου μέσω δράσης του *PARP* ειδικού αναστολέα *PJ-34*, γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή ενός εξειδικευμένου προγράμματος κυτταρικού θανάτου ευρέως γνωστό ως «παρθάνατος» (“*parthanatos*”),
- μειορρυθμίζει δραστικά τα -υψηλά- συστατικά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών ελέγχου της αυτοφαγίας, τα οποία ενδεχομένως απαιτούνται για την ομαλή

- επιβίωση και ανάπτυξη των υψηλής κακοήθειας *T24* και *T24-X* κυττάρων (“*autophagy addiction*”),
- διαρρηγνύει την δομική και κυρίως την λειτουργική ακεραιότητα των *IGF-IR / Akt / GSK-3 – FoxO, mTOR / S6, AMPK* και *p38 MAPK* κρίσιμων αξόνων ενδοκυτταρικής σηματοδότησης,
  - επάγει εκλεκτικά στις δόσεις φαρμάκου που προκαλούν προγραμματισμένες νεκρωτικές αποκρίσεις τον σχηματισμό μίας *p-p44/42 MAPK-like* φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ~47 *kDa*, ενδεχομένως μέσω ενός *3-BrPA*-ελεγχόμενου μηχανισμού διαφορικού ματίσματος, χωρίς να αποκλείεται και το εναλλακτικό σενάριο της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης τύπου «πυρουβύλωσης» (“*pyruvylation*”),
  - καθοδηγεί την ενεργοποίηση μίας ισχυρής και δοσο-εξαρτώμενης γονιδιωματικής τοξικότητας, με τη μορφή δίκλωνων θραυσμάτων *DNA*, όπως αυτή αναδεικνύεται από τα υψηλά επίπεδα συσσώρευσης της φωσφορυλιωμένης *H2AX* ιστόνης ως απόκριση στο φάρμακο,
  - εξασκεί έντονη κυτταροτοξική δράση στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τόσο της ουροδόχου κύστης (*T24*) όσο και του παχέος εντέρου (*HCT116*), κινητοποιώντας *p53*-ανεξάρτητα σηματοδοτικά μονοπάτια,
  - εμφανίζει ισχυρή «θεραπευτική» / κυτταροτοξική συνέργεια με τον ειδικό ενεργοποιητή μεταλλαγμένης *p53* πρωτεΐνης (*T24* και *T24-X*) *PRIMA-1*, με αυστηρά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο,
  - θανατώνει εκλεκτικά κύτταρα κακοήθους ουροθηλίου (*T24, T24-X* και *TCCSUP*) τα οποία εμφανίζουν υψηλή ανοχή στην απουσία γλυκόζης,
  - προκαλεί προγραμματισμένο νεκρωτικό θάνατο ανεξάρτητα από το γενετικό υπόβαθρο των *K-Ras (G13D* μεταλλαγή) και *B-Raf (V600E* μεταλλαγή) γονιδίων, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες σχέσεις εξάρτησης «μεταβολώματος {“*metabolome*”} – γονιδιώματος {“*genome*”}» των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (*Yun et al., 2009, Science 325: 1555-1559*),
  - μειορρυθμίζει λειτουργικά και να αποσταθεροποιεί δομικά τα *HK2* και *GAPDH* γλυκολυτικά ένζυμα, αντίστοιχα, οδηγώντας ως εκ τούτου στην ελάττωση της βιο-ενεργειακής απόδοσης του μονοπατιού της γλυκόλυσης και στην επακόλουθη αποδυνάμωση του “*Warburg Effect*”,

- επάγει αντισταθμιστικές και προαγωγικές αποκρίσεις που σχετίζονται με τους μηχανισμούς πρόσληψης γλυκόζης, όπως καταδεικνύεται από τη μειορρύθμιση της *AS160* πρωτεΐνης (αντισταθμιστική δράση) και τη μειορρύθμιση των *Tug* και *Rab10* πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με αυτή διακριτών μελών των *Rab* και *GLUT* γονιδιακών οικογενειών (προαγωγική δράση),
- ενεργοποιεί τον αυστηρά κυτταρο-ειδικό και δοσο-εξαρτώμενο μηχανισμό «Αποσιώπησης Ματίσματος Εξωνίου» (*ESS: Exon Splicing Silencing*) σε όλο το μήκος του *GLUT4* γονιδιακού *RNA* μεταγράφου,
- οδηγεί τα προσβεβλημένα κύτταρα σε υψηλά επίπεδα βιο-ενεργειακής κρίσης, όπως αποδεικνύεται από την ταχεία και δραματική ελάττωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων *ATP*, καθώς και από την ισχυρή μείωση παραγωγής του τελικού μεταβολίτη της αερόβιας γλυκόλυσης (γα)λακτικού οξέος,
- διαμορφώνει τέτοιου είδους ενδοκυτταρικά περιβάλλοντα που να επιτρέπουν την ισχυρή και δοσο-ελεγχόμενη διάσωσή τους μετά από την εκλεκτική αναστολή της ενεργότητας των *Akt*-εξαρτώμενων (*LY294002*) και *p44/42 MAPK*-ρυθμιζόμενων (*U0126*) μονοπατιών σηματοδότησης, με την *HK2* γλυκολυτική Εξωκινάση να αποτελεί έναν από τους πλέον υποσχόμενους κρίσιμους καθοριστές του εν λόγω φαινομένου «επαναφοράς βιωσιμότητας».

Τα πειραματικά ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αναδεικνύουν την θεραπευτική σπουδαιότητα μορίων που στοχεύουν στην πρόκληση γονιδιωματικής, πρωτεωμικής, σηματοδοτικής και βιο-ενεργειακής κρίσης - επιλεκτικά- στα κύτταρα του όγκου, και διαμορφώνουν μία ισχυρή πλατφόρμα για ανάπτυξη νέων, αποδοτικών και ασφαλών πρωτοκόλλων διαχείρισης ανθρώπινων κακοηθειών, με έμφαση σε αυτές που αφορούν στην ουροδόχο κύστη.

---

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS**  
**SCHOOL OF NATURAL SCIENCES**  
**FACULTY OF BIOLOGY**  
**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND BIOPHYSICS**

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis Abstract

**BIOLOGICAL ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF CONVENTIONAL  
AND TARGETED CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS IN MODEL SYSTEMS  
WITH EMPHASIS IN BLADDER CANCER**

*Ph.D.* Candidate

**EUMORPHIA G. KONSTANTAKOU, *B.Sc.***

Biologist

Three-member Consulting Committee

**DIMITRIOS J. STRAVOPODIS**, Assistant Professor – Supervisor

**ISSIDORA S. PAPASSIDERI**, Associate Professor

**LUKAS H. MARGARITIS**, Emeritus Professor

Athens, 2013

## Doctorate (Ph.D.) Abstract Thesis

According to recent studies (2012) of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Organization, urinary system malignancies represent ~7.2% in adults and ~4.5% in children of all types of human malignancies, with bladder cancer being diagnosed as the most frequent form of urinary cancer, also occupying the 4<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> appearance-position among men and women, respectively.

An important constraint in the successful battling of human cancer is the frequent development of tumor cell resistance against the applied chemotherapy protocols. This necessitates for the thorough decoding of drugs' molecular actions and establishment of a new generation of anti-tumor agents carrying reduced systemic toxicity and improved therapeutic potential.

Cisplatin, one of the 1<sup>st</sup> generation compounds based on platinum (*Pt*), and a valuable component of the MVAC (*Methotrexate-Vinblastine-Adriamycin-Cisplatin*) and GC (*Gemcitabine-Cisplatin*) therapeutic cocktails against advanced and metastatic transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder, is able to induce structural damage of the nuclear genomic DNA, through the generation of inter- or intra-molecular cross-links, widely known as "DNA adducts", therefore strongly promoting cell elimination and death. Bortezomib, a 2<sup>nd</sup> generation pharmacological compound structured by "Boron" (*B*) element and a valuable therapeutic tool against human multiple myeloma, through its ability to selectively inhibit the chymotrypsin-like proteolytic activity of proteasome, has been recently entered in a number of clinical trials for different malignancies, with lung and prostate being two representative examples. 3-BrPA [*3-Bromopyruvate (3-Bromopyruvic Acid)*], a 3<sup>rd</sup> generation, regarding its functional dynamics, synthetic compound, and structural homolog of lactic acid, through its function as a specific inhibitor of HK2 (*Hexokinase II*) and GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) metabolic enzymes, induces hindrances in the glycolytic process, which -in contrast to normal cells- cancer cells prove to tightly depend on, in order to produce energy in the form of ATP, a phenomenon widely known as "Warburg Effect".

The aim of the present Doctorate (Ph.D./Dissertation) Thesis was the investigation of activation of apoptotic, autophagic and necrotic cell death programs,

in combination with the examination of structural and functional integrity of critical signaling pathways, -all- as fundamental bio-molecular responses of human bladder cancer cells to conventional (*Cisplatin*) and targeted (*Bortezomib* and *3-BrPA*) actions of selected -chemical- pharmaceutical compounds, in order to develop reliable pre-clinical -cellular and animal- models carrying strong therapeutic value against discrete forms of human malignancy and specifically bladder cancer.

The basic biological platform chosen to be analyzed contained the four (4) human bladder cancer cell lines *RT4* (grade *I*), *RT112* (grade *I-II*), *T24* (grade *III*) and *TCCSUP* (grade *IV*), which are mainly characterized, besides their different malignancy grade, by distinct *p53* genetic background, while, when required, the human colon cancer *HCT116-p53<sup>+/+</sup>* and *HCT116-p53<sup>-/-</sup>* isogenic cell lines were also examined. The adopted experimental strategy regarding the application of a number of technical protocols and methods is mainly described as following: a) *in vitro* culturing of cell lines, b) cell viability and cytotoxicity MTT assays, c) FACS reactions, d) protein analysis via SDS-PAGE electrophoresis and Western immunoblottings, e) semi-quantitative (sq)RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) reactions for gene transcription analysis, f) transient transfections of (*T24*) cells with gene (*hp53*) expression plasmids, g) genomic DNA purifications, h) DNA sequencing reactions, i) proteasome activity assays, j) quantifications of ADP/ATP bio-energetic ratio, k) quantifications of lactic acid, l) development of bladder tumor Xenografts in SCID (*severe combined immunodeficiency*) immuno-deficient mice and m) assays of *in vivo* administration of chemotherapeutic factor(s) in SCID mice carrying bladder tumor Xenografts, and further evaluation of drug's therapeutic/cytotoxic capacity against tumor survival and growth.

Both *RT4* and *T24* cells proved vulnerable to the cytotoxic action of Cisplatin, with *T24* being presented comparably more resistant to all drug doses. Exposure to Cisplatin resulted in the proteolytic process and subsequent activation of Caspase repertoire, with Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 being the most notable examples, an observation that directly reflects the drug-induced engagement of the external (dependent on trans-membrane death receptors) and internal (dependent on mitochondria) cell death apoptotic pathway. The differential sensitivity of *RT4* and *T24* cell types to Cisplatin apoptotic power seems to be tightly associated with former's ability to strongly upregulate the total and phosphorylated, on Ser<sup>15</sup> and

Ser<sup>392</sup>, expression levels of p53 transcription factor, and latter's inability to engage p53-dependent pathways in response to the drug. Moreover, the *RT4*-specific proteolysis of Akt serine/threonine kinase, together with the XIAP -apoptotic inhibitor- respective one, after Cisplatin administration, are able to render cells more susceptible to drug's genotoxic stress, mainly through enhancement of their apoptotic elimination. The exclusively in *T24* cells detectable expression of phosphorylated on Ser<sup>473</sup>, and therefore activated, Akt kinase directly reflects their (*T24*) strong metastatic potential and comparatively higher drug resistance against chemotherapeutic actions. Cisplatin's cytotoxic potency in malignant urothelium proved to be linked to a dose-dependent proteolysis of Hsp90 molecular chaperone and following production of an approximately 65 kDa molecular fragment bearing a -presumably- dominant negative activity, only in *RT4* but not *T24* cells, which could likely result in the structural destabilization of certain proteome members, such as the Akt and XIAP anti-apoptotic regulators. By evaluating the Granzyme B serine protease drug-induced expression profile, exclusively in *RT4* cells, it was strongly suggested the enzyme's ability to selectively proteolyse Hsp90 and drive affected cells to loss of their structural stability. In contrast, Cisplatin was unable to promote a general impairment of transcription machinery, but was rather capable to perturb its functional capacity by a gene-specific manner. Based on gene expression profiles, in response of bladder cancer cells to the drug, three distinct groups of genes could be clearly typified: a) genes regulating apoptosis in a p53-independent manner (i.e. *Bik*, *Bim* and *Bcl-2*); b) p53-dependent genes implicated in apoptosis (i.e. *FasL* and *TRAIL*) and c) genes that control the influx/efflux (trafficking) of Cisplatin independently of the *p53* genetic background (i.e. *ATP7A/B* and *CTR1*). *In toto*, it was revealed that the cytotoxic power of Cisplatin is directly associated with transcriptional responses of genes controlling apoptosis and efflux, but not influx, of the drug in the damaged cells. It is remarkable that the comparative assessment of the new generation Pt-structured compounds Carboplatin and Oxaliplatin, in terms of their toxic actions in *T24* cell survival, disclosed their compromised chemotherapeutic strength, compared to Cisplatin one, in all clinically relevant doses and administration times of the drug.

Investigating the chemotherapeutic effects of the targeted drug Bortezomib in human malignant urothelium, it proved its ability to:

- Induce cell-specific toxicity in the form of Caspase-dependent apoptotic death, through activation of the external (implication of the trans-membrane death receptors) and internal (implication of mitochondria) pathway of apoptotic signaling;
- Engage both promoting and counterbalanced (defensive) cell-specific death responses that are modulated by the respective expression levels and post-translational modifications of the anti-apoptotic regulators Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, cIAP-1, Survivin and Livin, with XIAP inhibitor undergoing strong and drug-mediated ubiquitin(yl)ation;
- Induce extensive genotoxicity in the form of -mainly- double strand DNA breaks, as clearly evinced by the strongly upregulated levels of phosphorylated H2AX histone in response to the drug;
- Eliminate the distinct malignancy grade (I, I-II, III and IV) urothelial cancer cells through a p53-independent mechanism, given that only *RT4* (grade I), and not the other cell types, proved capable to stabilize, phosphorylate and activate p53 transcription factor after Bortezomib administration;
- Regulate autophagosome biogenesis in a cell micro-environment-dependent fashion, as documented by the drug-induced autophagy enhancement in low malignancy cells (*RT4* and *RT112*) and its (autophagy) drug-mediated downregulation in highly malignant cells (*T24*) carrying strong and constitutive autophagy levels, widely known as “autophagy addiction”;
- Perturb in a cell-specific manner the structural and functional integrity of critical signaling pathways, as it is characteristically evidenced by the proteolytic cleavage of Akt kinase, together with the strong upregulation of the GSK-3 $\beta$  and p38 MAPK kinase phosphorylated levels in *RT4* and *RT112* cells after their exposure to the drug;
- Lead to Granzyme B-independent proteolytic truncation of the Hsp90 and Hsp70 critical molecular chaperones, following a cell-dependent profile, therefore promoting a rather generalized structural vulnerability of malignant urothelial proteome and more specifically its respective kinome;
- Control -differentially- the transcriptional expression of target genes, without - in general- corrupting the functional integrity of transcription machinery;



- Inhibit -drastically- the chymotrypsin-like activity of urothelial proteasome and promote the drug-mediated accumulation of (poly-)ubiquitinated proteins, which are structured in a form of multi-molecular aggregates;
- Reduce -strongly- *in vivo* the development and growth of *T24* (grade III) and *RT112* (grade I-II) experimental -urothelial- tumor Xenografts in SCID (*severe combined immunodeficiency*) immuno-deficient mice;
- Decrease -dramatically- the percentage of secondary metastatic foci of *T24* -malignant- tumor Xenografts *in vivo*, as documented by the inability to detect any metastasis event in the exposed to Bortezomib SCID/*T24* mice.

Additional findings of the present Dissertation Thesis are related to the strong correlation of high malignancy grade of *T24* (III) cells, compared to *RT4* (I) ones, with constitutively upregulated levels of proteasomic, autophagic and signaling (as reflected by the phosphorylation levels of critical kinases) activity (respective “addiction”) carried by the former (*T24*), but not latter (*RT4*) cell type.

In an effort to decode the mode of actions of 3-BrPA in human bladder cancer cells (and colon carcinoma, as well), the drug proved capable to:

- Induce a rapid, grade-specific and cell density-dependent strong cytotoxicity, following tight and dose-controlled profiles, as clearly evinced by *T24*, *T24-X* (a newly established cell line, derived from SCID/*T24* Xenografts) and *TCCSUP* susceptibility, together with *RT4* and *RT112* resistance, to the drug;
- Activate dose-dependent apoptosis and programmed necrosis in the high, but not low, malignancy urothelial cells, with apoptosis being engaged at the low while necrosis at the high concentrations of 3-BrPA;
- Mobilize mechanisms of programmed necrosis, mainly being characterized by: a) absence of Caspase function, b) differential and distinct profiles of PARP and Lamin A/C proteolytic cleavages and c) inversion of the drug-mediated cytotoxic phenotype via the action of PJ-34 specific inhibitor of PARP enzyme (polymerase), thus suggesting the involvement of a unique cell death program, widely known as “parthanatos”;
- Downregulate -drastically- the constitutively high expression levels of proteins controlling autophagy, which are likely required for the survival and growth of *T24* and *T24-X* high malignancy cells, a phenomenon generally described as “autophagy addiction”;

- Disrupt the structural and, mainly, the functional integrity of IGF-IR / Akt / GSK-3 – FoxO, mTOR / S6, AMPK and p38 MAPK critical axes of cellular signaling;
- Induce, selectively in these drug doses that promote programmed necrotic responses, the formation of a (p-)p44/42 MAPK-like phosphorylated isoform of ~47 kDa, likely through a 3-BrPA-regulated mechanism of differential splicing, without excluding the alternative scenario of a post-translational modification based on selective pyruvylation;
- Orchestrate the activation of a strong and dose-dependent genomic toxicity, in the form of double strand DNA breaks, as documented by the significantly increased accumulation levels of phosphorylated H2AX histone after drug administration;
- Exert intense cytotoxic action in human cancer cells of the bladder (*T24*) and colon (*HCT116*), engaging p53-independent signaling networks;
- Present with strong “therapeutic” / cytotoxic synergism with the PRIMA-1 specific activator of mutant p53 form(s) (*T24* and *T24-X*), exhibiting tight and dose-dependent profiles;
- Kill -selectively- malignant cells of human urothelium that present with strong tolerance to glucose deprivation (*T24*, *T24-X* and *TCCSUP*);
- Promote programmed necrotic death independently from the *K-Ras* (*G13D* mutation) and *B-Raf* (*V600E* mutation) genetic background, in sharp contrast to the respective dependence correlation of metabolome – genome in human colon cancer cells, as previously reported (*Yun et al., 2009, Science 325: 1555-1559*);
- Downregulate functionally and destabilize structurally the HK2 and GAPDH glycolytic enzymes, respectively, therefore resulting in severe compromise of the bio-energetic efficiency of glycolytic pathway, and the following debilitation of “Warburg Effect”;
- Induce counterbalanced (defensive) and promoting responses that are implicated in glucose uptake mechanisms, as documented by the downregulation of AS160 protein (counterbalanced action) and downregulation of Tug and Rab10 proteins, together with the one of *Rab* and *GLUT* distinct family members (promoting actions);

- Activate the strictly cell-specific and dose-dependent mechanism of Exon Splicing Silencing, widely known as ESS, throughout the whole length of *GLUT4* -precursor- (unspliced) RNA transcript;
- Drive the affected cells to high levels of bio-energetic crisis, as evidenced by the rapid and dramatic reduction of cellular ATP contents, together with the strong decrease of lactate (end-product of -aerobic- glycolysis) concentrations, an important bio-marker of glycolysis suppression;
- Shape unique cellular micro-environments that allow their strong and dose-controlled rescue and survival after targeted inhibition of Akt-dependent (via LY294002) and p44/42 MAPK-regulated (via U0126) signaling functions, with HK2 glycolytic exokinase representing one of the most promising and critical modulators of this “life-restoration” effect;

The experimental findings of the present Doctorate (*Ph.D.*) Thesis unveil the therapeutic capacity and importance of -small- molecules that can target to the activation of genomic, proteomic, signaling and bio-energetic (i.e. glycolytic) crisis, selectively in tumor cells, and create a valuable biological platform for the development of novel, efficient and safe protocols regarding the successful management of human malignancies, with special emphasis in the ones related to urinary bladder.

## Πρωτότυπες Ερευνητικές Δημοσιεύσεις Διδακτορικής Διατριβής

- ❖ **E.G. Konstantakou, G.E. Voutsinas, P.K. Karkoulis, G. Aravantinos, L.H. Margaritis and D.J. Stravopodis:**

Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *International Journal of Oncology (IJO)*, 2009, August, Vol. 35, No. 8, pg. 401 - 416.

- ❖ **E.G. Konstantakou et al.:**

Bortezomib-induced eradication of bladder cancer cells depends on apoptosis, autophagy and signaling deregulation, but does not require p53 activity. *In preparation*, 2013.

- ❖ **E.G. Konstantakou et al.:**

3-Bromopyruvate disrupts signaling integrity and induces apoptotic and non-apoptotic death in human urinary bladder cancer cells. *In preparation*, 2013.

# Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses

EUMORPHIA G. KONSTANTAKOU<sup>1</sup>, GERASSIMOS E. VOUTSINAS<sup>2</sup>, PANAGIOTIS K. KARKOULIS<sup>2</sup>, GERASIMOS ARAVANTINOS<sup>3</sup>, LUKAS H. MARGARITIS<sup>1</sup> and DIMITRIOS J. STRAVOPODIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou 157 84;

<sup>2</sup>Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, NCSR 'Demokritos', 153 10 Athens;

<sup>3</sup>3rd Clinic of Pathology-Oncology, 'Agiou Anargyroi' Oncology Hospital, Ilion 131 22 Athens, Greece

Received March 30, 2009; Accepted May 27, 2009

DOI: 10.3892/ijo\_00000353

**Abstract.** Cisplatin is a first-line chemotherapeutic agent and a powerful component of standard treatment regimens for several human malignancies including bladder cancer. DNA-Pt adducts produced by cisplatin are mainly responsible for cellular toxicity and induction of apoptosis. Identification of the mechanisms that control sensitivity to cisplatin is central to improving its therapeutic index and to successfully encountering the acquired resistance frequently emerging during therapy. In the present study, using MTT-based assays, Western blotting and semi-quantitative RT-PCR, we examined the apoptosis-related cellular responses to cisplatin exposure in two human urinary bladder cancer cell lines characterized by different malignancy grade and p53 genetic status. Both RT4 (grade I; wild-type p53) and T24 (grade III; mutant p53) cell types proved to be vulnerable to cisplatin apoptotic activity, albeit in a grade-dependent and drug dose-specific manner, as demonstrated by the proteolytic

processing profiles of Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, and the Caspase repertoire characteristic substrates PARP and Lamin A/C, as well. The differential resistance of RT4 and T24 cells to cisplatin-induced apoptosis was associated with an RT4-specific phosphorylation (Ser15; Ser392) pattern of p53, together with structural amputations of the Akt and XIAP anti-apoptotic regulators. Furthermore, cisplatin administration resulted in a Granzyme B-mediated proteolytic cleavage of Hsp90 molecular chaperone, exclusively occurring in RT4 cells. To generate functional networks, expression analysis of a number of genes, including *Bik*, *Bim*, *Bcl-2*, *FAP-1*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL*, *Puma*, *Caspase-10*, *ATP7A*, *ATP7B* and *MRP1*, was performed, strongly supporting the role of p53-dependent and p53-independent transcriptional responses in cisplatin-induced apoptosis of bladder cancer cells.

## Introduction

With its incidence continuing to increase, bladder cancer is classified among the five most common malignancies in industrialized countries (1). Forming a worldwide estimate over one million patients, bladder cancer is clearly considered a significant public health issue around the world (2). The three main types of cancer affecting bladder are transitional cell carcinoma (TCC), squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ADC), with TCC representing >90% of all bladder cancers. Four clinically distinct entities of TCC have been recognized: superficial, papillary tumors (Ta and T1), carcinoma *in situ* (Tis), muscle-invasive tumors (T2-T4) and advanced disease, involving extra-pelvic nodal or distant metastasis (3,4). Metastatic TCC demonstrates a moderate sensitivity to chemotherapy while a significant variation in patient survival rates and activity levels of individual regimens has been observed (5).

Cisplatin-based combination chemotherapy protocols, such as MVAC (methotrexate-vinblastine-adriamycin-cisplatin), constituted for a number of years standard treatment of patients with advanced (or metastatic) urothelial bladder cancer. However, due to the MVAC-induced systemic toxicity, novel therapeutic schemes containing different drug-cocktails have been developed, with cisplatin occupying a central position

---

*Correspondence to:* Dr Dimitrios J. Stravopodis, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou 157 84 Athens, Greece  
E-mail: dstravop@biol.uoa.gr

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; cisplatin, *cis*-diamminedichloroplatinum (II)/*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]/CDDP; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECL, enhanced chemiluminescence; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HRP, horseradish peroxidase; Hsp90, heat shock protein 90; IAPs, inhibitor of apoptosis proteins; MMLV, Moloney murine leukemia virus; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween-20

**Key words:** apoptosis, bladder, cancer, chemotherapy, cisplatin, p53, resistance

among them (i.e., GC: gemcitabine-cisplatin) (3-5). Cisplatin is structured by a platinum atom surrounded by two ammonium and two chloride atoms in the *cis* position of a horizontal plane (6-8). Upon entering a cell, cisplatin becomes activated through an aquation process characterized by the loss of chloride ions and gain of two water molecules. This positively charged derivative can subsequently interact with a variety of cellular components bearing nucleophilic sites, including, among others, cytoskeletal microfilaments, membrane phospholipids, proteins, RNA and DNA. However, it is generally accepted that DNA is the preferential and cytotoxic target for cisplatin (7-9). The platinum atom of cisplatin forms covalent bonds to the N-7 atoms of the imidazole rings of guanosine and adenosine that reside in the major groove of the double helix, thus resulting in the formation of DNA adducts. These are typified in six major categories characterized by 1,2-d(GpG) intrastrand crosslinks, 1,2-d(ApG) intrastrand crosslinks, 1,3-d(GpXpG) intrastrand crosslinks, G-G interstrand crosslinks, monofunctional crosslinks and intermolecular DNA-protein crosslinks, all inducing prominent, albeit variable, DNA structural distortions (6-10).

Cisplatin-mediated damage of genomic DNA causes severe cell cycle perturbation and arrest at certain checkpoints, while in the absence of adequate repair the affected cells undergo programmed cell death via an apoptosis process. The specific apparatus that triggers apoptosis in response to cisplatin should not only be able to detect genome detriments, but also to determine whether damage is sufficiently severe to be lethal (6,7,9-12). Transduction of DNA-damage signals induced by cisplatin critically modulates, among others, the apoptosis-promoting activity of p53 transcription factor and the cell survival-protecting function of Akt serine/threonine kinase (6,9,13-19). Interestingly, mutations in the p53 genetic locus have been strongly implicated in bladder cancer development, whereas there has been controversy regarding the role of p53 in cellular resistance to cisplatin (3,4,6,20). The relationship between p53 status and cisplatin cytotoxicity should depend on tumor cell type, activation of specific signaling pathways, the presence of additional genetic alterations and other p53-independent determinants (6).

In this context, here, we have studied the cisplatin-induced apoptotic responses of two human urinary bladder cancer cell lines, mainly distinguished by their disparate grade of malignancy. Our data demonstrate that the differential resistance of the p53-proficient RT4 cell line (grade I) and p53-deficient T24 cell line (grade III) to cisplatin-mediated apoptosis is tightly associated with p53-dependent and p53-independent cellular activities. The critical role of p53, Akt, XIAP and Hsp90 proteins was evaluated, while the expression profile of several genes involved in apoptosis and resistance to the drug was also examined.

## Materials and methods

**Drugs and reagents.** Cisplatin was purchased from EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG (Unterach, Austria). The antibodies recognizing Caspase-3 (#9662), Caspase-8 (#9746), Caspase-9 (#9502), PARP (#9542), Lamin A/C (#2032),  $\beta$ -Actin (#4968), p53 (#9282), Phospho-p53-Ser15 (#9284), Phospho-p53-Ser392 (#9281), Akt (#9272), Phospho-Akt-

Ser473 (#9271), XIAP (#2042) and Granzyme B (#4275) were obtained from Cell Signaling Technology Inc. (Hertfordshire, UK), whereas the antibody against Hsp90 (SC-13119) was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA). ECL Western blotting reagents were supplied by GE Healthcare-Amersham (Buckinghamshire, UK). Gene-specific oligonucleotide primers were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany) and Operon (California, USA). All the other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA), Fluka (Hannover, Germany) and AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany).

**Cells and culture conditions.** The established cell lines from TCC human bladder cancer, RT4 (grade I) and T24 (grade III) were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK) and Professor John R. Masters (Prostate Cancer Research Centre, Institute of Urology, UCL, UK), respectively. Both cell lines were maintained in DMEM containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 50 mM sodium bicarbonate and 1x non-essential amino acids at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Contrary to the wild-type p53 genotype of RT4 cells, the T24 cell line contains a p53 mutant allele that carries an in-frame deletion of the TAC triplet encoding tyrosine 126 (Y<sup>126</sup>) (21,22). All cell culture media and reagents were purchased from Biochrom AG (Berlin, Germany).

**Cell viability assay.** RT4 and T24 cells were seeded at densities of 20000 cells/well into 48-well flat-bottomed plates, treated with or without cisplatin (1, 10 and 50  $\mu$ g/ml) and incubated for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Cell viability was assessed by MTT assay (23). Two hundred microliters of 0.5 mg/ml MTT solution (Sigma-Aldrich) was added to each well. After 4 h of incubation, the generated formazan crystals were dissolved in 200  $\mu$ l of isopropanol. The absorbance of each well was measured in an ELISA microtiter plate reader (Dynatech MR5000; Dynatech Laboratories, USA) at 570 nm, using 630 nm as a wavelength of reference. Absorbance obtained by untreated cells was rated as 100% of cell survival. Each MTT assay was repeated three times, using three wells per experimental condition.

**Western blotting.** At 24 h after cisplatin treatment (1 and 10  $\mu$ g/ml), the RT4 and T24 cells were harvested, washed twice with PBS and solubilized in lysis buffer [15 mM Tris-base, 75 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2% Triton X-100, 10% glycerol and 2 mM PMSF (pH 7.6 at 4°C)]. After centrifugation at 12000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was collected as the total protein extract and stored at -30°C. Protein concentrations were measured using the Bradford-type protein assay (Bio-Rad, USA). Equal amounts of protein (40  $\mu$ g) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell GmbH, Germany). Each membrane was blocked with 5% non-fat dry milk (or 5% BSA where required) in TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl and 0.2% Tween-20] for 2 h at room temperature and subsequently incubated with primary antibody (1:1500) for 16 h at 4°C.

Table I. Gene names, forward (F) and reverse (R) primer sequences, molecular sizes (bp) of the obtained PCR products and PCR conditions (temperature and number of cycles) for the herein studied genes critically associated with cisplatin-induced apoptosis and drug resistance of human bladder cancer cells.

Gene name	Primer sequence	Length of PCR product (bp)	Temperature (°C)	Number of cycles
1. <i>Bik</i>	F: 5'-CTG TAT GAG CAG CTC CTG G-3' R: 5'-GAT GTC CTC AGT CTG GTC G-3'	252	55	30
2. <i>Bim</i>	F: 5'-TGT GAC AAA TCA ACA CAA ACC C-3' R: 5'-AGT CGT AAG ATA ACC ATT CGT G-3'	230	57	30
3. <i>Bcl-2</i>	F: 5'-TGT GGC CTT CTT TGA GTT CG-3' R: 5'-AGC AGA GTC TTC AGA GAC AG-3'	222	55	30
4. <i>FAP-1</i>	F: 5'-CAG ATG GAA GTA TAG CCT TG-3' R: 5'-TAG ATG GAC TTT CAC TGG AG-3'	228	53	30
5. <i>GAPDH</i>	F: 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3' R: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'	189	55	28
6. <i>Fas</i>	F: 5'-GGA TGA ACC AGA CTG CGT G-3' R: 5'-CTG CAT GTT TTC TGT ACT TCC-3'	371	55	30
7. <i>FasL</i>	F: 5'-CTC TGG AAT GGG AAG ACA CC-3' R: 5'-ACC AGA GAG AGC TCA GAT ACG-3'	325	57	40
8. <i>TRAIL</i>	F: 5'-TGG CTA TGA TGG AGG TCC AG-3' R: 5'-GTT GCC ACT TGA CTT GCC AG-3'	249	57	30
9. <i>Puma</i>	F: 5'-CAG ACT GTG AAT CCT GTG CT-3' R: 5'-ACA GTA TCT TAC AGG CTG GG-3'	251	55	35
10. <i>Caspase-10</i>	F: 5'-CAT AGG ATT GGT CCC CAA CA-3' R: 5'-CTT GAT ACG ACT CGG CTT CC-3'	500	55	32
11. <i>ATP7A</i>	F: 5'-GCC TCT GAC ACA AGA AAC TG-3' R: 5'-GCT ATT ACT ACC AAC GGC TC-3'	246	55	30
12. <i>ATP7B</i>	F: 5'-GCT GAT TGG AAA CCG TGA GT-3' R: 5'-ATT GCG ATC ATC CCA CAG AG-3'	144	55	30
13. <i>MRP1</i>	F: 5'-ACC TGG AAA CGG ACG ACC T-3' R: 5'-TAC TCC TGG ATT TCT CCT TTG-3'	142	55	32
14. <i>CTRI</i>	F: 5'-CCT TCT CAC CAT CAC CCA AC-3' R: 5'-CTT GTG ACT TAC GCA GCA GG-3'	238	57	30

Immunoreactivity was detected by sequential incubation with HRP-conjugated secondary antibody (1:2000) and ECL reagents (24). Data were obtained from three different experiments, one of which is illustrated in the present study.

**Semi-quantitative RT-PCR analysis.** RT4 and T24 cells were treated with the indicated doses of cisplatin for 24 h (0, 1 and 10  $\mu$ g/ml) and total RNA was extracted with the TRIzol reagent, according to manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). One microgram of RNA was reverse transcribed in 20- $\mu$ l reaction volume containing an oligo-d(T) primer

(Invitrogen) and the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNA was subsequently amplified by semi-quantitative PCR with the Biometra T3000 thermocycler (Goettingen, Germany), using 10 pmole of each forward and reverse cDNA-specific primer in a final volume of 25  $\mu$ l. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis following standard procedures (25). The gene-specific names, the forward (F) and reverse (R) primer sequences, the molecular size of the amplified fragments, the annealing temperatures ( $T_a$ ) and the number of cycles performed for all the examined genes are summarized in Table I. Ampli-

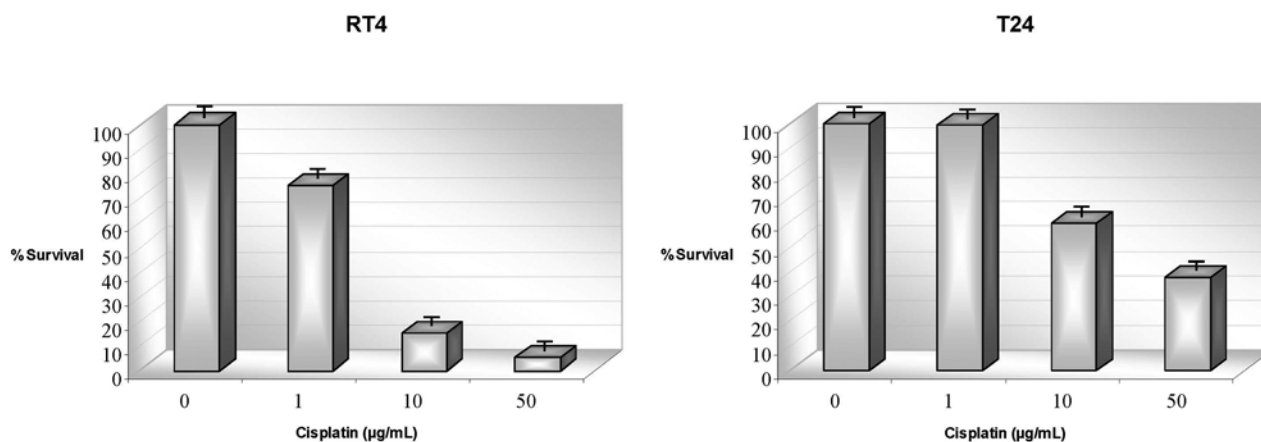


Figure 1. Grade-specific and dose-dependent cytotoxicity induced by exposure of RT4 (grade I) and T24 (grade III) human urinary bladder cancer cell lines to cisplatin for 24 h, as determined using the MTT assay. T24 were undoubtedly more resistant to the drug activity than RT4 cells. Each drug concentration was tested in three individual wells, while each different experiment was repeated three times. Bars (two-dimensional) denote standard deviation values.

fications were normalized to *GAPDH*, which was used as a gene of reference. Data were collected from three different experiments, one of which is shown here.

## Results

### *Cytotoxic effects of cisplatin against bladder cancer cells.*

The cytotoxic activity of cisplatin on the survival profiles of RT4 and T24 cell lines was determined by MTT assay (23). Treatment with cisplatin for 24 h markedly decreased the viability of RT4 and T24 cells in a dose-dependent manner. The survival rates of RT4 cells in the presence of 1, 10 and 50 µg/ml cisplatin were averaged 75.4, 15.23 and 5.41%, respectively. T24 cells demonstrated significant resistance to drug administration, as clearly documented by the 99.4, 59.47 and 37.9% corresponding (mean) survival percentages (Fig. 1). The grade-specific response to cisplatin likely reflects the distinct genetic background of RT4 and T24 cells (i.e., *p53* status) and their ability to differentially regulate the cell death process.

*Grade-dependent apoptosis induced by cisplatin.* Due to the strong cytotoxicity of 50 µg/ml cisplatin when administered to RT4 cells (Fig. 1), severely affecting protein and RNA extract yield, and in an effort to adopt clinically relevant drug doses, all the following treatments were carried out using 1 and 10 µg/ml of cisplatin concentration. After drug administration in both RT4 and T24 cells, the three major apoptotic components Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-3 were specifically processed, resulting in the formation of active proteases, howbeit exempting Caspase-8 in T24, as clearly revealed by a Western blotting approach. A similar cleavage profile was detected for PARP and Lamin A/C nuclear proteins, which represent characteristic substrates of the mature Caspase repertoire (Fig. 2). The extent of apoptotic response of different cell types to various drug concentrations could be reliably assessed by a quantified proportion of cleaved [C; (i.e., 17 and 19 kDa for Caspase-3)] to precursor [P; (i.e., 35 kDa for Caspase-3)] protein forms. Therefore, by comparing the C/P respective ratios of RT4

and T24 cells, for all the examined apoptotic mediators, it is unambiguously concluded that T24 are significantly more resistant to cisplatin-induced apoptosis than RT4 cells. Even though the higher drug dose (10 µg/ml) is the effective one regarding proteolytic processing of all the examined proteins, Caspase-8 is the only component being cleaved at the lower cisplatin concentration (1 µg/ml) exclusively in RT4 cells, thus corroborating their enhanced sensitivity to the drug. Moreover, the absence of the Caspase-8 18 kDa fragment in T24, but not in RT4 cells, treated with 10 µg/ml cisplatin (Fig. 2 and data not shown) likely reflects a T24-specific hindrance in the formation of a mature protease and an activation impairment of the cognate membrane death receptor-mediated apoptotic pathway (12,26).

### *Cisplatin-mediated induction and phosphorylation of p53.*

Since p53 protein constitutes one of the most critical regulators of DNA damage-induced apoptosis and is frequently associated with chemoresistance in human cancers (6,13-15,18), we sought to evaluate the role of p53 in cisplatin-mediated apoptosis of bladder cancer cells. Lysates derived from control and cisplatin-treated RT4 and T24 cells were subjected to Western blotting, using specific antibodies against total and phosphorylated p53. As shown in Fig. 3, administration of 1 and 10 µg/ml cisplatin in RT4 cells resulted in a strong induction of total and phosphorylated p53 protein levels. Serine residues at positions 15 and 392 (Ser15 and Ser392) were effectively phosphorylated in an RT4-specific manner, thus supporting a role of wild-type p53 in cisplatin cytotoxicity against bladder cancer. Moreover, the higher drug dose (10 µg/ml) appeared to enhance p53 protein instability, as documented by the formation of low molecular weight cleaved forms. In contrast, T24 cells remained almost unresponsive to cisplatin treatment, with an extremely weak upregulation of p53 phosphorylation at Ser15 and an undetectable profile of Ser392 phosphorylation induction and total protein level increase (Fig. 3). *In toto*, the obtained RT4 and T24 distinct patterns strongly indicate the essential role of Y<sup>126</sup> in p53 protein (the missing tyrosine residue in T24 cells), regarding its activity and function under DNA damaging conditions (21,22).



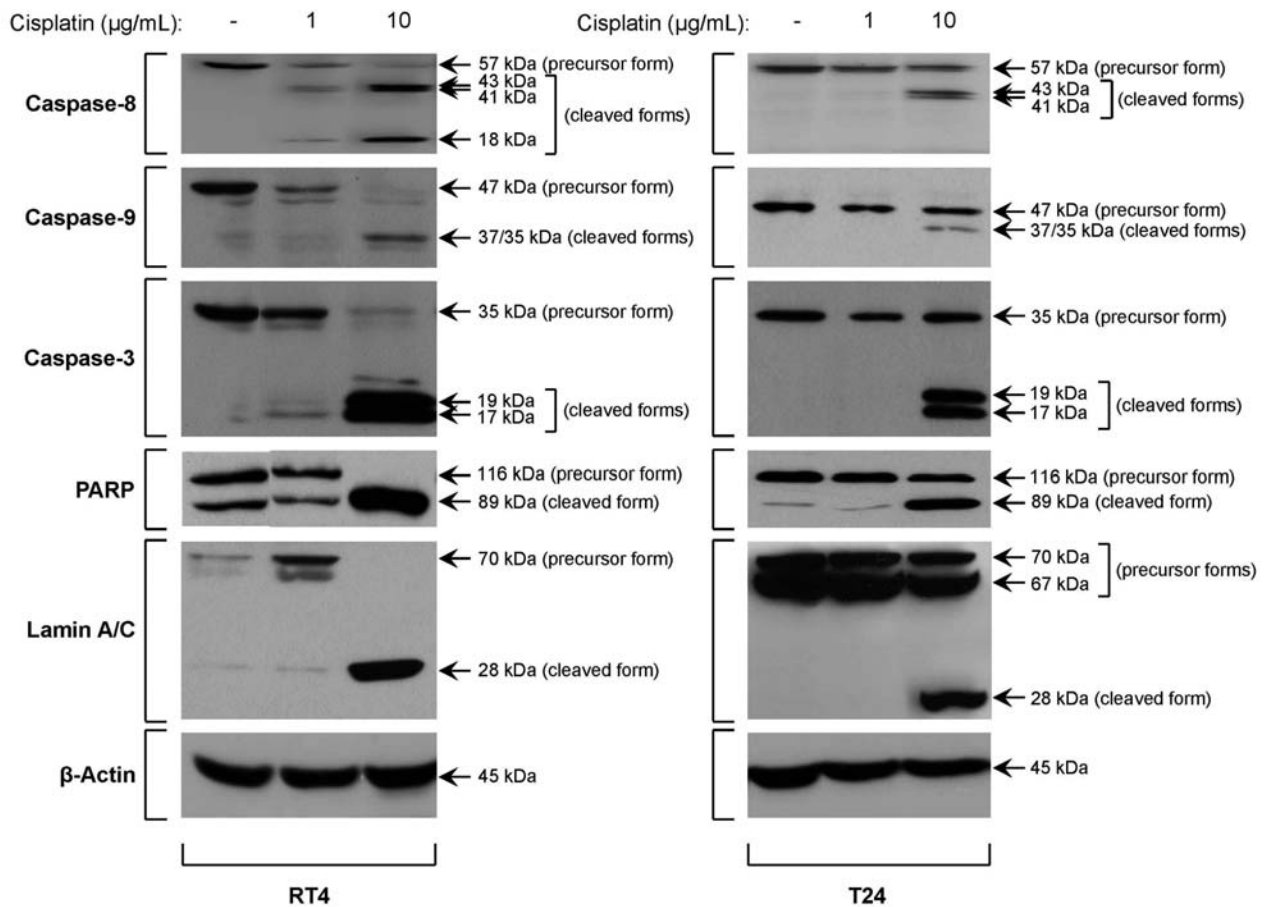


Figure 2. Activation of apoptosis after cisplatin administration, for 24 h, in RT4 and T24 human bladder cancer cells, as evinced by Western blotting. The drug induced a higher dose-dependent cleavage of Caspase-8 (also processed in the RT4 cells treated with the lower drug concentration), Caspase-9 and Caspase-3 family members, and the Caspase repertoire representative substrates PARP and Lamin A/C, as well, in both cell types. However, by comparing the C/P respective ratios for all the examined proteins, a significant relative resistance of T24 cells to cisplatin-mediated apoptosis was unambiguously recognized. Human  $\beta$ -Actin was used as a protein of reference.

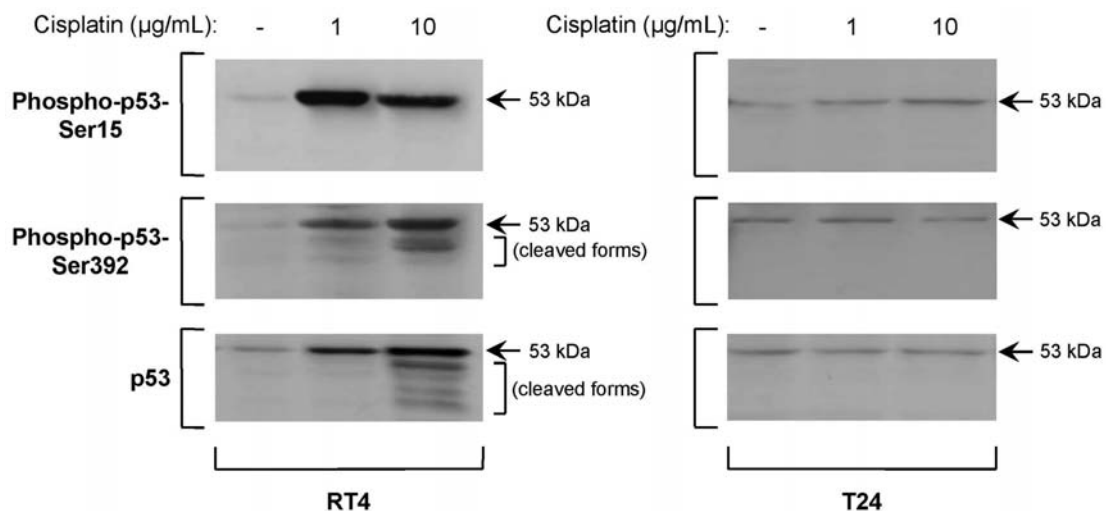


Figure 3. Cisplatin-induced accumulation and serine phosphorylation of wild-type p53 protein (left arrows), but not its mutant counterpart (right arrows), in human bladder cancer cells, as demonstrated by Western blotting. Both drug doses (1 and 10 µg/ml) were able to strongly activate the mechanisms controlling p53 protein levels and phosphorylation events at Ser15 and Ser392 exclusively in RT4 (wild-type p53), but not in T24 (mutant p53) cells. Brackets denote the cleaved forms of the wild-type p53 protein.

*Deregulation of Akt and XIAP signaling integrity by cisplatin.* It has been previously suggested that alterations in p53-dependent apoptosis are critically involved in Akt-mediated

chemoresistance (6,14,18). Thus, the role of Akt serine/threonine kinase and its anti-apoptotic substrate XIAP (6,16) in bladder cancer cells undergoing apoptosis after cisplatin

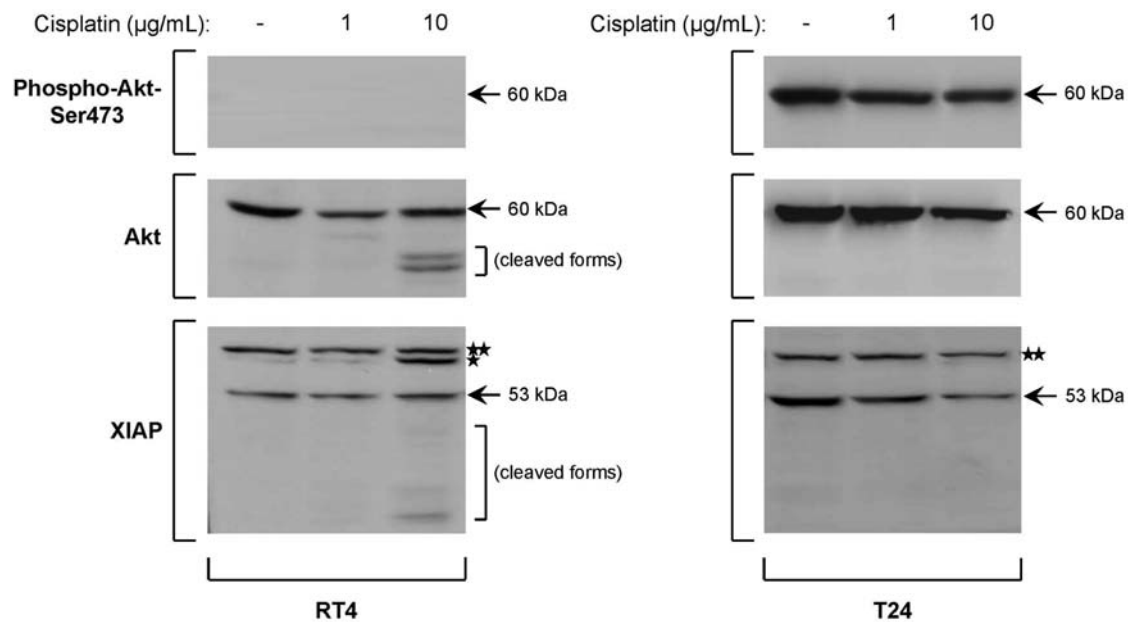


Figure 4. Grade-dependent structural amputation or degradation of the Akt and XIAP anti-apoptotic mediators after exposure of human bladder cancer cells to cisplatin, as shown by Western blotting. In contrast to T24, where a drug dose-dependent decrease of XIAP protein levels was detected, the RT4 cells treated for 24 h with the higher drug dose were characterized by the generation of Akt and XIAP proteolytically processed forms (brackets) that could somehow interfere with the functional activities of their respective uncleaved counterparts (arrows). Interestingly, the RT4 cells were void of the phosphorylated at Ser473 Akt form that was constitutively expressed in T24 cells, albeit moderately diminished upon cisplatin administration. Likewise, a modest reduction of total Akt protein levels was also observed in T24 (and RT4) cells after their treatment with the higher drug dose. Notably, the 1  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin could also lower the total Akt protein content specifically in RT4 but not T24 cells. One asterisk, a likely ubiquitinated form of XIAP; two asterisks, a high molecular weight XIAP-like protein of unknown function.

treatment (Fig. 2) was examined through a Western blotting approach (Fig. 4). In contrast to RT4 cells, T24 were characterized by strongly upregulated levels of phosphorylated Akt on a serine residue at position 473 (Ser473), which could be tightly associated with the different malignancy grade of the two cell lines. The RT4-specific absence of a constitutively activated Akt form, combined together with the generation of two low molecular weight (35 and 40 kDa, approximately) Akt cleaved protein fragments in RT4, but not in T24 cells, after 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin administration, presumably operating as dominant negative or 'squelching' isoforms, could justify the enhanced chemoresistance of T24 to cisplatin cytotoxic activity (Figs. 1, 2 and 4).

Consistent with the observed chemosensitivity profile, the XIAP anti-apoptotic mediator was shown to be cleaved into low molecular weight fragments, with a prominent moiety of 20 kDa, specifically in RT4 cells treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin. The  $\sim 90$  kDa protein band, exclusively detected in these cell lysates, likely represents a ubiquitinated form of XIAP, thus indicating the grade-specific activation of a general ubiquitination mechanism targeting proteins to proteasome for degradation (16,27). The highest molecular weight band could comprise a XIAP-like homologue, whose functional importance remains to be determined. However, in T24 cells, a drug dose-dependent reduction of XIAP expression levels was observed, mainly characterized by a complete absence of protein fragmentation and ubiquitination signs (Fig. 4).

*Cisplatin-induced cleavage of Hsp90 by Granzyme B.* Since Hsp90 critically regulates the conformational maturation

and stability of p53 and Akt proteins, and has recently emerged as a critical target for cancer therapy (28,29), we attempted to examine its role in cisplatin-mediated apoptosis of bladder cancer cells through a Western blotting approach. As shown in Fig. 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  of cisplatin administration resulted in RT4-specific generation of a major Hsp90 cleaved form (a few minor ones could be also observed) with an approximate molecular weight of 65 kDa. This truncated protein product could presumably function in a dominant-negative manner against native Hsp90, thus inducing structural amputations of critical apoptosis mediators (i.e., p53, Akt and XIAP; Figs. 3 and 4), deregulating their functions and/or targeting them to proteasome for degradation (28).

It has been recently reported that Hsp90 represents a *bona fide* substrate of Granzyme B *in vitro* (30). Interestingly, the strong induction of Granzyme B protein levels after treatment of RT4 cells with 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin strongly suggests its essential *in vivo* role in the drug-mediated proteolytic cleavage of Hsp90. In contrast, T24 cells were characterized by a drug dose-dependent Granzyme B down-regulation, clearly justifying their resistance to cisplatin-induced Hsp90 proteolytic processing (Fig. 5).

*Cisplatin-induced transcriptional responses implicated in mitochondria-mediated and membrane death receptor-emanated apoptotic pathways.* Among the majority of genes examined through a semi-quantitative RT-PCR approach, only the ones depicted in Table I displayed prominent alterations in transcriptional activity. Based on their gene expression profiles after drug administration, three major categories can be recognized: a) genes regulating apoptosis in p53-independent

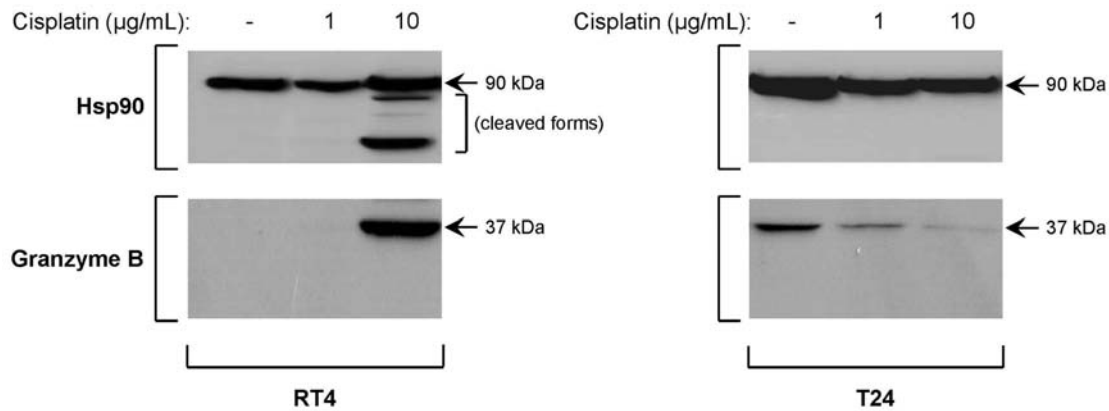


Figure 5. Granzyme B-mediated proteolytic cleavage of Hsp90 after cisplatin administration in human bladder cancer cells: a grade-specific process. As evinced by a Western blotting approach, the higher drug dose was able to significantly induce the Granzyme B protein expression levels and the generation of a major ~65 kDa Hsp90 cleaved fragment (the thick band at the bottom of the bracket) exclusively in RT4 (grade I) but not in T24 (grade III) cisplatin-treated cells.

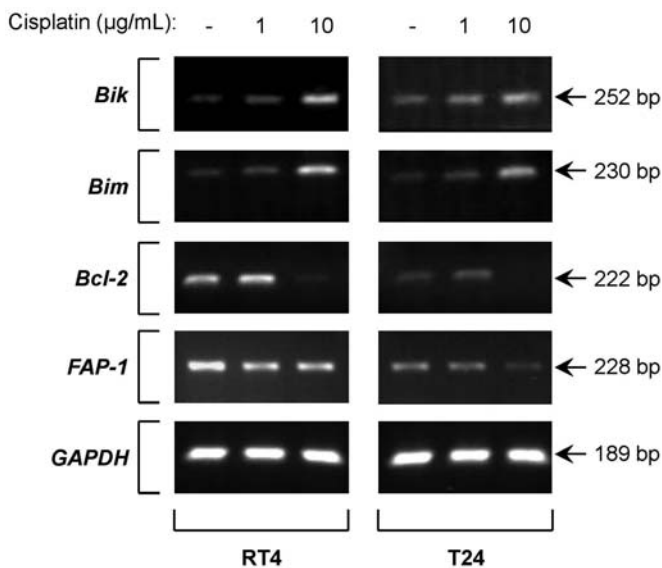


Figure 6. Expression analysis of apoptosis-related genes in cisplatin-exposed human bladder cancer cell lines (RT4 and T24), as demonstrated by semi-quantitative RT-PCR. *GAPDH* was used as a gene of reference (also, for reactions illustrated in Figs. 7 and 8). The transcriptional responses to cisplatin activity of all the genes in this group proved to be regulated in p53-independent manner. The names of the genes are denoted on the left and the respective RT-PCR product sizes on the right.

manner (Fig. 6); b) p53-dependent genes involved in apoptosis (Fig. 7); and c) genes controlling cisplatin uptake and efflux regardless of *p53* genetic status (Fig. 8).

As shown in Fig. 6, and using *GAPDH* as gene of reference, both *Bik* and *Bim* genes were notably upregulated in RT4 and T24 cells treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin. On the contrary, *Bcl-2* expression levels were severely attenuated in the two cell lines examined, only in the higher drug dose, whereas *Bcl-X<sub>L</sub>* and *Mcl-1* gene activities remained unaffected under both cisplatin concentration conditions (data not shown). Given the pro-apoptotic role of *Bik* and *Bim* proteins and the anti-apoptotic activity of *Bcl-2* gene product, all critically regulating mitochondria physiology (26,31), the obtained expression profiles strongly suggest a scenario of drug-induced apoptosis through perturbation of mitochondria function. The

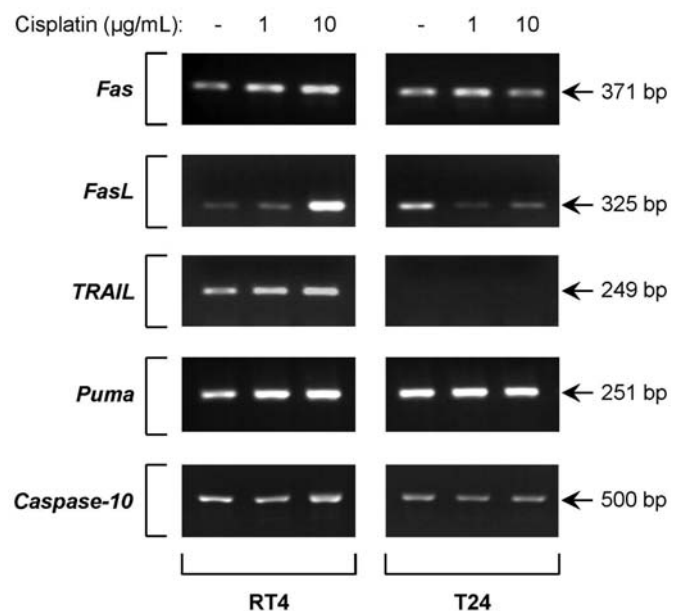


Figure 7. Expression profiles of genes involved in the regulation of apoptosis in human bladder cancer cells (RT4 and T24) treated for 24 h with different doses of cisplatin, as revealed by semi-quantitative RT-PCR. This group of genes was mainly characterized by p53-dependent responses to the drug, exempting, however, *TRAIL*, whose transcriptional silencing specifically in T24 cells could be attributed to distinct regulatory mechanisms (i.e., hypermethylation and/or hypoacetylation). The names of the examined genes are indicated on the left, while the molecular sizes, in base pairs (bp), of the respective RT-PCR fragments on the right.

p53-independent group of apoptotic genes also includes the *FAP-1* (*PTPL1*) gene, coding for an inhibitor of Fas-mediated apoptosis (32,33), which was significantly suppressed in grade-independent manner upon 10  $\mu\text{g/ml}$  of cisplatin exposure (Fig. 6).

However, the membrane death receptor pathways seem to follow grade-specific activation profiles. After 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin administration, the pro-apoptotic genes *Fas* (*APO-1/CD95*), *FasL* (*CD95L*), *TRAIL* and *Caspase-10* were notably upregulated in RT4 cells, while in T24 they remained almost unaffected (albeit a slight downregulation could be observed for *Fas* and *Caspase-10*), exempting *FasL* and *TRAIL*. The

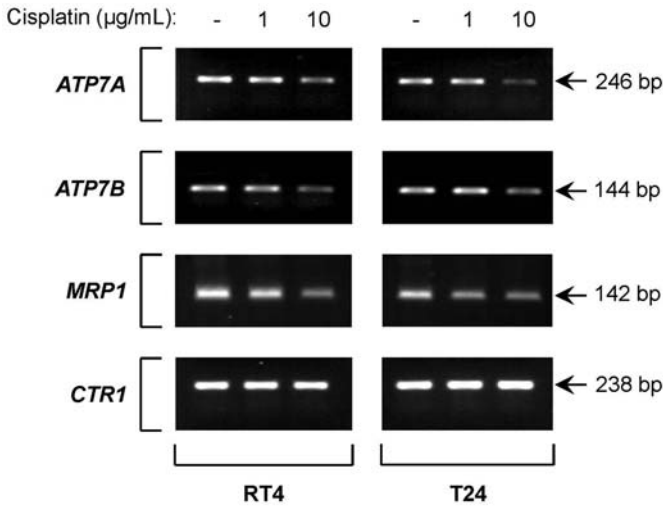


Figure 8. Examination of gene activity implicated in cisplatin trafficking after drug administration, for 24 h, in human bladder cancer cells (RT4 and T24), as evinced by semi-quantitative RT-PCR. In contrast to *CTR1* function (critically involved in cisplatin uptake) that remained unaffected, the genes associated with drug efflux, *ATP7A*, *ATP7B* and *MRP1*, were notably down-regulated in response to the higher dose of cisplatin, exhibiting p53-independent expression profiles. The gene names are shown on the left and their respective RT-PCR product sizes on the right.

significant drug-mediated reduction of *FasL* expression and the severe attenuation of *TRAIL* transcriptional activity in T24 cells indicate (together with *Fas* and *Caspase-10* expression profiles) a high grade-specific functional impairment of distinct membrane death receptor systems regulating apoptosis (Fig. 7). *Fas*, *FasL*, *Puma* and *Caspase-10* seem to be activated in p53-dependent fashion, in accordance with previous reports (34-37), whereas *TRAIL* must follow different, and likely p53-independent (38,39), mechanisms controlling gene activity. Moreover, the RT4-specific induction of *Puma* after drug exposure strongly suggests an essential role of p53 target genes regulating mitochondria functions in cancer chemoresistance (Fig. 7) (26,34).

*p53-independent transcriptional activities associated with cisplatin trafficking*. A major determinant of resistance to cisplatin is the diminished accumulation of the drug in a cell. Tolerance to cisplatin can be acquired by critically modulating, among others, the drug uptake and efflux cellular processes (7,8,40,41). As shown in Fig. 8, the *ATP7A*, *ATP7B* and *MRP1* (*ABCC1*) genes, encoding for membrane transporters decisively implicated in drug efflux (7,8,42-46), were significantly downregulated in both cell types after 10 µg/ml

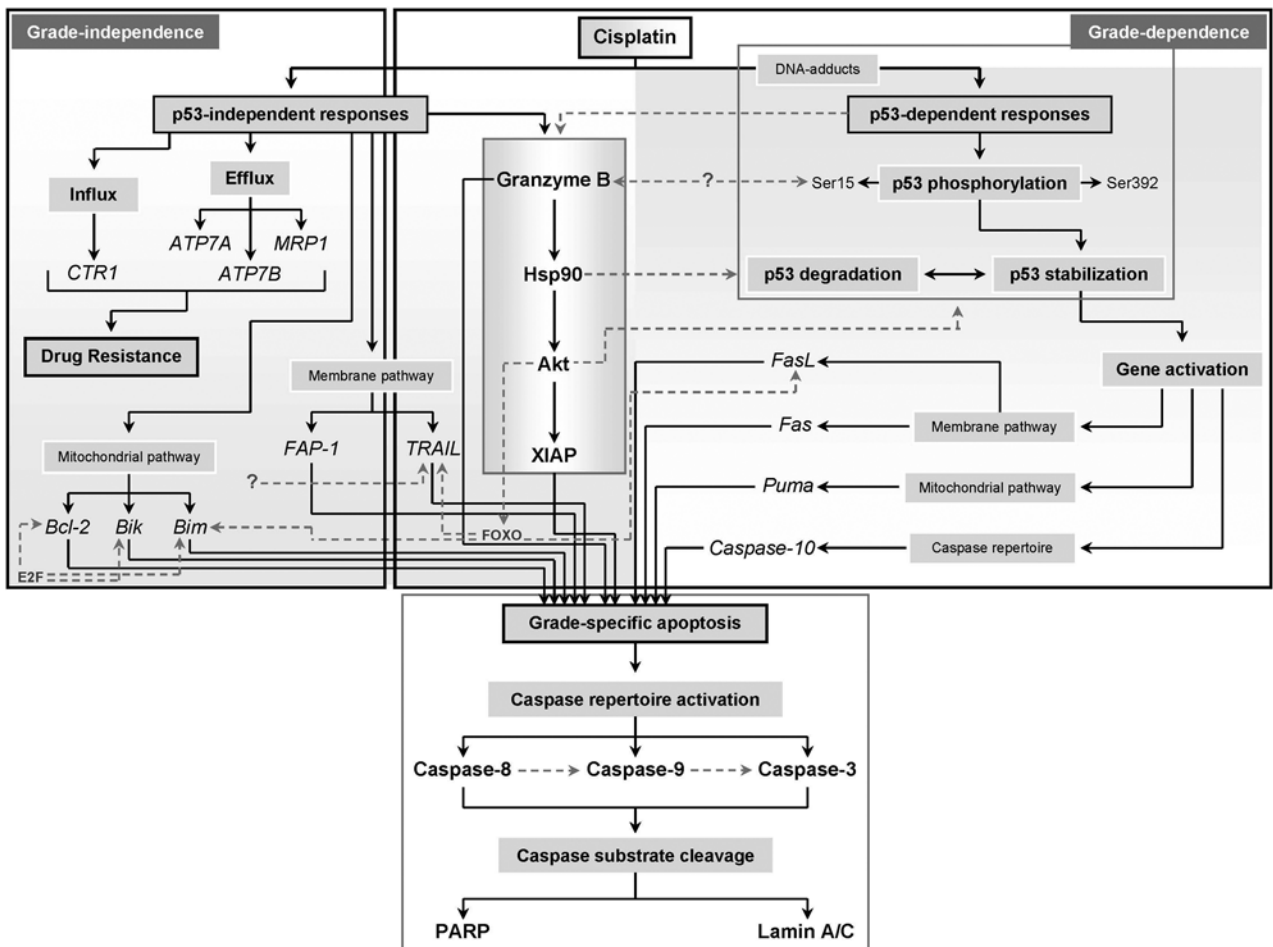


Figure 9. Schematic representation of an integrated molecular interaction map concisely depicting the herein examined regulators critically implicated in cisplatin-mediated apoptosis of RT4 and T24 human bladder cancer cells. Exposure to cisplatin results in the activation or repression of distinct p53-dependent and p53-independent mechanisms tightly related to induction of apoptosis and drug resistance. Proteins are denoted by bold-type fonts, whereas genes are represented by non-bold- and italic-type letters.

cisplatin administration. In contrast, the expression levels of *CTR1 (SLC31A1)* gene, whose cognate protein regulates the import of cisplatin into a cell (7,8,42,44,46), remained unaffected after drug exposure of both RT4 and T24 cells (Fig. 8). Therefore, cisplatin-induced toxicity in bladder cancer cells could be critically associated with p53-independent attenuation of certain drug efflux systems, eventually resulting in increased intracellular concentration of cisplatin.

## Discussion

A major holdback to successful cancer chemotherapy is the, frequently observed, development of acquired resistance to drug exposure, which, thereby, renders tumor cell populations refractory to the applied regimens, eventually resulting to relapse of the disease. Cellular resistance to cisplatin cytotoxic activity seems to be a multifactorial process, mainly implemented through two broad types of mechanisms: a) prevention of the adequate amounts of drug from reaching and binding to the target DNA molecule, due to decreased cisplatin uptake, increased cisplatin efflux, upregulated detoxification and augmented DNA repair, and b) failure of cell death and increased survival, despite the drug-induced DNA damage, through severe deregulation of the apoptosis-related signaling pathways (6-11,26,47,48).

Apoptosis is the prevailing response of cells to chemotherapeutic agents. Two major apoptotic pathways have been described for mammalian cells. The first one involves Caspase-8, which is activated through membrane death receptor-mediated extrinsic pathways, whereas the second one implicates mitochondria-emanated intrinsic pathways, being mainly characterized by activation of Caspase-9 via Cytochrome c release into the cytosol and apoptosome formation (an Apaf-1- and ATP-dependent process). Subsequently, activated Caspase-3, as the major effector component of both pathways, initiates a program of proteolytic cleavages of critical cellular proteins, including PARP and Lamin A/C, eventually resulting to apoptosis (6,26,33,47,49).

Indeed, here, we showed that exposure of human bladder cancer cells to cisplatin resulted in the generation of cleaved Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, PARP and Lamin A/C proteins, thus undoubtedly demonstrating the activation of apoptosis (Fig. 2). Both the membrane death receptor- and mitochondria-dependent pathways seemed to be engaged in the RT4 and T24 cell types, albeit in a grade-specific manner. Interestingly, through the comparison of their respective C/P ratios, T24 proved to be significantly more resistant to cisplatin administration than RT4 cells, strongly corroborating their MTT assay-based differential cytotoxic responses (Fig. 1). Moreover, in contrast to the activation of Caspase-8 even in the lower drug dose of RT4-treated cells, which unambiguously confirms their increased sensitivity to the drug, T24 were not only unable for a respective response, but they were also missing the 18 kDa small fragment, likely implying an inability to form the mature and fully active tetramer of Caspase-8, and an attenuation of the Caspase-8-mediated downstream signaling pathways. In agreement with our results, proteolytic processing and activation of initiator and effector Caspases have been also reported before in Jurkat T leukemia cells, MCF-7 breast cancer cells and human

osteosarcoma (HOS) cells after cisplatin administration (6,49-51). Notably, cisplatin apoptotic activity in Jurkat T leukemia cells was shown to be independent of membrane death receptors, while mitochondria contribution was definitely required (49). However, depending on the cellular model system used, cisplatin-induced apoptosis could also involve certain Caspase-independent pathways, as it has been previously described for ovarian cancer cells and renal proximal tubular cells (RPTC) (6,52,53). *In toto*, we reveal that clinically relevant doses of cisplatin can induce apoptosis in bladder cancer cells through the activation of Caspase repertoire, whereas relative tolerance to the drug can arise from downregulation of membrane death receptor-emanated apoptotic pathways.

p53 is a fundamental tumor suppressor protein that plays a crucial role in a variety of biological processes including cell-cycle arrest and induction of apoptosis in response to cellular stress (6,54). Sensitivity to cisplatin has been tightly associated with the presence of wild-type p53 activity in a National Cancer Institute (NCI) collection of sixty human cancer cell lines (6,55). Furthermore, tumor cells lacking functional p53 were more resistant to cisplatin than cells containing wild-type p53, but could be sensitized upon reconstitution with the proficient p53 protein (6,56-58). Nevertheless, in certain cellular systems no or even negative correlation between response to cisplatin and p53 status has been previously observed. For example, in SaOS-2 osteosarcoma cells p53 activity was adequately tied in with increased resistance to cisplatin under low serum conditions, whereas the absence of p53 in testicular teratocarcinoma cells did not alter cellular sensitivity to the drug (6,59,60).

We, herein, reveal that the grade-specific cytotoxic and apoptotic responses of RT4 and T24 human bladder cancer cells to cisplatin are tightly associated with the drug-induced functional activities of p53 protein (Fig. 3). It seems that the missing critical tyrosine 126 (Y<sup>126</sup>) dramatically affects the molecular physiology of the p53 mutant protein, thus prohibiting its competence to be phosphorylated at Ser15 and Ser392 target residues upon cisplatin exposure of T24 cells. Interestingly, certain p53 natural mutants from human tumors, harboring changes elsewhere from the decisive serine positions, such as [Ile<sup>237</sup>]p53 and [Ala<sup>143</sup>]p53, exhibit altered Ser15 and Ser392 phosphorylation profiles (61). In RT4 cells, the cisplatin-induced phosphorylation at Ser15 results in the structural stabilization and intracellular accumulation of p53 protein, by likely disrupting its interaction with the MDM2 negative regulator, which otherwise targets p53 for ubiquitin-mediated degradation. This stress signal-dependent increase in p53 half-life time from minutes to hours promotes distinct transcriptional programs tightly regulating apoptosis (13,20,27,34,62,63). Alternatively, Ser15 phosphorylation could be implicated in promoting p53 interaction with B56 $\gamma$ -PP2A phosphatase, thereby leading to Thr55 dephosphorylation and subsequent induction of p53 protein stabilization, as recently described (64). On the other hand, the cisplatin-mediated phosphorylation of the wild-type p53 at Ser392, exclusively observed in RT4 cells, should strongly potentiate its DNA binding activity through a putative stabilization mechanism of the p53 tetramer form (13,65). Since *MDM2* constitutes a *bona fide* p53 target gene (13,20,34), the

progressive accumulation of functional p53 upon cisplatin exposure could result in overproduction of MDM2 protein that acts as a ubiquitin ligase to effectively degrade p53 through proteasome targeting (20,27,63), thus likely explaining the cleaved p53 forms detected in the higher drug dose (Fig. 3).

Although it remains to be determined, in RT4 cells, one (or more) of the ATM, ATR and DNA-PK kinases could be likely implicated in the cisplatin-induced phosphorylation of p53 at Ser15, whereas Ser392 phosphorylation might be implemented by one (or more) of the p38 MAPK, CDK9 and CK2 kinases (65-67). Accordingly, a role of ATR/Chk2 signaling in p53 activation and subsequent apoptosis has been recently demonstrated in cisplatin-treated renal cells, thereby further illuminating the drug-induced nephrotoxicity mechanisms (15). ATR contains a putative Akt phosphorylation site (RRRLSS), and as such its function could be strongly regulated by the activated Akt kinase (18). Indeed, in ovarian cancer cells, inhibition of functional Akt potentiated total and phosphorylated p53 contents upon cisplatin exposure, whereas its activation suppressed drug-mediated phosphorylation of p53 (18). Thus, an (indirect) inhibitory role of the activated Akt kinase in p53 [especially when mutated (i.e., in T24 cells)] phosphorylation status could be likely envisioned for bladder cancer cells undergoing cisplatin treatment. In the same study, it was also shown that cisplatin induced phosphorylation of numerous p53 residues in chemosensitive ovarian cancer cells, but not in their respective chemoresistant variants, thereby suggesting that altered p53 phosphorylation profiles may significantly contribute to the acquisition of drug resistance during therapy. Moreover, the p53 phosphorylation status at Ser15 after cisplatin administration has been severely compromised in a chemorefractory clone of the A2780 ovarian cancer cell line (13), whereas ionizing radiation, applied as another typical DNA damaging factor, induces apoptosis in bladder cancer cell lines in p53-dependent manner (22). However, the relative chemosensitivity of RT4 cells to cisplatin could not solely be attributed to the marked phosphorylation of wild-type p53 at Ser15 and Ser392, but additional determinants are required for the implementation of cisplatin-mediated apoptosis in bladder cancer cells. This scenario is strongly supported: a) by the ability of T24 cells to undergo apoptosis, albeit relatively extenuated, after drug treatment, despite the absence of overproduced and functional p53 protein, and, *vice versa*, b) by the inability of phosphorylated p53 to promote robust apoptosis of RT4 cells under lower cisplatin concentration, as compared to the higher drug dose respective response. Nevertheless, when total and phosphorylated p53 protein together with its respective cleaved forms seem to exceed critical thresholds of intracellular concentrations (i.e., in the higher dose of cisplatin) a reinforced apoptotic process could likely occur (Fig. 3).

Several observations indicate that Akt can protect cells from apoptotic death induced by various stress stimuli, including cisplatin (6,47). Inactivation of Akt by ectopic expression of its negative regulator PTEN in tumor cells enhances drug-induced apoptosis, whereas transfection of constitutively active Akt in lung cancer cells reduces topotecan-mediated apoptosis (47,68). Moreover, fibroblasts overexpressing Akt become chemorefractory to staurosporine and etoposide

apoptotic activities (47,69,70). During tumor development, Akt can be activated by a number of mechanisms, including downregulation of PTEN (a dual-specificity phosphatase), overactivation of the PI3K (PI-3 kinase) upstream (positive) signaling mediator, *Akt* gene amplification and acquisition of somatic mutations in Akt critical residues, such as the glutamic acid to lysine substitution at amino acid position 17 (E17K) that promotes cellular transformation and induces leukemia in mice (47,71). Therefore, the constitutively phosphorylated at Ser473, and presumably active, Akt form could be essentially implicated in the highly malignant behavior of T24 cells and in their partial resistance to cisplatin apoptotic activity. In contrast, the absence of a functional Akt in RT4 cells must be tightly associated with their low grade of tumorigenic potency and enhanced sensitivity to the drug (Fig. 4). Interestingly, it has been previously reported that the Akt phosphorylation content is strongly correlated with the invasiveness of urothelial cell lines (72). In contrast to RT4, the highly invasive T24 cell line harbors a missense point mutation at codon 48 (substitution of Ile for Asn) in the, critical for enzymatic activity,  $\alpha 2$  helix of the PTEN dual-specificity phosphatase (73). Thus, the putative reduction of Akt dephosphorylation due to PTEN functional impairment (73), along with the increased PI3K catalytic activity levels, as elsewhere assessed by the specific inhibitor LY294002 (72), could both reliably account for the strong and constitutive expression of the phosphorylated at Ser473, and consequently activated, Akt apoptotic regulator, exclusively in T24 cells (Fig. 4).

Even though the RT4 cells do not express any phosphorylated at Ser473 Akt form, the generation of Akt and XIAP cleaved fragments could critically contribute to the higher drug dose-induced apoptosis. In ovarian cancer cells, XIAP can be phosphorylated at Ser87 by Akt, being, thereby, stabilized through inhibition of both its (XIAP) auto-ubiquitination and cisplatin-mediated ubiquitination activities (6,16). It seems that XIAP degradation is an important mechanism to regulate its intracellular steady-state functional levels and determine sensitivity to cisplatin exposure. The anti-apoptotic activity of XIAP is exerted through direct inhibition of Caspase-3 and Caspase-7, and modulation of the Bax/Cytochrome c pathway by blocking Caspase-9 (12,74). In ovarian cancer cells, XIAP overexpression is associated with reduced cisplatin-stimulated Caspase-3 activity and apoptosis, while downregulation of XIAP is considered as an effective mean to overcome chemoresistance in the same cells that express either endogenous or reconstituted wild-type p53 protein (6,14,16,74,75). It seems that RT4 and T24 cell lines engage distinct mechanisms to regulate XIAP in response to cisplatin. Under the higher drug dose conditions, RT4 are characterized by cleaved XIAP forms (cleavage pattern), whereas in T24 a significant reduction of the unprocessed protein is observed (complete degradation pattern) (Fig. 4). Since a relatively similar grade-specific pattern can be recognized for Akt as well, a putative mechanism of an Akt-dependent phosphorylation of XIAP that is able to prevent cisplatin-induced XIAP cleavage could be rationally adopted for bladder cancer cells (6,16). However, the constitutively active Akt form in T24 cells does not seem to protect XIAP from complete degradation that is mainly defined by

the absence of cleaved fragments, but drug dose-dependent reduction of the unprocessed protein expression levels. Thus, XIAP might play a master regulatory role in cisplatin-induced apoptosis of T24 cells. When XIAP intracellular protein levels drop off a certain threshold, the Caspase repertoire can not be any more efficiently inhibited and apoptosis is immediately activated (74,75). On the other hand, the cleaved XIAP forms detected in drug-treated RT4 cells could not only abolish XIAP anti-apoptotic potential, but could also function as negative (or positive) regulators of several critical components suppressing (or promoting) cell death, including Akt. The RT4-specific XIAP cleaved pattern could be produced by either a ubiquitin-mediated process, likely associated with the higher molecular weight band exclusively detected in 10  $\mu\text{g/ml}$  cisplatin (Fig. 4; one asterisk), or a Caspase-3-dependent mechanism, as previously demonstrated during Fas-stimulated apoptosis (76). Interestingly, it was previously shown that active Caspase-3 was able to cleave Akt *in vitro* and this effect could be blocked by the cognate Caspase inhibitor (75). According to this model, the Akt cleaved forms could function in a dominant negative manner, thus inhibiting the endogenous Akt activity and consequently implying a role of the non-phosphorylated Akt in suppressing apoptosis of RT4 cells. Alternatively, these small forms might illegitimately interact with distinct apoptotic regulators, such as XIAP protein, through a 'squelching' process, sequentially excluding them from the molecular anti-apoptotic network and eventually rendering them susceptible to functional inhibition or degradation. In contrast, the phosphorylation of Akt at Ser473 seems to provide protection against cisplatin-mediated cleavage of both Akt and its target substrate XIAP (6,14,16), therefore offering T24 cells the advantage of relative chemoresistance.

Similarly to ovarian cancer cells (14), the wild-type p53 function in RT4 cells is absolutely required for the cisplatin-induced apoptotic effects of Akt and XIAP structural amputations. However, in drug-treated T24 cells XIAP downregulation could be partly counterbalanced by the non-functional p53 and constitutively active Akt, thereby conferring certain levels of resistance to cisplatin apoptotic activity. Interestingly, in ovarian cancer cells, Akt was able to attenuate the cisplatin-induced mitochondrial p53 accumulation and p53-dependent release of Smac apoptotic protein [a known counteractor of IAPs, including XIAP (26)] into the cytosol, strongly desensitizing cells from drug cytotoxic action (17). Hence, the functional p53 status should be considered as a major determinant of the Akt- and XIAP-mediated chemoresistance frequently acquired during bladder cancer therapy.

Beyond its genotoxic activity, cisplatin critically modulates Hsp90 function through direct binding to two distinct sites of the molecule. Cisplatin seems to induce a conformational change in the Hsp90 amino-terminal domain (Hsp90N), while it can also block the aggregation prevention activity of the Hsp90 carboxyl-terminal domain (Hsp90C) (28,29,77). Given the potent chaperoning role of Hsp90 in conformational maturation and stability of several client proteins related to apoptosis (28,29), the approximately 65 kDa cleaved form of Hsp90 might be essentially implicated in the cisplatin-mediated structural amputations of p53, Akt and XIAP proteins, speci-

fically observed in the RT4 drug-treated cells (Fig. 5). A plausible scenario could engage the putative dominant negative function of the ~65 kDa fragment to inhibit the structural integrity guarding activity of the Hsp90 unprocessed protein, thereby rendering distinct clients vulnerable to proteolytic cleavage and degradation. Interestingly, an oxidative stress-mediated cleavage of Hsp90 has been recently shown to occur in K562 cells, severely disrupting Hsp90 chaperoning activity, strongly promoting Akt and Bcr-Abl (representative clients) degradation, and finally inducing apoptosis (78). Since Hsp90 can be proteolytically processed by certain apoptosis-stimulating agents, including cisplatin (present study), oxidative stress factors, arsenic-based compounds and doxorubicin (78-80), it must be considered as a central mediator of cytotoxic responses to various cellular insults. Based on the epitope recognizing specificity of the monoclonal antibody used here, which selectively binds to the Hsp90 carboxyl-terminal region, the site of the cleavage should be located close to the amino-terminal part of Hsp90. A very similar Hsp90 proteolytic profile has been also observed in K562 cells during oxidative stress and in RT4 cells after doxorubicin administration (78,80).

Using the GraBCas algorithm, we were able to previously identify a putative Granzyme B (a serine protease) recognition and cleavage site in the amino acid sequence of both Hsp90 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) proteins, whereas no high probability binding motif for any Caspase family member could be recognized (80). In accordance, exposure of either K562 cells or recombinant Hsp90 protein to human Granzyme B resulted in the generation of Hsp90 cleaved fragments (30,78), thereby indicating that Hsp90 comprises a *bona fide* substrate of Granzyme B *in vitro*. In RT4 cells, the drug-induced protein levels of Granzyme B seem to follow the same expression profile of the ~65 kDa truncated form, thus strongly supporting the crucial role of Granzyme B in proteolysis and downregulation of Hsp90 during cisplatin-mediated bladder cancer cell apoptosis (Fig. 5). Intriguingly, delivery of Granzyme B to melanoma cells (T1) resulted in the activation of ATM and p38 MAPK stress kinases and subsequent phosphorylation of p53 at Ser15 and Ser37 residues, providing insight into the functional relationship between Granzyme B and p53 during cellular disintegration (81). Therefore, the grade-dependent expression profile of Granzyme B in response to cisplatin administration might be functionally associated with the p53 genetic status of RT4 and T24 cells. As such, when Granzyme B is over-expressed in RT4 cells, it could significantly contribute to p53 protein accumulation and phosphorylation, while its downregulation in T24 cells might hamper p53 (particularly when mutated) responses to cisplatin (Figs. 3 and 5). Furthermore, it seems that the cisplatin-mediated decrease of Granzyme B in T24 cells allows the protection of Hsp90 from proteolytic cleavage, thereby retaining the structural integrity of certain anti-apoptotic clients (i.e., Akt) under cisplatin exposure conditions, and eventually providing some degree of cellular resistance against them. Whether *Granzyme B* represents a *bona fide* target gene of the activated p53 protein is an interesting speculation that needs to be further explored (34).

Part of the DNA damage response can be coordinated, besides p53, by additional pathways of apoptosis guided

by the E2F1 transcription factor (82,83). After cisplatin exposure, E2F1 protein can be stabilized in the drug-treated cells by distinct mechanisms, including ATM-mediated serine phosphorylation, increased CDK2 kinase activity and, likely, P/CAF-induced lysine acetylation (83-86). Interestingly, the accumulation of E2F1 protein in mouse embryo fibroblasts (MEFs) following cisplatin treatment seems to occur independently of their *p53* genetic status (84,86). E2F1 activation results in the transcriptional upregulation of critical pro-apoptotic genes, such as *Bik* and *Bim*, and the transcriptional repression of distinct anti-apoptotic family members, including *Bcl-2* (82,83,87-91). According to this, and since the exposed to the higher dose of cisplatin RT4 and T24 cells were both characterized by a *Bik* and *Bim* strong transactivation response, paralleled with a severe downregulation of *Bcl-2* gene (Fig. 6), E2F1 might be critically involved in the cisplatin-mediated apoptosis of bladder cancer cells and, likely, in a *p53*-independent manner. It seems that both grade I (RT4) and grade III (T24) cell types could undergo cisplatin-induced apoptosis through an E2F1-mediated functional perturbation of the intracellular balance between certain pro-apoptotic (i.e., *Bik* and *Bim*) and anti-apoptotic (i.e., *Bcl-2*) components (83). As a consequence, mitochondrial permeability should be increased, allowing the leakage of, among others, the pro-apoptotic molecule Cytochrome *c* into the cytosol, where it could induce the apoptosome formation, maturation of Caspase repertoire and eventually activation of apoptosis (12,26,31,47). Thereby, for cisplatin to operate as an apoptotic inducer in bladder cancer cells, the intrinsic mitochondrial pathway seems to be absolutely required and, moreover, its functional potency must be partly regulated in a *p53*-independent manner. Interestingly, *Bcl-2* was found to be frequently overexpressed in a variety of human cancers (12,47,80), while the acquisition of resistance to cisplatin in a T24-derived subclone (T24R2) was previously associated with a strong upregulation of *Bcl-2* protein levels (92). Moreover, in human lung cancer H460 cells exposed to cisplatin, *Bcl-2* protein was shown to be downregulated through a dephosphorylation and ubiquitination process, targeting its degradation by proteasome (27,93).

Contrary to E2F1, the *p53*-dependent transactivation patterns can be functionally coupled to the differential sensitivity of RT4 and T24 cells to cisplatin exposure. Distinct *p53* target genes, such as *Fas*, *FasL*, *Puma* and *Caspase-10*, (15,34-37,94) were transcriptionally upregulated after drug treatment in the *p53*-proficient RT4 cells, but not in the *p53*-deficient T24 cells (Fig. 7), whereas both *Bax* and *Noxa* (other *p53* targets) gene activities in response to the drug remained unaffected (data not shown), thereby allowing the association of T24 relative resistance to cisplatin toxicity with certain *p53* target gene product cellular activities. It seems that the presence of a functional wild-type *p53* is tightly linked to the efficient induction of the Fas/FasL-mediated apoptosis in bladder cancer cells after cisplatin administration. Indeed, Fas and FasL cell surface expression can be strongly upregulated after exposure of several cancer cell lines carrying wild-type *p53* to cisplatin (33,95), whereas mutant *p53* can function as a potent repressor of *Fas* gene activity (95,96), thus providing *p53*-deficient or *p53*-null cells with the advantage of chemoresistance. As previously suggested,

the chemosensitivity of solid tumor cells depends on intact apoptotic pathways, involving engagement of the Fas/FasL system and processing of the cognate Caspases (6,97). Thereafter, the relative resistance of T24 cells to cisplatin activity could evolve through a *p53*-dependent functional attenuation of the Fas/FasL signaling pathway, a scenario that is strongly supported by the absence of a mature and fully active Caspase-8 (since having missed the small cleaved fragment) in T24 cells treated with the higher drug dose (Fig. 2). Interestingly, loss of the Caspase-8 activation pathway has been previously implicated in resistance to cisplatin-mediated apoptosis of HEp-2 cells (human laryngeal cancer) (98). The diminished role of Fas/FasL system in cisplatin-induced apoptosis has been also suggested before for T24 (92) and Jurkat T (49) cell lines, while null for *FADD* or *Caspase-8* embryonic fibroblasts demonstrated only a partial role of the membrane death receptor pathway in response to chemotherapeutic agents (47).

Furthermore, the absence of *TRAIL* gene expression and the relative unresponsiveness of *Caspase-10* gene (albeit weakly debilitated) to cisplatin exposure (Fig. 7) indicate that, together with Fas/FasL, the other membrane death receptor system of TRAIL/DR4/DR5/Caspase-8/Caspase-10 should be also functionally attenuated, thus significantly contributing to the T24-specific partial resistance to cisplatin apoptotic activity. Accordingly, T24 cells, when compared to RT4, can exhibit significant levels of resistance to TRAIL-induced apoptosis, and, interestingly, in an Akt-dependent manner (99). Even though both *DR4* and *DR5* genes [whose cognate proteins operate as TRAIL membrane receptors (12)] follow prominent *p53*-dependent expression profiles upon cisplatin exposure (data not shown), the grade-specific repression of *TRAIL* gene activity (Fig. 7) ensures the complete hindrance of TRAIL/DR4/DR5 functional engagement in drug-induced apoptosis of T24 cells. *TRAIL* gene silencing in T24 cells could be mediated through distinct mechanisms, including grade-dependent transcriptional suppression, DNA methylation and histone deacetylation. Indeed, *TRAIL* is classified among the typical FOXO family member target genes (39), whose transcriptional activities are negatively regulated by, among others, an Akt-mediated phosphorylation mechanism (100-102). Therefore, the constitutively active Akt form, exclusively observed in T24 cells (Fig. 4), could specifically phosphorylate distinct FOXO transcription factors, rendering them inactive to down-stream upregulate their target gene *TRAIL*. Nevertheless, *TRAIL* gene activity can be restored in certain cellular cancer model systems by either 5-Aza-2'-deoxycytidine or HDAC (histone deacetylase) inhibitors, clearly demonstrating the critical role of DNA demethylation and/or histone acetylation, respectively, in apoptotic gene regulation (12,103,104). Our findings likely open a new therapeutic avenue to introducing highly efficient apoptosis in *p53*-mutated malignant cancers, such as bladder cancer, by targeted overexpression and constitutive activation of the Fas, FasL and TRAIL apoptotic regulators, only in the tumor area (37).

The *p53*-dependent expression profile of *Puma* gene (Fig. 7) strongly supports the implication of its cognate protein product in the acquisition process of RT4 and T24 differential resistance to cisplatin activity. *Puma*, a *bona fide*



p53 target gene (34,35), has been previously associated with cisplatin-mediated nephrotoxicity and renal tubular cell apoptosis through an activated p53-specific mechanism (15, 36). Thereby, in contrast to T24, the putative upregulation and mitochondrial accumulation of Puma, BH3-only, protein in cisplatin-treated RT4 cells could result in a severe neutralization of the Bcl-2 family-based anti-apoptotic functions and a Bax-mediated release of Cytochrome c into the cytosol, followed by Caspase maturation and activation of apoptosis, as previously demonstrated for other cellular systems (15,26,31). Conclusively, a Puma-induced oversensitization of the intrinsic mitochondrial pathway might also critically contribute to the reduced resistance of RT4 cells to cisplatin toxicity.

The group of genes presenting a p53-independent down-regulation of the respective transcriptional activities in response to cisplatin contains, besides *Bcl-2*, the *FAP-1*, *ATP7A*, *ATP7B* and *MRP1* distinct members. *FAP-1* expression levels were significantly attenuated in both RT4 and T24 cell lines upon exposure to the higher drug dose (Fig. 6), presumably implying a potential role of FAP-1 protein in cisplatin-induced bladder cancer cell apoptosis. However, this could more likely apply to RT4 and not to T24 cells, since their differential Fas/FasL activation dynamics critically determines the functional importance of the cognate downstream mediators in apoptotic signaling. FAP-1 overexpression has been reported to inhibit Fas-mediated apoptosis in certain human malignant cells, by acting as a negative switch in the Fas/FasL pathway, thereby providing them with a marked survival advantage (32,33). Moreover, silencing of *FAP-1* gene expression or inhibition of FAP-1 protein tyrosine phosphatase (PTP) activity could abolish tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis in a head and neck cancer model system (SCCHN cells) (105). In contrast, FADD protein, another critical component that positively regulates the Fas/FasL apoptotic potency (intermediates between the activated Fas and immature Caspase-8) (12,26,33), might not essentially contribute to cisplatin-induced apoptosis of RT4 and T24 cells, since the corresponding *FADD* gene activities in response to the drug remained unaffected in both cell types examined (data not shown).

The *ATP7A*, *ATP7B* and *CTR1* gene products serve as direct links between the management of copper homeostasis and effective concentration of cisplatin in a cell (6-8). *CTR1*, the major copper influx transporter, has been convincingly demonstrated to carry cisplatin and its analogues inside the cell, whereas the *ATP7A* and *ATP7B* copper efflux ATPase pumps critically regulate cisplatin export (6-8,42-44). Thus, it is the uptake-efflux relative kinetics that controls intracellular accumulation of cisplatin and, therefore, its cytotoxic action. Loss of *CTR1* function results in reduced amount of cisplatin entering cells and, consequently, acquisition of drug resistance (6-8,42,44,106-108). However, *CTR1* overexpression could not significantly alter the sensitivity of ovarian carcinoma cells to cisplatin, in spite of the increase in drug accumulation levels (6,42,109). On the other hand, enhanced expression of *ATP7A* and *ATP7B* efflux proteins has been positively associated with the degree of cisplatin resistance in tumor cell lines and clinical specimens (6-8,42,44,110,111). *ATP7A* and *ATP7B* seem to display distinct and quite different functional properties. Although *ATP7B* upregulation is linked

to a reduced capacity of cells to accumulate cisplatin by virtue of a higher efflux rate, *ATP7A* overexpression in ovarian carcinoma cells renders them resistant to cisplatin due to increased sequestration of the drug into the vesicular fraction, thus keeping it away from the target sites of its cytotoxic action (7,8,42,111-113).

Treatment of RT4 and T24 cells with the higher dose of cisplatin resulted in a notable reduction of both *ATP7A* and *ATP7B* expression levels, whereas *CTR1* gene activity remained unaffected in the two cell lines examined (Fig. 8). Thus, it seems that bladder cancer cell sensitivity to cisplatin can be also derived by critically modulating efflux, but not import, rates of the drug. However, the p53-independent transcriptional attenuation of the *ATP7A* and *ATP7B* genes is not able to account for the differential resistance of RT4 and T24 cells to cisplatin, thus likely incriminating other levels of regulation, such as a malignancy grade-specific localization of the *ATP7A* and *ATP7B* transport proteins in distinct sub-cellular compartments, as it has been recently reported for ovarian carcinoma cells (114).

In addition to the copper transporters, certain multidrug resistant protein (MRP) family members are thought to operate as ATP-dependent exporter pumps for a variety of drugs, including cisplatin (7,8,45). Although *MRP1* has been previously demonstrated to confer resistance to anthracyclines, but not cisplatin (44,45,115), the p53-independent down-regulation of its respective gene activities in RT4 and T24 cells upon drug exposure strongly suggests a role in bladder cancer cell sensitivity to cisplatin (Fig. 8). In contrast, the expression profile of *MRP2* (*ABCC2/cMOAT*) gene, whose upregulated function is frequently implicated in the development of resistance to cisplatin (6,7,44,45,115), did not seem to be affected by the drug administration in either cell type (data not shown), thus likely dissociating its engagement from cisplatin-mediated toxicity and apoptotic death of human bladder cancer cells.

Our study has tried to unveil the complexity of functional interactions that critically regulate the sensitivity and differential resistance of the human bladder cancer cells RT4 and T24 to the cytotoxic activity of cisplatin, one of the most potent chemotherapeutic agents in clinical practice (Fig. 9). We clearly show that both cell types undergo cisplatin-induced apoptosis through a Caspase-dependent manner. The grade-specific sensitivity to the drug is associated with the differential phosphorylation and activation status of p53 and Akt apoptosis regulators, together with the distinct structural integrity of XIAP and Hsp90 signaling components. Moreover, cisplatin promotes a re-deployment of the transcriptional profiles of several genes that are involved either in apoptosis or in cellular accumulation of the drug. One group could be regulated in an E2F1-dependent manner, while the p53 transcription factor is likely responsible for the transcriptional responses of other examined genes to cisplatin exposure. The detrimental effects of cisplatin must be also linked to an increased accumulation of the drug inside bladder cancer cells, likely due to a severe attenuation of the cisplatin efflux system(s). Interestingly, the majority of the genes of the present study, such as *Bik*, *Bim*, *Bcl-2*, *FAP-1*, *Fas*, *FasL*, *TRAIL* (only for grade I tumors), *Puma*, *Caspase-10*, *ATP7A*, *ATP7B* and *MRP1*, could be used as

*in vivo* biomarkers in order to develop a molecular platform that could reliably monitor the responses of human bladder cancer cell populations to cisplatin therapeutic actions, thereby providing clinical protocols with novel and powerful genetic tools for a more efficient and successful management of human urothelial malignancies.

### Acknowledgements

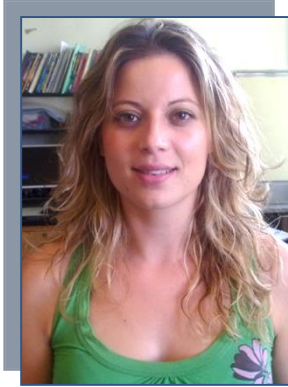
E.G. Konstantakou is a scholarship recipient of the Hellenic State Scholarships Foundation (IKY) (Ph.D. fellowship). P.K. Karkoulis is financially supported by a fellowship awarded from the Institute of Biology, NCSR 'Demokritos', Athens, Greece (Ph.D. fellowship) (Ministry of Development). D.J. Stravopodis would like to devote the present article to the memory of his cousins Dena and Leo Lauren.

### References

- Zieger K: High throughput molecular diagnostics in bladder cancer - on the brink of clinical utility. *Mol Oncol* 1: 384-394, 2008.
- Clark PE: Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 19: 241-247, 2007.
- Cote RJ and Datar RH: Therapeutic approaches to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 46 (Suppl.): S67-S83, 2003.
- Chester JD, Hall GD, Forster M and Protheroe AS: Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer - current controversies and future directions. *Cancer Treat Rev* 30: 343-358, 2004.
- Perabo FG and Muller SC: New agents for treatment of advanced transitional cell carcinoma. *Ann Oncol* 18: 835-843, 2007.
- Wang D and Lippard SJ: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4: 307-320, 2005.
- Rabik CA and Dolan ME: Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33: 9-23, 2007.
- Kelland L: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 573-584, 2007.
- Ho YP, Au-Yeung SC and To KK: Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* 23: 633-655, 2003.
- Zorbas H and Keppler BK: Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem* 6: 1157-1166, 2005.
- Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265-7279, 2003.
- Meng XW, Lee SH and Kaufmann SH: Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Curr Opin Cell Biol* 18: 668-676, 2006.
- Mujoo K, Watanabe M, Nakamura J, Khokhar AR and Siddik ZH: Status of p53 phosphorylation and function in sensitive and resistant human cancer models exposed to platinum-based DNA damaging agents. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 709-718, 2003.
- Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ and Tsang BK: p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63: 7081-7088, 2003.
- Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R and Dong Z: ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 283: 6572-6583, 2008.
- Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK and Cheng JQ: Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279: 5405-5412, 2004.
- Yang X, Fraser M, Moll UM, Basak A and Tsang BK: Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer Res* 66: 3126-3136, 2006.
- Fraser M, Bai T and Tsang BK: Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function. *Int J Cancer* 122: 534-546, 2008.
- Yang X, Fraser M, Abedini MR, Bai T and Tsang BK: Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt. *Br J Cancer* 98: 803-808, 2008.
- Mitra AP, Birkhahn M and Cote RJ: p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World J Urol* 25: 563-571, 2007.
- Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D, Schwartz S, Morrison LJ, Lippa M, Hatzivassiliou G and Tan J: p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res* 6: 569-579, 1994.
- Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S and Gotoh A: Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type-p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells. *Urol Res* 31: 387-396, 2003.
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
- Wang D, Stravopodis D, Teglund S, Kitazawa J and Ihle JN: Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol Cell Biol* 16: 6141-6148, 1996.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Fadeel B, Ottosson A and Pervaiz S: Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ* 15: 443-452, 2008.
- Smith L, Lind MJ, Drew PJ and Cawkwell L: The putative roles of the ubiquitin/proteasome pathway in resistance to anticancer therapy. *Eur J Cancer* 43: 2330-2338, 2007.
- Stravopodis DJ, Margaritis LH and Voutsinas GE: Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. *Curr Med Chem* 14: 3122-3138, 2007.
- Whitesell L and Lindquist SL: HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 761-772, 2005.
- Hostetter DR, Loeb CR, Chu F and Craik CS: Hip is a pro-survival substrate of granzyme B. *J Biol Chem* 282: 27865-27874, 2007.
- Willis SN and Adams JM: Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17: 617-625, 2005.
- Abaan OD and Toretsky JA: PTPL1: a large phosphatase with a split personality. *Cancer Metastasis Rev* 27: 205-214, 2008.
- Timmer T, De Vries EG and De Jong S: Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 196: 125-134, 2002.
- Riley T, Sontag E, Chen P and Levine A: Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 402-412, 2008.
- Nakano K and Vousden KH: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7: 683-694, 2001.
- Tsuruya K, Yotsueda H, Ikeda H, Taniguchi M, Masutani K, Hayashida H, Hirakata H and Iida M: Involvement of p53-transactivated Puma in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Life Sci* 83: 550-556, 2008.
- Okazaki T and Sakamuro D: Induction of Fas (CD95/APO-1) ligand is essential for p53-dependent apoptosis in an *in vitro* renal carcinoma model system. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 581-588, 2007.
- Gong B and Almasan A: Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 747-752, 2000.
- Modur V, Nagarajan R, Evers BM and Milbrandt J: FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* 277: 47928-47937, 2002.
- Borst P, Jonkers J and Rottenberg S: What makes tumors multi-drug resistant? *Cell Cycle* 6: 2782-2787, 2007.
- Itamochi H, Kigawa J and Terakawa N: Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* 99: 653-658, 2008.
- Safaei R: Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* 234: 34-39, 2006.
- Lutsenko S, Gupta A, Burkhead JL and Zuzel V: Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys* 476: 22-32, 2008.
- Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N and Ishikawa T: The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26: 71-83, 2007.
- Coley HM: Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 34: 378-390, 2008.

46. Borst P, Rottenberg S and Jonkers J: How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell Cycle* 7: 1353-1359, 2008.
47. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL and Kohn KW: Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23: 2934-2949, 2004.
48. Stordal B and Davey M: Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life* 59: 696-699, 2007.
49. Wang P, Song JH, Song DK, Zhang J and Hao C: Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal* 18: 1528-1535, 2006.
50. Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Janicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R and Marti A: Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 60: 4386-4390, 2000.
51. Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N and Tasaka K: Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 45: 199-206, 2000.
52. Henkels KM and Turchi JJ: Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 3077-3083, 1999.
53. Cummings BS and Schnellmann RG: Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 8-17, 2002.
54. Oren M: Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10: 431-442, 2003.
55. Vekris A, Meynard D, Haaz MC, Bayssas M, Bonnet J and Robert J: Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of in silico research. *Cancer Res* 64: 356-362, 2004.
56. Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC and Zunino F: Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 56: 556-562, 1996.
57. Kanamori Y, Kigawa J, Minagawa Y, Irie T, Oishi T, Shimada M, Takahashi M, Nakamura T, Sato K and Terakawa N: A newly developed adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene increases sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) in p53-deleted ovarian cancer cells. *Eur J Cancer* 34: 1802-1806, 1998.
58. Kigawa J, Sato S, Shimada M, Kanamori Y, Itamochi H and Terakawa N: Effect of p53 gene transfer and cisplatin in a peritonitis carcinomatosa model with p53-deficient ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 84: 210-215, 2002.
59. Fan J and Bertino JR: Modulation of cisplatin cytotoxicity by p53: effect of p53-mediated apoptosis and DNA repair. *Mol Pharmacol* 56: 966-972, 1999.
60. Zamble DB, Jacks T and Lippard SJ: p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6163-6168, 1998.
61. Ullrich SJ, Sakaguchi K, Lees-Miller SP, Fiscella M, Mercer WE, Anderson CW and Appella E: Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5954-5958, 1993.
62. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y and Prives C: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334, 1997.
63. Shangary S and Wang S: Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14: 5318-5324, 2008.
64. Shouse GP, Cai X and Liu X: Serine 15 phosphorylation of p53 directs its interaction with B56gamma and the tumor suppressor activity of B56gamma-specific protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 28: 448-456, 2008.
65. Matsumoto M, Furihata M and Ohtsuki Y: Posttranslational phosphorylation of mutant p53 protein in tumor development. *Med Mol Morphol* 39: 79-87, 2006.
66. Radhakrishnan SK and Gartel AL: CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. *Cell Cycle* 5: 519-521, 2006.
67. Oster B, Bundgaard B, Hupp TR and Hollsberg P: Human herpesvirus 6B induces phosphorylation of p53 in its regulatory domain by a CK2- and p38-independent pathway. *J Gen Virol* 89: 87-96, 2008.
68. Nakashio A, Fujita N, Rokudai S, Sato S and Tsuruo T: Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res* 60: 5303-5309, 2000.
69. Tang D, Okada H, Ruland J, Liu L, Stambolic V, Mak TW and Ingram AJ: Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J Biol Chem* 276: 30461-30466, 2001.
70. Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA and Farber JL: The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 277: 16547-16552, 2002.
71. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousset S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL and Thomas JE: A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448: 439-444, 2007.
72. Wu X, Obata T, Khan Q, Highshaw RA, De Vere White R and Sweeney C: The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* 93: 143-150, 2004.
73. Liu J, Babaian DC, Liebert M, Steck PA and Kagan J: Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens. *Mol Carcinog* 29: 143-150, 2000.
74. Cheng JQ, Jiang X, Fraser M, Li M, Dan HC, Sun M and Tsang BK: Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist Updat* 5: 131-146, 2002.
75. Asselin E, Mills GB and Tsang BK: XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 61: 1862-1868, 2001.
76. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS and Reed JC: Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18: 5242-5251, 1999.
77. Ishida R, Takaoka Y, Yamamoto S, Miyazaki T, Otaka M, Watanabe S, Komatsuda A, Wakui H, Sawada K, Kubota H and Itoh H: Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90. *FEBS Lett* 582: 3879-3883, 2008.
78. Beck R, Verrax J, Gonze T, Zappone M, Pedrosa RC, Taper H, Feron O and Calderon PB: Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death. *Biochem Pharmacol* 77: 375-383, 2009.
79. Shen SC, Yang LY, Lin HY, Wu CY, Su TH and Chen YC: Reactive oxygen species-dependent HSP90 protein cleavage participates in arsenical As(+3)- and MMA(+3)-induced apoptosis through inhibition of telomerase activity via JNK activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 229: 239-251, 2008.
80. Stravopodis DJ, Karkoulis PK, Konstantakou EG, Melachroinou S, Lampidonis AD, Anastasiou D, Kachrilas S, Messini-Nikolaki N, Papassideri IS, Aravantinos G, Margaritis LH and Voutsinas GE: Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines. *Int J Oncol* 34: 137-160, 2009.
81. Meslin F, Thierry J, Richon C, Jalil A and Chouaib S: Granzyme B-induced cell death involves induction of p53 tumor suppressor gene and its activation in tumor target cells. *J Biol Chem* 282: 32991-32999, 2007.
82. Stanelle J and Putzer BM: E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* 12: 177-185, 2006.
83. Putzer BM: E2F1 death pathways as targets for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 11: 239-251, 2007.
84. Lin WC, Lin FT and Nevins JR: Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15: 1833-1844, 2001.
85. Yu F, Megyesi J, Safirstein RL and Price PM: Involvement of the CDK2-E2F1 pathway in cisplatin cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F52-F59, 2007.
86. Ianari A, Gallo R, Palma M, Alesse E and Gulino A: Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279: 30830-30835, 2004.
87. Real PJ, Sanz C, Gutierrez O, Pipaon C, Zubiaga AM and Fernandez-Luna JL: Transcriptional activation of the pro-apoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett* 580: 5905-5909, 2006.
88. Hershko T and Ginsberg D: Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 279: 8627-8634, 2004.

89. Gaviraghi M, Caricasole A, Costanzo C, Diamanti D, Dandrea M, Donadelli M, Scarpa A and Palmieri M: Identification of a candidate alternative promoter region of the human Bcl2L11 (Bim) gene. *BMC Mol Biol* 9: 56, 2008.
90. Biswas SC, Liu DX and Greene LA: Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway. *J Neurosci* 25: 8349-8358, 2005.
91. Eischen CM, Packham G, Nip J, Fee BE, Hiebert SW, Zambetti GP and Cleveland JL: Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20: 6983-6993, 2001.
92. Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP, Jeon JH, Lee ES, Byun SS, Lim HM, Song EY, Lim JS, Yoon DY, Lee HG and Choe YK: Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 237: 56-66, 2006.
93. Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V and Rojanasakul Y: Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 73: 119-127, 2008.
94. Jiang M, Wei Q, Wang J, Du Q, Yu J, Zhang L and Dong Z: Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene* 25: 4056-4066, 2006.
95. Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M and Krammer PH: p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188: 2033-2045, 1998.
96. Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Muller M, Wallach D, Goncharov TM, Krammer PH, Rotter V and Oren M: Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* 22: 5667-5676, 2003.
97. Fulda S, Los M, Friesen C and Debatin KM: Chemosensitivity of solid tumor cells *in vitro* is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* 76: 105-114, 1998.
98. Toyozumi Y, Arima N, Izumaru S, Kato S, Morimatsu M and Nakashima T: Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human laryngeal squamous cell carcinoma, HEP-2 cells. *Int J Oncol* 25: 721-728, 2004.
99. Oka N, Tanimoto S, Taue R, Nakatsuji H, Kishimoto T, Izaki H, Fukumori T, Takahashi M, Nishitani M and Kanayama HO: Role of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in bladder cancer cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci* 97: 1093-1098, 2006.
100. Burgering BM and Medema RH: Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 73: 689-701, 2003.
101. Greer EL and Brunet A: FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24: 7410-7425, 2005.
102. Lam EW, Francis RE and Petkovic M: FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans* 34: 722-726, 2006.
103. Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, Alvarez R, Schiavone EM, Ferrara F, Bresciani F, Weisz A, De Lera AR, Gronemeyer H and Altucci L: Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11: 77-84, 2005.
104. Xu J, Zhou JY, Tainsky MA and Wu GS: Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cells to adriamycin. *Cancer Res* 67: 1203-1211, 2007.
105. Wieckowski E, Atarashi Y, Stanson J, Sato TA and Whiteside TL: FAP-1-mediated activation of NF-kappaB induces resistance of head and neck cancer to Fas-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 100: 16-28, 2007.
106. Ishida S, Lee J, Thiele DJ and Herskowitz I: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14298-14302, 2002.
107. Holzer AK, Manorek GH and Howell SB: Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70: 1390-1394, 2006.
108. Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ and Kuo MT: Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther* 3: 1543-1549, 2004.
109. Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R and Howell SB: The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 66: 817-823, 2004.
110. Safaei R, Holzer AK, Katano K, Samimi G and Howell SB: The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem* 98: 1607-1613, 2004.
111. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T and Akiyama S: Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* 60: 1312-1316, 2000.
112. Nakayama K, Miyazaki K, Kanzaki A, Fukumoto M and Takebayashi Y: Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 8: 1285-1287, 2001.
113. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M and Howell SB: Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10: 4661-4669, 2004.
114. Kalayda GV, Wagner CH, Buss I, Reedijk J and Jaehde U: Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 8: 175, 2008.
115. Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 1295-1302, 2000.



## Ευμορφία Γ. Κωνσταντάκου, B.Sc.

### Βιολόγος

CV

## ΠΤΥΧΙΑ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

### Επαγγελματική Ιδιότητα

#### Υποψήφια Διδάκτορας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου &  
Βιοφυσικής  
Τμήμα Βιολογίας  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Εθνικό & Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- ❖ Ημερομηνία Γέννησης:  
**01.01.1984**
- ❖ Τόπος Γέννησης:  
**Βόλος – Ν. Μαγνησίας**
- ❖ Υπηκοότητα:  
**Ελληνική**
- ❖ Οικογενειακή Κατάσταση:  
**Άγαμη**
- ❖ Διεύθυνση Οικίας:  
**Πραξιτέλους 180-182,  
Τ.Κ. 18535, Πειραιάς**
- ❖ Τηλέφωνο Οικίας:  
**+30-210-4297392**
- ❖ Κινητό:  
**+30-6937462061**
- ❖ E-mail:  
**eumokon@biol.uoa.gr**

- ❖ **2001:** Απολυτήριο 5<sup>ου</sup> Ενιαίου Λυκείου Βόλου  
Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα
- ❖ **2006:** Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας,  
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς
- ❖ Ξένες γλώσσες  
**2004:** Αγγλικά - Michigan Proficiency  
**1999:** Γερμανικά - Grundstufe
- ❖ Ηλεκτρονικοί υπολογιστές:  
**2006:** Πτυχίο ECDL στις ενότητες Windows, Excel,  
Word, Power point, Internet, Access, Βασικές  
Έννοιες

## ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- ❖ **2008-2011:** Υπότροφος Εσωτερικού Ιδρύματος  
Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.)  
(Γνωστικό Πεδίο: Βιολογικές Επιστήμες)
- ❖ **2011:** Υποτροφία συμμετοχής στο «Σεμινάριο  
Βιολογίας & Ιατρικής» του Ιδρύματος  
Μποδοσάκη, Βραυρώνα, Αττική

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

### ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- ❖ Διεύθυνση:  
Εθνικό & Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Σχολή Θετικών  
Επιστημών,  
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας  
Βιολογίας Κυττάρου &  
Βιοφυσικής  
Πανεπιστημιούπολη,  
Ζωγράφου 15784, Αθήνα,  
Ελλάδα
- ❖ Τηλέφωνο:  
+30-210-7274688
- ❖ Fax:  
+30-210-7274742
- ❖ E-mail:  
eumokon@biol.uoa.gr

- ❖ **2007-2013:** Υποψήφια Διδάκτωρ του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής  
Θέμα Διδακτορικής Διατριβής: «Κυτταροβιολογική μελέτη της επίδρασης συμβατικών και στοχευμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε πρότυπα βιολογικά συστήματα, με έμφαση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης»  
Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης, *M.Sc., Ph.D.* (Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ)
- ❖ **2011-2012:** Επιστημονικός Ερευνητικός Συνεργάτης (Εργασιακό καθεστώς τύπου ημι-απασχόλησης) στο τμήμα Μοριακής Διαγνωστικής της εταιρείας «Genomedica», με έδρα τον Πειραιά  
Διευθύνων σύμβουλος: Χαράλαμπος Κοντός, *M.Sc., Ph.D.*
- ❖ **2006-2007:** Ετήσια Ερευνητική Εκπαίδευση στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»  
Επιβλέπων Ερευνητής: Γεράσιμος Βουτσινάς, *Ph.D.* (Ερευνητής Β', Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μεταλλαξιγένεσης και Καρκινογένεσης, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»)
- ❖ **2004-2005:** Διπλωματική προ-πτυχιακή εργασία με θέμα «Μελέτη για πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού Glu298Asp του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθέτασης του μονοξειδίου του αζώτου με ιδιοπαθείς επαναλαμβανόμενες αποβολές σε γυναίκες του ελληνικού πληθυσμού»  
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κλεονίκη Λάμνησου, *Ph.D.* (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ)

## ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- ❖ Χειρισμός και διατήρηση κυτταρικών καλλιεργειών
- ❖ Τεχνολογία Αλυσ(ιδ)ωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (*PCR*) και εφαρμογές αυτής (*sqRT-PCR*)
- ❖ Ανοσο-στύπωμα Western
- ❖ Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων
- ❖ Απομόνωση ολικού RNA (*total RNA*) κυττάρων θηλαστικών
- ❖ Απομόνωση ανθρώπινου γονιδιωματικού (*genomic*) DNA
- ❖ Διαμόλυνση (*Transfection*) κυτταρικών καλλιεργειών
- ❖ Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA
- ❖ Βασικές τεχνικές Μοριακής Γενετικής (Περιοριστική υδρόλυση πλασμιδιακού DNA, Αντίδραση σύνδεσης {*Ligation*} με φορείς κλωνοποίησης, Βακτηριακός μετασχηματισμός) – Ανασυνδυασμένο DNA
- ❖ Ανάλυση Πρωτοδιάταξης – Αλληλούχιση DNA (*Sequencing*)
- ❖ Κυτταρομετρία Ροής (*FACS*)
- ❖ Ανοσοφθορισμός
- ❖ Τεχνολογία δημιουργίας πειραματικών όγκων τύπου Αλλομοσχεύματος (*Xenografts*)

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. M. Karvela, S. Papadopoulou, E. Tsaliki, E. **Konstantakou**, A. Hatzaki, L. Florentin-Arar, K. Lamnissou, (2008). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. Archives of Gynecology and Obstetrics, February, Vol. 278, No. 4, pg. 349 - 352.

2. D.J. Stravopodis, P.K. Karkoulis, **E.G. Konstantakou**, S. Melachroinou, A.D. Lampidonis, D. Anastasiou, S. Kachrilas, N. Messini-Nikolaki, I.S. Papassideri, G. Aravantinos, L.H. Margaritis and G.E. Voutsinas, (2009). Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines. *International Journal of Oncology (IJO)*, January, Vol. 34, No. 1, pg. 137 - 160.
3. **E.G. Konstantakou**, G.E. Voutsinas, P.K. Karkoulis, G.Aravantinos, L.H. Margaritis and D.J. Stravopodis, (2009). Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *International Journal of Oncology (IJO)*, August, Vol. 35, No. 8, pg. 401 - 416.
4. D.J. Stravopodis, P.K. Karkoulis, **E.G. Konstantakou**, S. Melachroinou, A. Thanasopoulou, G. Aravantinos, L.H. Margaritis, E. Anastasiadou and G.E. Voutsinas, (2011). Thymidylate synthase inhibition induces p53-dependent and p53-independent apoptotic responses in human urinary bladder cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (JCRCO)*, February, Vol. 137, No. 2, pg. 359 - 374.
5. A. Thanasopoulou, AG. Xanthopoulou, AK. Anagnostopoulos, **EG. Konstantakou**, LH. Margaritis, IS. Papassideri, DJ. Stravopodis, GT. Tsangaris and E. Anastasiadou, (2012). Silencing of CCDC6 Reduces the Expression of 14-3-3 $\sigma$  in Colorectal Carcinoma Cells. *Anticancer Research*, March, Vol. 32, No.3, pg. 907 - 913.
6. P.K. Karkoulis, D.J. Stravopodis, **E.G. Konstantakou** and G.E. Voutsinas, (2013). Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cell lines. *Cancer Cell International*, February, Vol. 13, No.1, pg.11.
7. **E.G. Konstantakou et al.** 3-Bromopyruvate disrupts signaling integrity and induces apoptotic and non-apoptotic death in human urinary bladder cancer cells. *In preparation*, 2013.
8. **E.G. Konstantakou et al.** Bortezomib-induced eradication of bladder cancer cells depends on apoptosis, autophagy and signaling deregulation, but does not require p53 activity. *In preparation*, 2013.



## ΑΝΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ (POSTERS)

- ❖ **2005:** «Μη συσχέτιση των πολυμορφισμών Glu298Asp και 4VNTR του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου με αυθόρμητες αποβολές»  
Βασιλάκου Μ., **Κωνσταντάκου Ε.**, Κωνσταντή Ε., Βελισσάριου Β., Χατζάκι Α., Φλωρεντίν-Αράρ Λ. και Λάμνισου Κ.  
Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 27<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο, Ναύπλιο
- ❖ **2009:** «Η δια μέσου της Cisplatin επαγόμενη απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης συσχετίζεται με p53-εξαρτώμενες και p53-ανεξάρτητες ρυθμιστικές αποκρίσεις»  
**Κωνσταντάκου Ε.Γ.**, Βουτσινάς Γ.Ε., Καρκούλης Π.Κ., Αραβαντινός Γ., Μαργαρίτης, Λ.Χ. και Στραβοπόδης Δ.Ι.  
Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα
- ❖ **2009:** «Η 17-AAG επάγει αναστολή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστης λόγω μειορρύθμισης πολλαπλών πελατών της Hsp90 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Akt»  
Καρκούλης Π.Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι., **Κωνσταντάκου Ε.Γ.**, Μαργαρίτης Λ.Χ. και Βουτσινάς Γ.Ε.  
Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα
- ❖ **2009:** «Δημιουργία ζωικών μοντέλων τύπου αλλομοσχεύματος για την *in vivo* απεικόνιση όγκων»  
Σέττα-Καφφετζή Ν., Θανασοπούλου Α., Ρουμπελάκη Μ., Σαμαρά Α., **Κωνσταντάκου Ε.Γ.**, Βουτσινάς Γ.Ε., Ανάγνου Ν., Δήμας Κ., Στραβοπόδης Δ.Ι. και Αναστασιάδου Ε.  
Ελληνική Εταιρεία Βιολογικών Επιστημών, 31<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο, Πάτρα

## ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – ΣΥΝΕΔΡΙΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

- ❖ Ζωγραφική
- ❖ Μοντέρνοι χοροί
- ❖ Παρακολούθηση θεωρητικών μαθημάτων μουσικής και εκμάθηση βασικών γνώσεων πιάνου
- ❖ Κινηματογράφος
- ❖ Λογοτεχνία

- ❖ **2001:** Παρακολούθηση ομιλιών της Επιστήμης Κοινωνίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, με «Επίκαιρα προβλήματα υγείας και η αντιμετώπισή τους», Αθήνα
- ❖ **2004:** Συμμετοχή στο 26<sup>ο</sup> Επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Βόλος
- ❖ **2005:** Συμμετοχή στο 27<sup>ο</sup> Επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Ναύπλιο
- ❖ **2009:** Συμμετοχή στο 31<sup>ο</sup> Επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Πάτρα
- ❖ **2009:** Συμμετοχή στο 1<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Μοριακής Έρευνας Καρκίνου, Αθήνα
- ❖ **2011:** Συμμετοχή στο πεντάήμερο «Σεμινάριο Βιολογίας & Ιατρικής» του Ιδρύματος Μποδοσάκη, Βραυρώνα, Αττική

13/03/2013

*In the absence of data  
all opinions are equal*



