



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος Ν. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

**"ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗ
ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ
ΤΕΜΟΖΟΛΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ – ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ"**

υπό

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ Ι. ΒΛΑΧΟΣΤΕΡΓΙΟΥ

Ειδικευόμενου Παθολογίας-Ογκολογίας 2013

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

© 2013 Παναγιώτης Ι. Βλαχοστέργιος

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Χρήστος Ν. Παπανδρέου
Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος Ε. Σταθάκης
Ομ. Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος Κ. Κουκούλης
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Λάζαρος Ι. Σακκάς
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Φουντάς
Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος Βασιλόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η έρευνα αυτή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμβολή του Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χρήστου Ν. Παπανδρέου, ο οποίος με περιέβαλε με την εμπιστοσύνη του και με ενέταξε στο ερευνητικό έργο της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τον ευχαριστώ θερμά για την εξαιρετική καθοδήγηση και στήριξή του. Τον ευχαριστώ επιπλέον για όλες τις ευκαιρίες μάθησης, εκπαίδευσης και μύησης στο πεδίο της Ογκολογίας και της ιατρικής έρευνας εν γένει, που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια που είχα το προνόμιο να είμαι υπό την επίβλεψή του στα πλαίσια της παρούσας έρευνας.

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Παναγιώτη Λιάκο, για την ανεκτίμητη βοήθειά του στην οργάνωση μέρους των πειραμάτων και την κριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής της έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες στις βιολόγους Ελεάνα Χατζηδάκη, Χριστίνα Μπεφάνη και Αριστέα Καραγιαννάκη και στους πρώην συνεργάτες της Ογκολογικής Κλινικής συναδέλφους Ιωάννη Βουτσαδάκη και Άννα Πατρικίδου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου.

Παναγιώτης Ι. Βλαχοστέργιος

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ο Παναγιώτης Ι. Βλαχοστέργιος γεννήθηκε στις 6 Αυγούστου 1983 στη Λάρισα. Το Σεπτέμβριο του 2001 ξεκίνησε τις σπουδές του στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το οποίο αποφοίτησε τον Ιούλιο του 2007. Λόγω ιδιαίτερου ενδιαφέροντος στο πεδίο της Ογκολογικής έρευνας, ξεκίνησε τη διδακτορική του διατριβή στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τον Οκτώβριο του 2007. Έκτοτε εργάστηκε παράλληλα ως βοηθός έρευνας και διαχειριστής δεδομένων κλινικών μελετών στα πλαίσια της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (ΕΣΟΟ) και της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Από το Δεκέμβριο του 2009 έως τον Ιούνιο του 2012 συνέχισε την ιατρική εκπαίδευσή του ως ειδικευόμενος ιατρός Παθολογίας στην Α΄ Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας «Κουτλιμπάνειο & Τριανταφύλλειο». Από τον Ιούνιο του 2012 έως το Δεκέμβριο του 2012 συνέχισε την ειδίκευσή του ως ιατρός Παθολογίας στην Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Παράλληλα, πιστοποιήθηκε από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Ανάνηψης (ERC) για τη Βασική και Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής (BLS, ALS) καθώς και από το Αμερικανικό Κολλέγιο Χειρουργών (ACS) για την Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής στο Τραύμα (ATLS). Επίσης είναι πιστοποιημένος από την Εκπαιδευτική Επιτροπή Αλλοδαπών Αποφοίτων Ιατρικής (Educational Commission for Foreign Medical Graduates, ECFMG) των ΗΠΑ. Είναι μέλος διεθνών και εθνικών επιστημονικών εταιρειών που άπτονται της ογκολογικής έρευνας (ASCO, AACR, ESMO, EACR, STO, Ομάδα Ελλήνων Νέων Ογκολόγων) και τα ερευνητικά του ενδιαφέροντα περιλαμβάνουν την επιδιόρθωση του DNA από τη μεθυλοτρανσφεράση της μεθυλογουανίνης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, την οδό ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης-νευροπεπτιδίων στον καρκίνο προστάτη, και την καρκινική καχεξία στον καρκίνο πνεύμονα.

**"ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗ
ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ
ΤΕΜΟΖΟΛΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΔΟΥ ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ – ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ
ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ"**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Ι. ΒΛΑΧΟΣΤΕΡΓΙΟΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Χρήστος Ν. Παπανδρέου**, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Νικόλαος Ε. Σταθάκης**, Ομ. Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Γεώργιος Κ. Κουκούλης**, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Εισαγωγή: Η καθιερωμένη θεραπεία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, που περιλαμβάνει τον αλκυλιωτικό παράγοντα τεμοζολομίδη (TMZ), είναι συχνά αναποτελεσματική λόγω της ύπαρξης εγγενούς ή της ανάπτυξης δευτερογενούς χημειοαντοχής που εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA από το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράση της μεθυλογουανίνης (MGMT). Διάφορες θεραπευτικές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την άμεση αναστολή της MGMT με τη χρήση ψευδοϋποστρωμάτων όπως η Ο6-βενζυλογουανίνη (Ο6-BG), ωστόσο η ταχεία ανάκαμψη των επιπέδων της MGMT μετά τη διακοπή της θεραπείας εμποδίζει την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη. Επιπλέον λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επαγωγή της MGMT μετά τη βλάβη του DNA. Η οδός ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων σηματοδότησης με πρωταγωνιστή την ουβικουιτίνη που καταλήγουν στην αποδόμηση αποδιαταγμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών του κυττάρου από ένα πολύπρωτεινικό σύμπλεγμα, το 26S πρωτεάσωμα. Μέσα στην πληθώρα των πρωτεϊνών με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες που ελέγχονται πρωτεολυτικά από το πρωτεάσωμα ανήκει και η MGMT. Η φαρμακευτική αναστολή του πρωτεασώματος από τον παράγοντα μπορτεζομίπη (BZ) έχει αποδείξει την αντικαρκινική της δράση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου και του γλοιοβλαστώματος, και χρησιμοποιείται σε κλινικό επίπεδο για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και του λεμφώματος από κύτταρα μανδύα. Ωστόσο, η ύπαρξη άμεσης επίδρασης της αναστολής του πρωτεασώματος στην έκφραση της MGMT δεν έχει διερευνηθεί. Επιπλέον, η προσθήκη BZ στην TMZ ως στρατηγική χημειοευαισθητοποίησης των γλοιομάτων έχει δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες αλλά οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη δράση του συνδυασμού δεν έχουν εξηγηθεί. Τα παραπάνω ερωτήματα αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας *in vitro* έρευνας.

Υλικά και μέθοδοι: Οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινου πολύμορφου γλοιοβλαστώματος T98G (με υψηλή έκφραση MGMT και μετάλλαξη του p53, mt p53) και U87 (με χαμηλή έκφραση MGMT και φυσιολογικό p53, wt p53) καλλιιεργήθηκαν σε καλλιιεργητικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium με την παρουσία ή χωρίς TMZ, Ο6-BG, BZ και συνδυασμών TMZ-Ο6-BG και TMZ-BZ. Εκτιμήθηκαν η επιβίωση και η απόπτωση των κυττάρων χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες μεθυλ-τριαζολυλ-τετραζολίου (MTT) και κατακερματισμού του DNA καθώς και τα επίπεδα της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών. Επιπλέον εκτιμήθηκε η υποκυτταρική εντόπιση και τα επίπεδα έκφρασης της MGMT με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών, και με αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR). Επίσης μετρήθηκε η δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος με φλουρομετρική μέθοδο. Τέλος εκτιμήθηκαν η υποκυτταρική εντόπιση (με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών και ανοσοφθορισμός), τα επίπεδα και ο βαθμός ενεργοποίησης της πρωτεΐνης NF-κΒ, τα επίπεδα IκΒα, p53 και HIF-1α, τα επίπεδα και ο βαθμός ενεργοποίησης των πρωτεϊνών eIF2α, MAPK, AKT, και STAT3, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης της MGMT και ταυτόχρονα ρυθμίζονται άμεσα ή έμμεσα από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος.

Αποτελέσματα: Ο συνδυασμός Ο6-BG-TMZ αύξησε την κυτταροτοξικότητα της TMZ μειώνοντας την επιβίωση των T98G κυττάρων. Παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση της MGMT σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, μείωση των επιπέδων NF-κΒ και mt p53 και μικρή μείωση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας. Ωστόσο, 24 ώρες μετά την απομάκρυνση των

φαρμάκων η επιβίωση των κυττάρων, η έκφραση της MGMT και η δραστικότητα του πρωτεασώματος επανήλθαν στα βασικά επίπεδα και τα φαινόμενα αυτά συνδυάστηκαν με αύξηση των επιπέδων NF-κB και mt p53. Η BZ, ως μονοθεραπεία, ήταν δραστική στα T98G κύτταρα, οδηγώντας σε μείωση της επιβίωσης και επαγωγή της απόπτωσης. Αυτή η έκβαση συνδυάστηκε με ελάττωση της έκφρασης της MGMT σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, ελάττωση του πυρηνικού και ολικού NF-κB, αύξηση του IκBα και φωσφορυλίωση του eIF2α.

Οι συνδυασμοί TMZ-BZ στα T98G και U87 κύτταρα είχαν διαφορετική επίδραση στην κυτταροτοξικότητα ανάλογα με τη αλληλουχία χορήγησης. Μέγιστη μείωση της επιβίωσης και επαγωγή απόπτωσης παρατηρήθηκε στα T98G με την πρώιμη επώαση με BZ ακολουθούμενη από TMZ, ενώ στα U87 η όψιμη προσθήκη BZ μετά την TMZ ήταν πιο δραστική. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις η μέγιστη κυτταροτοξικότητα συνδυάστηκε με τη μέγιστη καταστολή των επιπέδων πυρηνικής MGMT και πυρηνικού NFκB, με τη σταθεροποίηση του wt p53, και με τη μέγιστη αναστολή ενεργοποίησης των MAPK, AKT, STAT3 και HIF-1α.

Συμπεράσματα: Η αποτυχία της O6-BG να οδηγήσει σε παρατεταμένη χημειοευαισθητοποίηση σε κύτταρα με mt p53 σχετίζεται με επαγωγή νέας έκφρασης MGMT από τους μεταγραφικούς παράγοντες NFκB and mt p53. Η αναστολή του πρωτεασώματος από την BZ καταστέλλει την έκφραση MGMT μέσω μείωσης της μεταγραφής της από τον πυρηνικό NFκB και της μετάφρασης από τη φωσφορυλιωμένη eIF2α. Η αναστολή του πρωτεασώματος από την BZ αναστέλλει την MGMT-εξαρτώμενη αντοχή στην TMZ ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης TMZ-BZ, η οποία διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών αλλά υπαγορεύεται σταθερά από τη μέγιστη αναστολή των ρυθμιστών της MGMT.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: το κλινικό πρόβλημα.....	12
1.1.1 Επιδημιολογία	12
1.1.2 Διάγνωση	15
1.1.3 Σταδιοποίηση.....	17
1.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	17
1.1.4.1 Χειρουργική εξαίρεση	17
1.1.4.2 Ακτινοθεραπεία	18
1.1.4.3 Χημειοθεραπεία	19
1.1.4.4 Αρχική αντιμετώπιση.....	26
1.1.4.5 Επικουρική θεραπεία	26
1.1.4.6 Παρακολούθηση.....	27
1.1.4.7 Εκτίμηση της ανταπόκρισης	27
1.1.4.8 Υποτροπή.....	28
1.2 Μοριακή καρκινογένεση γλοιοβλαστώματος	29
1.2.1 Γενετική των κακοήθων γλοιωμάτων.....	30
1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση γλοιοβλαστώματος	32
1.2.3 Το μικροπεριβάλλον του γλοιωματικού όγκου	38
1.2.4 Επιγενετική ρύθμιση του γλοιοβλαστώματος	39
1.3 Η κυτταρική απάντηση στη βλάβη του DNA.....	41
1.3.1 Μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου	44
1.3.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA.....	49
1.3.2.1 BER.....	51
1.3.2.2 MMR.....	52
1.3.2.3 NER.....	52
1.3.2.4 HR και NHEJ	53
1.3.2.5 TLS	54
1.3.2.6 Άμεση επιδιόρθωση (MGMT).....	54
1.4 Ο ρόλος της τεμοζολομίδης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα	55
1.4.1 Μηχανισμός δράσης της τεμοζολομίδης.....	56
1.4.2 Η θέση της τεμοζολομίδης στην κλινική πράξη	60
1.4.3 Μηχανισμοί αντίστασης των γλοιωμάτων στην τεμοζολομίδα	61
1.4.3.1 MGMT	62
1.4.3.2 MMR.....	69
1.4.3.3 BER.....	69
1.4.3.4 Απορρύθμιση της απόπτωσης.....	69

1.4.3.5 Αντλίες μεταφοράς φαρμάκων	70
1.4.3.6 Στελεχιαία καρκινικά κύτταρα.....	70
1.4.3.7 Ο ρόλος των miRNAs	71
1.4.4 Στρατηγικές αναστροφής της χημειοαντοχής	72
1.4.4.1 Εναλλακτικά σχήματα τεμοζολομίδης.....	72
1.4.4.2 Αναστολή MGMT	73
1.4.4.3 Αναστολή PARP.....	76
1.4.4.4 Αναστολή APE-1.....	78
1.4.4.5 Στόχευση των στελεχιαίων καρκινικών κυττάρων	78
1.5. Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος	80
1.5.1 Δομή και λειτουργία συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος	80
1.5.2 Ο ρόλος της οδού ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος στο γλοιοβλάστωμα.....	84
1.5.2.1 Η ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος.....	86
1.5.3 Η αναστολή του πρωτεασώματος	90
1.5.3.1 Ο αναστολέας πρωτεασώματος μπορτεζομίμη	93
1.5.4 Η σηματοδοτική οδός NF-κΒ	100
1.5.4.4 NF-κΒ και πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.....	105
2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	108
2.1 Το πειραματικό μοντέλο	108
2.2 Στόχοι έρευνας.....	109
2.3 Ερευνητική υπόθεση	110
2.4 Κλινικό ενδιαφέρον και δυνατότητες κλινικής εφαρμογής.....	111
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	112
3.1 Καλλιέργεια κυττάρων και αντιδραστήρια.....	112
3.2 Συνθήκες επώασης φαρμάκων.....	114
3.3 Δοκιμασία μεθυλ-τριαζολυλ-τετραζολίου (MTT)	115
3.4 Ανάλυση αλληλεπίδρασης φαρμάκων	116
3.5 Δοκιμασία κατακερματισμού του DNA.....	116
3.6 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα.....	117
3.7 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα... 	117
3.8 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας 20S πρωτεασώματος	118
3.9 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης	119

3.10 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE	120
3.11 Πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση	121
3.12 Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού	123
3.13 Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	124
3.14 Στατιστική ανάλυση.....	126
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	126
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	150
6. ΣΥΝΟΨΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	158
Βιβλιογραφία.....	160

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα: το κλινικό πρόβλημα

1.1.1 Επιδημιολογία

22.900 νέες περιπτώσεις πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου και άλλων νεοπλασιών του κεντρικού νευρικού συστήματος εκτιμάται ότι διαγνώστηκαν το 2012 στις Η.Π.Α, οι οποίες ευθύνονται για περίπου 13.700 θανάτους [1]. Η επίπτωση των πρωτοπαθών όγκων εγκεφάλου αυξήθηκε κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 χρόνων, ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους [2]. Το αναπλαστικό αστροκύτωμα (grade III) και το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (grade IV αστροκύτωμα) είναι οι συχνότεροι πρωτοπαθείς όγκοι του ΚΝΣ στους ενήλικους, και ευθύνονται περίπου για το 7% και 54% του συνόλου των γλοιωμάτων, αντίστοιχα. Το γλοιοβλάστωμα εμφανίζει τη μεγαλύτερη θνητότητα με μόλις ένα τρίτο των ασθενών να έχουν επιβίωση πέραν του έτους και λιγότερο από 5% πέραν της 5ετίας. Η 5ετής επιβίωση για το αναπλαστικό αστροκύτωμα είναι 27%. Οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι η ιστολογική εικόνα, η ηλικία και η γενική κατάσταση (performance status, PS) [3].

Στην Ευρώπη και στις Η.Π.Α. η επίπτωση των κακοήθων γλοιωμάτων είναι 5/100.000 [4, 5]. Η εμφάνισή τους μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία αλλά η υψηλότερη επίπτωση παρατηρείται μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} δεκαετίας της ζωής [5]. Η προηγούμενη έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί γνωστό παράγοντα κινδύνου, σε αντίθεση με τα κύματα ραδιοσυχνότητας, με τα οποία δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση [6]. Η ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης έχει επίσης αναγνωριστεί στο πλαίσιο οικογενών συνδρόμων όπως νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και 2, λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια NF1 και NF2, σύνδρομο Li Fraumeni λόγω μεταλλάξεων του TP53, σύνδρομο μελανώματος-αστροκυττώματος, λόγω

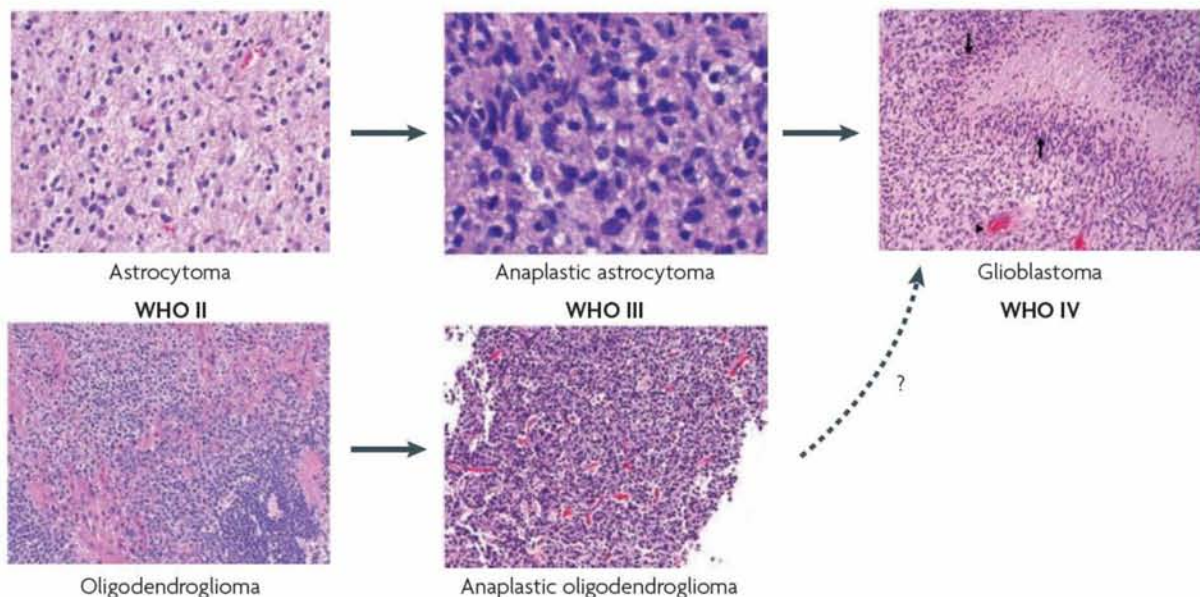
μεταλλάξεων στο CDKN2A, οζώδη σκλήρυνση λόγω μεταλλάξεων στα TSC1 και TSC2, σύνδρομο Turcot λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος mismatch repair (MMR) και σύνδρομο Cowden λόγω μεταλλάξεων του PTEN. Ωστόσο > 90% των γλοιωμάτων δε σχετίζονται με τα παραπάνω γενετικά σύνδρομα. Πρόσφατα, πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) σε δύο γονίδια με ρυθμιστική λειτουργία στον κυτταρικό κύκλο (CDKN2B) και στο μέγεθος των τελομερών (RTEL1) αντίστοιχα, συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γλοιωμάτων [7, 8]. Άλλοι πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την αποτοξίνωση, την επιδιόρθωση του DNA, και τον κυτταρικό κύκλο πιθανώς να εμπλέκονται στην εμφάνιση γλοιωμάτων ωστόσο αυτό μένει να επιβεβαιωθεί περαιτέρω [2].

Στην Ελλάδα, από δεδομένα προοπτικής επιδημιολογικής μελέτης επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε μεταξύ 2005 και 2007 σε πληθυσμό 488.435 ατόμων της νοτιοδυτικής Ελλάδας, καταγράφηκαν 56 νέες περιπτώσεις ασθενών με γλοίωμα καταγράφηκαν με ρυθμό επίπτωσης 5.73 ανά 10^5 κατοίκους ανά έτος για τα γλιώματα και 3.69 ανά 10^5 κατοίκους ανά έτος για τα γλοιοβλαστώματα, αντίστοιχα. Η αναλογία ανδρών-γυναικών ήταν 1.25 στην ομάδα των νέων ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Ο ρυθμός επίπτωσης ήταν και για τα δύο φύλα υψηλότερος στην ηλικιακή ομάδα μεταξύ 60 και 79 ετών. Η πιο συχνή ανατομική εντόπιση ήταν ο μετωπιαίος λοβός. Σε σχέση με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, 46.5% των ασθενών προέρχονταν από χαμηλά, 25% από μεσαία και 28.5% από υψηλά κοινωνικοοικονομικά στρώματα. Δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης γλοιωμάτων και της κατανάλωσης αλκοόλ, του καπνίσματος, ή της χρήσης κινητών τηλεφώνων. Παρατηρήθηκε μια μη στατιστικά σημαντική τάση για θετική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης γλιώματος και γλοιοβλαστώματος και του ιστορικού σοβαρής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης [9].

Τα αστροκυττώματα υψηλής κακοήθειας διήχυνται τους γειτονικούς ιστούς και συχνά διασχίζουν τη μέση γραμμή με ετερόπλευρη επέκταση. Ασθενείς με αυτή την εικόνα συχνά εμφανίζουν συμπτώματα αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης, επιληπτικούς σπασμούς ή εστιακή νευρολογική σημειολογία που σχετίζονται με το μέγεθος και την εντόπιση του όγκου και το συνοδό περιεστιακό οίδημα. Αυτοί οι όγκοι συνήθως δε συνοδεύονται από αιμορραγία ή επασβεστώσεις αλλά παρουσιάζουν απεικονιστικά σημαντικό οίδημα, φαινόμενο μάζας και σκιαγραφική ενίσχυση. Καρκινικά κύτταρα έχουν βρεθεί στο περιεστιακό οίδημα, και αντιστοιχούν σε ανώμαλη ένταση σήματος σε T2 ακολουθίες μαγνητικής τομογραφίας. Η εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος είναι δυσχερής με τη χρήση αξονικής και μαγνητικής τομογραφίας λόγω της έκτασης και κατανομής της σκιαγραφικής ενίσχυσης, του οιδήματος και του φαινομένου μάζας που συχνά αντιπροσωπεύουν περισσότερο την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) παρά τις αλλαγές στο μέγεθος του όγκου. Συνεπώς, άλλοι παράγοντες που μεγεθύνουν τη δυσλειτουργία του ΑΕΦ (όπως χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, και σταδιακή ελάττωση της δόσης των κορτικοστεροειδών (tapering) μπορεί να μιμηθεί πρόοδο της νόσου λόγω αύξησης της σκιαγραφικής ενίσχυσης, της παθολογικής έντασης σήματος σε T2 ακολουθίες MRI και του φαινομένου μάζας. Το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα είναι σχετικά σπάνιο, χαρακτηρίζεται από μεγάλη κυτταροβρίθεια, πυρηνική πολυμορφία, συχνές μιτώσεις, πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων και νεκρώσεις, ενώ μπορεί να διαγνωστεί εσφαλμένα ως πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Ωστόσο, οι χαρακτηριστική απώλεια αλληλίων στα χρωμοσώματα 1p και 19q είναι παρούσα στο αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα [10]. Αυτός ο ιστολογικός υπότυπος έχει πολύ καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με το αναπλαστικό αστροκύττωμα και το γλοιοβλάστωμα λόγω της αυξημένης χημειοευαισθησίας του [11] και οι μισοί ασθενείς περίπου επιβιώνουν μέχρι την 5ετία.

1.1.2 Διάγνωση

Τα κακοήθη γλιώματα περιλαμβάνουν το γλιοβλάστωμα [World Health Organization (WHO) grade IV], το αναπλαστικό αστροκύτωμα (WHO grade III), το μικτό αναπλαστικό ολιγοαστροκύτωμα (WHO grade III) and το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλιώμα (WHO grade III). Η διάγνωση μετά από βιοψία ή εκτομή του όγκου πραγματοποιείται με βάση την αναθεωρημένη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) (Εικόνα 1.1.2) [12].



Εικόνα 1.1.2 Ταξινόμηση των γλιωμάτων κατά WHO. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του γλιοβλαστώματος (WHO IV): μικροαγγειακός πολλαπλασιασμός και ψευδοπασσαλοειδής νέκρωση (βέλη) [12].

Η πρόγνωση εξαρτάται από τον βαθμό κακοήθειας και την ιστολογία του όγκου. Το γλιοβλάστωμα διακρίνεται σε πρωτοπαθές και δευτεροπαθές, ανάλογα με την κλινική εμφάνιση. Το πρωτοπαθές συναντάται γενικά σε ηλικιωμένους ασθενείς και χαρακτηρίζεται γενικά από απουσία συμπτωμάτων ή ενδείξεις ανιχνεύσιμων όγκων χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας. Το δευτεροπαθές εμφανίζεται σε νεότερους ασθενείς (κάτω από την ηλικία

των 45) και προέρχεται από εξέλιξη γλοιώματος χαμηλότερης κακοήθειας μέσα σε 5-10 έτη από την αρχική διάγνωση [13].

Το γλοιοβλάστωμα έχει τη χειρότερη πρόγνωση, ενώ το αμιγές ολιγοδενδρογλοίωμα τείνει να έχει την καλύτερη έκβαση και υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης σε ΧΜΘ και ΑΚΘ. Η πρόγνωση του μικτού αναπλαστικού αστροκυττώματος και του αναπλαστικού αστροκυττώματος είναι ενδιάμεση μεταξύ γλοιοβλαστώματος και αμιγούς αναπλαστικού ολιγοδενδρογλοιώματος. Οι πρωτοπαθείς όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) πολύ σπάνια μεθίστανται εκτός του ΚΝΣ, συνεπώς δεν απαιτείται συστηματική σταδιοποίηση εκτός από τις περιπτώσεις που χρήζουν διαφορικής διάγνωσης από εγκεφαλικές μεταστάσεις.

Η απώλεια γενετικού υλικού στα χρωμοσώματα 1p/19q (LOH 1p/19q), που αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως αντιμετάθεση αποτελεί προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης στη ΧΜΘ. Ωστόσο, συναντάται σε μια ξεχωριστή ομάδα όγκων με μακρά φυσική ιστορία ανεξαρτήτως θεραπείας και η χρήση της για διαγνωστικούς λόγους θα πρέπει να περιορίζεται για την υποστήριξη της διάγνωσης του ολιγοδενδρογλοιώματος. Η επιγενετική καταστολή της έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης της μεθυλογουανίνης (methyl-guanine methyl transferase, MGMT) μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της συνιστά μερική αδυναμία του όγκου να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA που προκαλείται από τη ΧΜΘ. Σε αναδρομικές μελέτες η έκφραση της MGMT έχει συσχετιστεί με την έκβαση μετά από ΧΜΘ με αλκυλιωτικούς παράγοντες [II, B]. Ο καθορισμός της MGMT με ανοσοϊστοχημεία έχει προταθεί, ωστόσο δεν έχουν προτυποποιηθεί η μέθοδος ανίχνευσης, η επαναληψιμότητα και η συσχέτιση με την κλινική έκβαση [III, C]. Ελλείπει καθιερωμένων εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών και κλινικών συνεπειών ο προσδιορισμός της μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου της MGMT ως εξέταση ρουτίνας δεν

χρησιμοποιείται ακόμη στην αντιμετώπιση των ασθενών έξω από τα πλαίσια κλινικών μελετών [V, D] [5].

1.1.3 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση περιλαμβάνει απεικόνιση του εγκεφάλου, κατά προτίμηση με MRI. Η έκταση της εκτομής και ο καθορισμός της υπολειπόμενης νόσου θα πρέπει να εκτιμάται εντός 24–48 ωρών μετεγχειρητικά [III, B]. Η οσφυονωτιαία παρακέντηση γενικά δεν είναι χρήσιμη και δεν απαιτείται σταδιοποίηση άλλων οργάνων. Ο χαμηλός βαθμός κακοήθειας, η ριζική εκτομή του όγκου, η νεαρή ηλικία (<50 έτη), το καλό performance status και η ακεραιότητα των νευρολογικών λειτουργιών του ΚΝΣ αποτελούν ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες [5].

1.1.4 Θεραπευτική αντιμετώπιση

1.1.4.1 Χειρουργική εξαίρεση

Οι στόχοι της χειρουργικής αντιμετώπισης είναι η διάγνωση, η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με την αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης ή την εμφάνιση πιεστικών φαινομένων, την παράταση της επιβίωσης και τη μείωση της ανάγκης χορήγησης κορτικοστεροειδών. Επιπλέον έχει προγνωστική αξία εάν η έκταση της εκτομής δεν επηρεάζει τη νευρολογική λειτουργία [II, C]. Μια προοπτική μελέτη σε 565 ασθενείς με κακοήθη γλοιώματα έδειξε ότι η επιθετική χειρουργική είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας σε σύγκριση με την απλή βιοψία ($p < 0.0001$) [14]. Δεδομένα αναδρομικών αναλύσεων συνιστούν επίσης ότι η ευρεία ολική εκτομή παρατείνει την επιβίωση και είναι

ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς με καλό performance status [15-17]. Δυστυχώς, η διηθητική φύση των αστροκυττωμάτων υψηλής κακοήθειας συχνά καθιστά δυσχερή την πλήρη εκτομή τους. Όταν η χειρουργική εκτομή δε μπορεί να πραγματοποιηθεί με ασφάλεια (π.χ λόγω της εντόπισης του όγκου ή της επηρεασμένης κλινικής κατάστασης του ασθενούς), θα πρέπει να επιχειρείται στερεοτακτική βιοψία. Η διαγνωστική αξία της είναι >95% σε έμπειρα χέρια, ενώ ο μοριακός έλεγχος LOH 1p/19q, κα μεθυλίωσης του γονιδίου της MGMT μπορεί να πραγματοποιηθεί σε φρέσκο κατεψυγμένο ιστό. Αντίθετα, η πλήρης εκτομή των ολιγοδενδρογλοιωμάτων είναι δυνατή καθώς τα περισσότερα εντοπίζονται στους μετωπιαίους λοβούς και έχουν σαφή όρια. Δυστυχώς σχεδόν όλα τα γλοιοβλαστώματα υποτροπιάζουν. Σ'αυτό το σημείο, η επανεκτομή μπορεί να βελτιώσει την έκβαση σε επιλεγμένους ασθενείς [18]. Σύμφωνα με τη μελέτη του Park και συν, η ανάπτυξη του όγκου σε ζωτικές ανατομικές δομές του εγκεφάλου, το πτωχό Karnofsky σκορ, και το μεγάλο μέγεθος του όγκου σχετίζονται με δυσμενή έκβαση μετά την επανεκτομή [19]. Η εμφύτευση πολυμερών καρμουστίνης (BCNU) στην κοιλότητα που δημιουργείται μετά την εκτομή του όγκου πριν την ΑΚΘ έδειξε οριακό όφελος στη διάμεση επιβίωση σε σύγκριση με τη μεμονωμένη ΑΚΘ μετεγχειρητικά σε ασθενείς με πλήρη χειρουργική εκτομή του όγκου [II, B]. Ωστόσο η υποομάδα των ασθενών με γλοιοβλάστωμα δε φαίνεται να ωφελείται σημαντικά. Επίσης δεν υπάρχουν δεδομένα σύγκρισης με το καθιερωμένο σχήμα τεμοζολομίδη-ΑΚΘ ως προς μια ενδεχόμενη αθροιστική δράση αυτού του θεραπευτικού χειρισμού [5, 20].

1.1.4.2 Ακτινοθεραπεία

Η κλασματοποιημένη εξωτερική ακτινοθεραπεία είναι η καθιερωμένη επικουρική θεραπεία μετεγχειρητικά για ασθενείς με αστροκύττωμα υψηλής κακοήθειας. Η χρήση της

στηρίχθηκε σε δυο τυχαιοποιημένες μελέτες στη δεκαετία του 1970 που έδειξαν παράταση στην ολική επιβίωση. Ο Walker και συν σύγκριναν μεταξύ τους τη μετεγχειρητική υποστηρικτική αγωγή, τη χορήγηση καρμουςτίνης (BCNU), την ακτινοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία μαζί με BCNU σε 303 ασθενείς. Η διάμεση επιβίωση ήταν 14, 18.5, 35, και 34.5 εβδομάδες αντίστοιχα [21]. Η δεύτερη μελέτη με 118 ασθενείς επίσης έδειξε όφελος στη διάμεση επιβίωση με τη μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία σε σύγκριση με τη μεμονωμένη χειρουργική εξαίρεση (10.8 έναντι 5.2 μήνες) [22]. Η καθιερωμένη δόση είναι 60 Gy σε κλάσματα των 1.8 έως 2.0 Gy [I, A]. Η χορήγηση μειωμένης δόσης ακτινοβολίας σε ηλικιωμένους (συνολικά 40 έως 50 Gy) παραμένει δραστική [II, B] [22, 23]. Η ΑΚΘ (28 × 1.8 Gy, 50 Gy) σε ασθενείς >70 ετών υπερέιχε της βέλτιστης υποστηρικτικής αγωγής σε τυχαιοποιημένη φάσης III μελέτη [II, B].

Η καθιερωμένη ΑΚΘ (60 Gy) μετά από τοποθέτηση πολυμερών καρμουςτίνης (BCNU) συγκρίθηκε σε τυχαιοποιημένη μελέτη της RTOG έναντι της ΑΚΘ μετά από στερεοτακτική ακτινοχειρουργική με δόση εφόδου (15-24 Gy) στην κοίτη του όγκου σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και μέγεθος όγκου ≤4 cm [24]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά, χωρίς καμία βελτίωση στον τοπικό έλεγχο της νόσου ή στη συνολική επιβίωση με την ακτινοχειρουργική. Μια άλλη μελέτη τυχαιοποίησε ασθενείς σε χορήγηση 50 Gy εξωτερικής ακτινοθεραπείας εγκεφάλου με ή χωρίς προσωρινή εμφύτευση κόκκων ραδιενεργού I-125 έως 60 Gy επίσης απέτυχε να δείξει όφελος στην επιβίωση με την προσθήκη της βραχυθεραπείας [25].

1.1.4.3 Χημειοθεραπεία

Η μέχρι πρόσφατα επικρατούσα άποψη σχετικά με το ρόλο της χημειοθεραπείας σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με γλιώματα υψηλής κακοήθειας ήταν ότι δεν προσφέρει

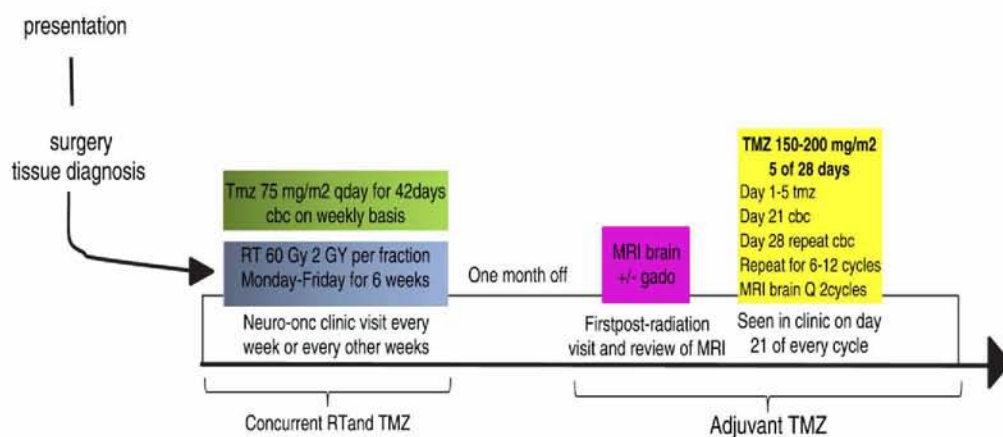
παρά οριακό όφελος ωστόσο, φαίνεται ότι η άποψη αυτή αρχίζει να αλλάζει τα τελευταία χρόνια. Οι περισσότερες από τις παλαιότερες μελέτες χρησιμοποίησαν σχήματα με βάση τις νιτροζουρίες. Η μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη μελέτη επικουρικής ΧΜΘ σε γλοιώματα υψηλής κακοήθειας τυχαιοποίησε 674 ασθενείς σε ΑΚΘ μόνο έναντι ΑΚΘ και ΧΜΘ με το σχήμα PCV [17]. Δεν υπήρξε κανένα όφελος από την προσθήκη PCV, ακόμη και σε ασθενείς με αναπλαστικό αστροκύτωμα [IA]. Παρ' όλα αυτά, 2 μετα-αναλύσεις που συμπεριέλαβαν δεδομένα από τυχαιοποιημένες μελέτες σε ασθενείς με υψηλής κακοήθειας γλοιώματα ανέδειξαν ένα μικρό όφελος στην επιβίωση από την προσθήκη ΧΜΘ στην επικουρική ΑΚΘ [18, 19]. Ειδικότερα, το Glioma Meta- Analysis Trialists Group ανέλυσε 12 μελέτες με 3000 περίπου ασθενείς συνολικά και παρουσίασε απόλυτη αύξηση στη μονοετή επιβίωση από 40% σε 46% καθώς και αύξηση κατά 2 μήνες της διάμεσης επιβίωσης στην ομάδα ασθενών που έλαβε ΧΜΘ (κυρίως νιτροζουρίες) και ΑΚΘ (HR, 0.85; 95% CI, 0.78-0.91; $p < 0.0001$) [18]. Μια προηγούμενη μετα-ανάλυση του Fine και συνεργατών σε 16 τυχαιοποιημένες μελέτες είχε επίσης υποστηρίξει μια αύξηση της μονοετούς και διετούς επιβίωσης κατά 10% και 9% αντίστοιχα [19]. Βάσει των δεδομένων αυτών η ΧΜΘ με βάση τις νιτροζουρίες προσφέρει οριακό όφελος στην επιβίωση [IA].

Άλλες οδοί χορήγησης ΧΜΘ έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Η τοπική εφαρμογή βιοδιασπώμενων, αργά αποδεσμευόμενων πολυμερών καρμουστίνης [carmustine (BCNU) wafers] που τοποθετούνται διεγχειρητικά στην κοίτη του όγκου έδειξε στατιστικά σημαντική βελτίωση της επιβίωσης σε ασθενείς με υποτροπή γλοιωμάτων υψηλής κακοήθειας (31 έναντι 23 εβδομάδων; adjusted HR = 0.67; $p = 0.006$) [20]. Βάσει των δεδομένων αυτών, τα πολυμερή καρμουστίνης είναι η εγκεκριμένη θεραπεία για τη συγκεκριμένη ένδειξη. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης 3 σε 32 ασθενείς με κακόηθες γλοίωμα έδειξε στατιστικά σημαντική παράταση της επιβίωσης με τη χρήση πολυμερών καρμουστίνης ως αρχική θεραπεία σε συνδυασμό με ΑΚΘ συγκρινόμενη με εικονικό

φάρμακο [21]. Μια μεγαλύτερη φάσης 3 μελέτη σε 240 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με κακόηθες γλοίωμα επίσης υποστήριξε στατιστικά σημαντική βελτίωση της διάμεσης επιβίωσης από 11.6 μήνες στην ομάδα που έλαβε εικονικό φάρμακο σε 13.9 μήνες στο σκέλος που χρησιμοποιήθηκαν πολυμερή καρμουστίνης [22]. Το όφελος αυτό διατηρήθηκε 2 ως 3 έτη μετά την τοποθέτηση των πολυμερών [23]. Συνεπώς, βάσει αυτών των μελετών, η ΧΜΘ με πολυμερή καρμουστίνης μπορεί να χορηγηθεί και ως αρχική θεραπεία για τα κακοήθη γλοιώματα. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η καρμουστίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλους παράγοντες οδηγώντας σε αυξημένη τοξικότητα και παραμένει θέμα διαπραγμάτευσης το κατά πόσο είναι ασφαλής η χορήγηση τεμοζολομίδης σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με πολυμερή καρμουστίνης. Επιπλέον, μπορεί να αποκλειστεί η συμμετοχή τέτοιων ασθενών από μελλοντικές μελέτες επικουρικής ΧΜΘ. Για τους λόγους αυτούς υπάρχει διαφωνία ως προς την αξία της χρήσης των πολυμερών καρμουστίνης στην αρχική αντιμετώπιση των ασθενών [IIB].

Η τεμοζολομίδα είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που έχει καταστεί η καθιερωμένη ΧΜΘ ως προσθήκη στην επικουρική ΑΚΘ για νεότερους ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και καλό performance status (PS) (χωρίς εφαρμογή πολυμερών καρμουστίνης). Η κύρια υποστηρικτική τυχαιοποιημένη φάσης 3 μελέτη [24] χρησιμοποίησε το φάρμακο σε 573 ασθενείς ηλικίας έως 70 ετών και PS ≤ 2. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 2 σκέλη λαμβάνοντας είτε: α) τεμοζολομίδα ημερησίως από του στόματος συγχρόνως με επικουρική ΑΚΘ ακολουθούμενη από 6 κύκλους επικουρικής χορήγησης τεμοζολομίδης είτε: β) μόνο ΑΚΘ. Οι κυριότερες παρενέργειες από τη χορήγηση τεμοζολομίδης ήταν αλωπεκία, ναυτία, έμετοι, κεφαλαλγία, κόπωση και ανορεξία. Λόγω του κινδύνου λεμφοπενίας και συνοδών ευκαιριακών λοιμώξεων, απαιτείται προφύλαξη έναντι πνευμονίας από *Pneumocystis carinii* (PCP) κατά τη συγχορήγηση με ΑΚΘ. Οι ασθενείς στο σκέλος της χημειο-ΑΚΘ είχαν στατιστικά μεγαλύτερη διάμεση επιβίωση (14.6 έναντι 12.1

μηνών) και 2ετή επιβίωση (26.5% έναντι 10.4%) σε σύγκριση με το σκέλος της ΑΚΘ. Η τελική ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε και όφελος στην 5ετή επιβίωση (10% έναντι 2%) [25]. Ωστόσο, ο σχεδιασμός της μελέτης δεν διευκρινίζει εάν για το όφελος ευθύνεται η συγχρόνηση τεμοζολομίδης-ΑΚΘ, η επικουρική χορήγηση τεμοζολομίδης μετά την ΑΚΘ ή και τα δύο. Η δόση της τεμοζολομίδης που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ήταν 75 mg/m² ημερησίως συγχρόνως με ΑΚΘ, και μετά 150-200 mg/m² σε 5νθήμερο σχήμα κάθε 28 ημέρες. Εναλλακτικά σχήματα όπως το εντατικοποιημένο 21/28 ημέρες ή 50 mg/m² συνεχώς καθημερινά μελετήθηκαν σε φάσης 2 μελέτες [26]. Η σύγκριση του εντατικοποιημένου 21/28 και του καθιερωμένου 5/28 σχήματος έγινε στη μελέτη RTOG 0525, τα αποτελέσματα της οποίας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση. Συνεπώς, για το γλοιοβλάστωμα, η σύγχρονη χημειο-ΑΚΘ είναι το «standard of care» σε ασθενείς ηλικίας έως 70 ετών [1 A]. Η τεμοζολομίδα χορηγείται στη χαμηλή δόση των 75 mg/m² ημερησίως (7 ημέρες/εβδομάδα) 1–1.5 ώρες πριν την ΑΚΘ από την 1^η ως την τελευταία ημέρα της ΑΚΘ (συνήθως 40–49 ημέρες). Κατά τη διάρκεια της φάσης συντήρησης η τεμοζολομίδα χορηγείται σε δόσεις 150–200 mg/m² ημερησίως για 5 ημέρες κάθε κύκλου διάρκειας 28 ημερών και για 6 κύκλους συνολικά [26].



Εικόνα 1.1.4.3 Θεραπευτικό σχήμα για το νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα [26].

Αναφορικά με την επικουρική χορήγηση τεμοζολομίδης σε ασθενείς με τοποθετημένα πολυμερή καρμουστίνης καθώς και σε ασθενείς ηλικίας άνω των 70 ετών με καλό PS φαίνεται ότι είναι ασφαλής. Μελέτες με λίγους ασθενείς υποστηρίζουν τη χρησιμότητα της προσθήκης της τεμοζολομίδης στην επικουρική ΑΚΘ ανεξαρτήτως προχωρημένης ηλικίας [27, 28]. Για ασθενείς με κακή γενική κατάσταση (frail) και δεδομένου του υψηλότερου κινδύνου μετακτινικής νευροτοξικότητας σε ηλικιωμένους ασθενείς, ιδιαίτερα με πτωχό PS, η ΧΜΘ ως μόνη θεραπεία φαίνεται να αποτελεί μια λογική επιλογή σ' αυτή την υποομάδα [29].

Δεδομένα μεταφραστικής έρευνας υποστηρίζουν τον έλεγχο της μεθυλοτρανσφοράσης της O-6 μεθυλογουανίνης (MGMT) ως προβλεπτικό του οφέλους από την επικουρική ΧΜΘ με τεμοζολομίδη [30]. Τα ολιγοδενδρογλοιώματα παρουσιάζουν συχνά υπερμεθυλίωση του γονιδίου της MGMT και συνεπώς χαμηλά επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης, γεγονός που πιθανώς εξηγεί τη χημειοευαισθησία των όγκων αυτών [31]. Η επιλογή ασθενών που αναμένεται να έχουν όφελος από τη θεραπεία με βάση το βαθμό μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου της MGMT έχει προταθεί [IIB] και έχει ολοκληρωθεί η συμμετοχή ασθενών σε αντίστοιχες προοπτικές μελέτες. Το αναπλαστικό αστροκύτωμα και ολιγοαστροκύτωμα έχουν πιο παρατεταμένη κλινική πορεία. Η αξία της σύγχρονης χημειο-ΑΚΘ ή/και επικουρικής ΧΜΘ με τεμοζολομίδη δεν έχει μελετηθεί προοπτικά [V D]. Τυχαιοποιημένες μελέτες (νεο-) επικουρικής ΧΜΘ με PCV δεν έδειξαν βελτίωση της επιβίωσης σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με αναπλαστικό ολιγοαστροκύτωμα και ολιγοδενδρογλοιώμα [IB], παρά την παράταση του διαστήματος ελεύθερου πρόοδου νόσου. Επίσης, η χορήγηση ΧΜΘ πριν ή μετά την ΑΚΘ δεν επηρεάζει τη συνολική επιβίωση παρά τις καλές ανταποκρίσεις που μπορεί να παρατηρηθούν. Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη, το διάστημα από την ολοκλήρωση της θεραπείας μέχρι την υποτροπή ήταν το ίδιο σε ασθενείς που έλαβαν είτε ΧΜΘ αρχικά (και ΑΚΘ στην πρόοδο της νόσου) είτε ΑΚΘ

αρχικά (και ΧΜΘ στην πρόοδο της νόσου) (κατηγορία 2B). Επιπλέον δε φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ PCV και τεμοζολομίδης [IIIB]. Αναλυτικά, η συγκεκριμένη φάσης 3 μελέτη διαδοχικής ακτινο-ΧΜΘ τυχαιοποίησε 318 ασθενείς με αναπλαστικό γλοιώμα σε 3 σκέλη: α) ΑΚΘ, β) PCV, γ) τεμοζολομίδα. Στην πρόοδο της νόσου, οι ασθενείς του α) σκέλους έλαβαν PCV ή τεμοζολομίδα, ενώ οι ασθενείς των σκελών β) και γ) ακτινοβολήθηκαν. Οι 3 ομάδες είχαν τελικά συγκρίσιμη επιβίωση ελεύθερης προόδου και νόσου και συνολική επιβίωση [32]. Δεν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα απευθείας σύγκρισης της μετεγχειρητικής συνδυασμένης χημειο-ΑΚΘ με νιτροζουρία σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με αναπλαστικό αστροκύττωμα. Μια τέτοια μελέτη είναι σε εξέλιξη από την RTOG (RTOG 9813). Συμπερασματικά, η επικουρική χημειο-ΑΚΘ στα πλαίσια κλινικής μελέτης είναι η συνιστώμενη αντιμετώπιση για τους ασθενείς αυτούς. Ωστόσο, η χρήση της εκτός κλινικών μελετών αντιμετωπίζεται με σκεπτικισμό [III]. Μια άλλη μελέτη, η RTOG 9402, συγκρίνει την ΑΚΘ μόνη της ή μετά από εισαγωγική ΧΜΘ με PCV σε ασθενείς με αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοιώμα και απώλεια 1p19q.

Δυστυχώς, η μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενη ΧΜΘ δεν οδηγεί σε ιάσεις και οι ασθενείς με κακοήθη γλοιώματα τελικά οδηγούνται σε υποτροπή ή πρόοδο της νόσου. Κάποιο όφελος από τη ΧΜΘ έχει καταδειχθεί σε ασθενείς με καλό PS χωρίς προηγούμενη επικουρική κυτταροτοξική θεραπεία. Το αναπλαστικό αστροκύττωμα είναι πιο πιθανό να απαντήσει στη ΧΜΘ με τεμοζολομίδα σε σύγκριση με το γλοιοβλάστωμα [IIB]. Δεν υπάρχει καθιερωμένο σχήμα ΧΜΘ για ασθενείς που εμφανίζουν πρόοδο νόσου μετά την αρχική ΧΜΘ, και οι ασθενείς αυτοί εντάσσονται σε κλινικές μελέτες. Εκτός από την τεμοζολομίδα [7, 33, 34] και τις νιτροζουρίες [20] που χρησιμοποιούνται συχνά ως ΧΜΘ 2ης γραμμής ή διάσωσης, δραστικά φάρμακα θεωρούνται επιπλέον ο συνδυασμός PCV [35], η

κυκλοφωσφαμίδη [36], και οι πλατινούχοι συνδυασμοί [10]. Τα αναπλαστικά γλοιώματα μπορούν επίσης να αντιμετωπιστούν με ιρινοτεκάνη [37] ή ετοποσίδη [38].

Τυχαιοποιημένες μελέτες που χρησιμοποίησαν στοχευτικούς παράγοντες έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) όπως η ερλοτινίμη (erlotinib) ή του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PGFR) όπως η ιματινίμη (imatinib) δεν κατάφεραν να δείξουν μετρήσιμο αντικαρκινικό αποτέλεσμα σε μη επιλεγμένους ασθενείς [IIIC]. Αντίθετα, η μπεβασιζουμάμη (bevacizumab), ένας αντι-αγγειογενετικός παράγοντας, πήρε έγκριση στις ΗΠΑ ως θεραπεία του υποτροπιάζοντος γλοιοβλαστώματος βάσει των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων δύο μελετών φάσης 2. Η μελέτη AVF 3708g τυχαιοποίησε 167 ασθενείς σε μπεβασιζουμάμη με ή χωρίς ιρινοτεκάνη και οι αντικειμενικές ανταποκρίσεις με βάση την απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία (MRI) ήταν 28% και 38%, αντίστοιχα [39]. Η διάμεση επιβίωση ήταν περίπου 9 μήνες, όμοια με εκείνη μιας προηγούμενης φάσης 2 μελέτης [40]. Η μελέτη NCI 06-C-0064E κατέγραψε μια διάμεση επιβίωση της τάξης των 31 εβδομάδων σε 48 βαριά προθεραπευμένους ασθενείς [41]. Η μπεβασιζουμάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με ΧΜΘ είναι δραστική και σε αναπλαστικά γλοιώματα [42-47]. Παρά τη δραστικότητα, το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι μικρής διάρκειας και μπορεί να οφείλεται κατά κύριο λόγο σε αλλαγές στη διαπερατότητα των αγγείων. Επιπλέον, η επίδραση στο προσδώκιμο της επιβίωσης παραμένει άγνωστη [IIIC], ενώ η συγκεκριμένη θεραπεία έχει σημαντικές παρενέργειες, όπως υπέρταση, μειωμένη επούλωση τραύματος, διάτρηση εντέρου και θρομβοεμβολικά επεισόδια.

Βάσει των δεδομένων αυτών, η χορήγηση της μπεβασιζουμάμης για την υποτροπή του γλοιοβλαστώματος είναι εγκεκριμένη στις ΗΠΑ αλλά παραμένει προς το παρόν εκτός ενδείξεων στην Ευρώπη. Η επιλογή της επανεκτομής θα πρέπει να εκτιμάται [IVC] ενώ η

τοποθέτηση αργά αποδεσμευομένων πολυμερών ΧΜΘ κατά το επαναληπτικό χειρουργείο επιτρέπει οριακή παράταση της επιβίωσης σε επιλεγμένους ασθενείς [IIB].

1.1.4.4 Αρχική αντιμετώπιση

Όταν ένας ασθενής εμφανίζει κλινική και απεικονιστική εικόνα γλοιώματος υψηλής κακοήθειας, πρέπει να εκτιμάται η δυνατότητα της μέγιστης δυνατής εκτομής. Αν η διάγνωση υποστηρίζεται από διεγχειρητική ιστολογική εξέταση, η τοποθέτηση πολυμερών καρμουςτίνης (BCNU) είναι μία επιλογή [IIB]. Η έκταση της ογκομειωτικής εκτομής θα πρέπει να τεκμηριώνεται με μετεγχειρητική MRI με και χωρίς σκιαγραφικό εντός 72 ωρών από τη χειρουργική εξαίρεση. Αν η ολική εκτομή του όγκου κρίνεται επικίνδυνη, στερεοτακτική ή ανοιχτή βιοψία ή υφολική εκτομή θα πρέπει να επιχειρείται ώστε να εξασφαλιστεί η διάγνωση. Η συνεργασία πολλαπλών συναφών ειδικοτήτων (νευροχειρουργοί, παθολογοανατόμοι, ακτινολόγοι, ακτινοθεραπευτές ογκολόγοι, παθολόγοι ογκολόγοι) θα πρέπει να ενθαρρύνεται μόλις η ιστολογική έκθεση είναι διαθέσιμη [5].

1.1.4.5 Επικουρική θεραπεία

Η επιλογή της επικουρικής θεραπείας εξαρτάται από την ιστολογία του όγκου και το performance status του ασθενούς. Στο αναπλαστικό γλοίωμα, η κλασματοποιημένη ΑΚΘ είναι η ιστορικά καθιερωμένη θεραπεία για ασθενείς με καλό Karnofsky σκορ (≥ 70), αλλά οι ασθενείς με την απαισιόδη 1p19q θεωρούνται υποψήφιοι για ΧΜΘ. Η χημειο-ΑΚΘ κλινικών μελετών είναι αμφιλεγόμενη [III]. Ασθενείς με πτωχό Karnofsky σκορ (< 70), μπορούν να αντιμετωπιστούν με ΑΚΘ, ΧΜΘ [IIB], ή βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή.

Για το γλοιοβλάστωμα οι επιλογές επικουρικής θεραπείας εξαρτώνται κυρίως από το performance status του ασθενούς. Αν το KPS < 70, οι επιλογές περιλαμβάνουν: 1) ΑΚΘ 2) ΧΜΘ 3) συνδυασμένη ΧΜΘ-ΑΚΘ 4) βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή. Ασθενείς 70 ετών ή με KPS ≥ 70 αντιμετωπίζονται με ΑΚΘ και ταυτόχρονη και επικουρική ΧΜΘ με τεμοζολομίδη [1]. Ηλικιωμένοι ασθενείς (≥ 70 ετών) αλλά με KPS ≥ 70 μπορούν να λάβουν την καθιερωμένη ή υποκλασματοποιημένη ΑΚΘ με ή χωρίς τεμοζολομίδη [5].

1.1.4.6 Παρακολούθηση

Οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται με διαδοχικές MRI (στις 2-6 εβδομάδες, μετά κάθε 2-4 μήνες για 2-3 έτη, μετά λιγότερο συχνά) μετά την ολοκλήρωση της ΑΚΘ. Λόγω της επιπρόσθετης δυσλειτουργίας του ΑΕΦ που προκαλείται από την ΑΚΘ, η χρήση των κορτικοστεροειδών μπορεί να αυξηθεί, με συνοδό απεικονιστική επιδείνωση της νόσου τους πρώτους 3 μήνες μετά την ολοκλήρωση της ΑΚΘ χωρίς να υπάρχει ουσιαστικά πρόοδος της νόσου. Οι πρώτοι απεικονιστικοί έλεγχοι με MRI επιτρέπουν την τιτλοποίηση της δόσης των κορτικοστεροειδών ανάλογα με το φαινόμενο μάζας και το εγκεφαλικό οίδημα. Όψιμοι έλεγχοι χρησιμεύουν για την ανίχνευση υποτροπής. Η μαγνητική φασματοσκοπία, η MRI με τεχνικές διάχυσης και η ποζιτρονική τομογραφία (PET) χρησιμεύουν για τον αποκλεισμό της ακτινικής νέκρωσης και της «ψευδοπροόδου» [27].

1.1.4.7 Εκτίμηση της ανταπόκρισης

Η MRI είναι η απεικονιστική μέθοδος εκλογής. Η σκιαγραφική ενίσχυση και η υποτιθέμενη πρόοδος νόσου σε 4-8 εβδομάδες μετά το τέλος της ΑΚΘ μπορεί να οφείλεται σε μετακτινικές αλλοιώσεις («ψευδοπρόοδος») γι' αυτό θα πρέπει να επανεκτιμάται 4-8

εβδομάδες αργότερα με 2^η MRI. Εμφανής αύξηση στο μέγεθος του όγκου μετά το τέλος της ΑΚΘ δε θα πρέπει να οδηγεί σε διακοπή της ΧΜΘ. Η ανταπόκριση στη ΧΜΘ αξιολογείται με βάση τα κριτήρια κατά WHO, αλλά θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνει την εκτίμηση της νευρολογικής λειτουργίας και τη χρήση κορτικοστεροειδών (κριτήρια Macdonald). Η εισαγωγή των αντιαγγειογενετικών και αγγειοτροποποιητικών παραγόντων χρήζει αναθεώρησης των κριτηρίων ανταπόκρισης, με προσθήκη της έκτασης του όγκου σε ακολουθίες T2- and FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) στην εκτίμηση της σκιαγραφικής ενίσχυσης. Σε περιπτώσεις αμφίβολης διαφορικής διάγνωσης μεταξύ υποτροπής και αλλαγών επαγόμενων από τη θεραπεία, η χρήση PET με ανίχνευση αμινοξέων (π.χ. μεθειονίνη, φλουρο-αιθυλτυροσίνη) είναι βοηθητική [III, B] [3].

1.1.4.8 Υποτροπή

Η αντιμετώπιση της υποτροπής εξαρτάται από την έκταση της νόσου και την κατάσταση του ασθενούς. Για την τοπική υποτροπή εφαρμόζεται η επανεκτομή με ή χωρίς τοποθέτηση πολυμερών καρμουςτίνης στη χειρουργική κοίτη. Μετά την επανεκτομή ή εάν ο όγκος είναι ανεγχείρητος, οι ασθενείς με φτωχό PS θα πρέπει να λαμβάνουν βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή χωρίς περαιτέρω ενεργό θεραπεία. Αν το PS το επιτρέπει, ο ασθενής μπορεί να υποβληθεί σε ΧΜΘ (ιδιαίτερα για το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα). Επανακινοβόληση του όγκου έχει θέση [IIB] αν η προηγούμενη ΑΚΘ οδήγησε σε καλή/διατηρήσιμη απάντηση. Για διάσπαρτους όγκους με πολλαπλές εντοπίσεις οι επιλογές περιλαμβάνουν: 1) παρηγορητική/υποστηρικτική αγωγή σε φτωχό performance status, 2) ΧΜΘ ή 3) παρηγορητική χειρουργική εκτομή για την αντιμετώπιση του φαινομένου μάζας.

Κάποιο όφελος από τη ΧΜΘ έχει αποδειχθεί για τους ασθενείς με καλό PS που δεν έλαβαν προηγούμενη επικουρική κυτταροτοξική ΧΜΘ. Το αναπλαστικό αστροκύτωμα είναι

πιο πιθανό να απαντήσει σε ΧΜΘ με τεμοζολομίδη σε σύγκριση με το γλοιοβλάστωμα [III, B]. Για ασθενείς με επιδείνωση νόσου μετά από προηγούμενη ΧΜΘ δεν υπάρχει καθιερωμένο σχήμα και οι ασθενείς αντιμετωπίζονται στα πλαίσια κλινικών μελετών. Η μονοθεραπεία με νιτροζουρίες μπορεί να επιτύχει έλεγχο της νόσου σε μερικούς ασθενείς. Τυχαιοποιημένες μελέτες για το ρόλο της αναστολής του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) με ερλοτινίμη ή του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGFR) με ιματινίμη ήταν αρνητικές σε μη επιλεγμένους ασθενείς [II, C]. Υψηλά ποσοστά απεικονιστικών ανταποκρίσεων και μείωσης των στεροειδών παρατηρήθηκαν με τη χορήγηση μπεβασιζουμάμπης (με ή χωρίς ιρινοτεκάνη). Ωστόσο το αποτέλεσμα είναι μικρής διάρκειας και μπορεί κατά κύριο λόγο να οφείλεται σε αλλαγές στην αγγειακή διαπερατότητα, ενώ η επίδραση στο προσδόκιμο επιβίωσης παραμένει άγνωστη [III, C]. Για τους λόγους αυτούς η χρήση της μπεβασιζουμάμπης δεν είναι εγκεκριμένη στην Ευρώπη για την υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα. Η δυνατότητα της επανεκτομής θα πρέπει να αξιολογείται [IV, C], ενώ η τοποθέτηση πολυμερών BCNU μετά τη ριζική εκτομή οδηγεί σε οριακή παράταση της επιβίωσης σε επιλεγμένους ασθενείς [II, B] [5].

1.2 Μοριακή καρκινογένεση γλοιοβλαστώματος

Η οικογένεια των γλοιωμάτων αντιπροσωπεύει μια ομάδα χαμηλής και υψηλής κακοήθειας όγκων που προέρχονται από τη γλοία («κόλλα»), τον εγκεφαλικό ιστό που θεωρείται ότι έχει υποστηρικτικό ρόλο για τα νευρικά κύτταρα, παρέχοντας θρεπτικά υλικά, οξυγόνο, μηχανική στήριξη, καθοδήγηση κατά την ανάπτυξη, ανοσιακές λειτουργίες και οδό απομάκρυνσης των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού τους. Επιπλέον, τα κύτταρα της γλοίας εμπλέκονται σε πολύπλοκες διαδικασίες που περιλαμβάνουν τη διαμετάδοση

σήματος και τη νευροδιαβίβαση. Η κυτταρική προέλευση των γλοιωμάτων παραμένει άγνωστη. Μια βασική θεωρία υποστηρίζει ότι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα υφίστανται μεταβολές κατά την μεταβατική-αυξητική φάση της ανάπτυξής τους [28, 29]. Άλλα δεδομένα συγκλίνουν στην επαγόμενη από σημειακές μεταλλάξεις αποδιαφοροποίηση ώριμων κυττάρων του εγκεφάλου, όπως αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα [30].

1.2.1 Γενετική των κακοήθων γλοιωμάτων

Γενετικές αναλύσεις τα τελευταία 30 χρόνια έχουν καθορίσει τους βασικούς στόχους μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων του εγκεφάλου. Πρώιμες μελέτες αναγνώρισαν επιπλέον αντίγραφα του χρωμοσώματος 7 στα κακοήθη γλοιώματα και το 1984 αναγνωρίστηκε το ογκογονίδιο *EGFR*, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) [31]. Μέχρι το 1989, καρυοτυπικές αναλύσεις και αναλύσεις ετεροζυγωτίας καθόρισαν την εντόπιση ογκοκατασταλτικών γενετικών τόπων στα χρωμοσώματα 9, 10, και 17 [32]. Το *TP53* ογκοκατασταλτικό γονίδιο αναγνωρίστηκε ως ο κύριος παράγοντας που ευθύνεται για τις μεταλλαγές του χρωμοσώματος 17 στο γλοιοβλάστωμα, ενώ περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι το p53 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην επιτήρηση του γονιδιώματος για βλάβες του DNA και μπορεί να ελέγχει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με σκοπό την επιδιόρθωση του DNA ή να σηματοδοτεί την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας με σκοπό την εξόντωση του κατεστραμμένου κυττάρου [32]. Νεότερα δεδομένα ήρθαν στο φως το 1993 και 1997, καθώς αναγνωρίστηκε η απώλεια της έκφρασης δυο επιπλέον ογκοκατασταλτικών γονιδίων: του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p16 και της φωσφατάσης PTEN (phosphatase and tensin homolog) στα χρωμοσώματα 19 και 10, αντίστοιχα. Το p16 επιβραδύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ το PTEN είναι αρνητικός ρυθμιστής

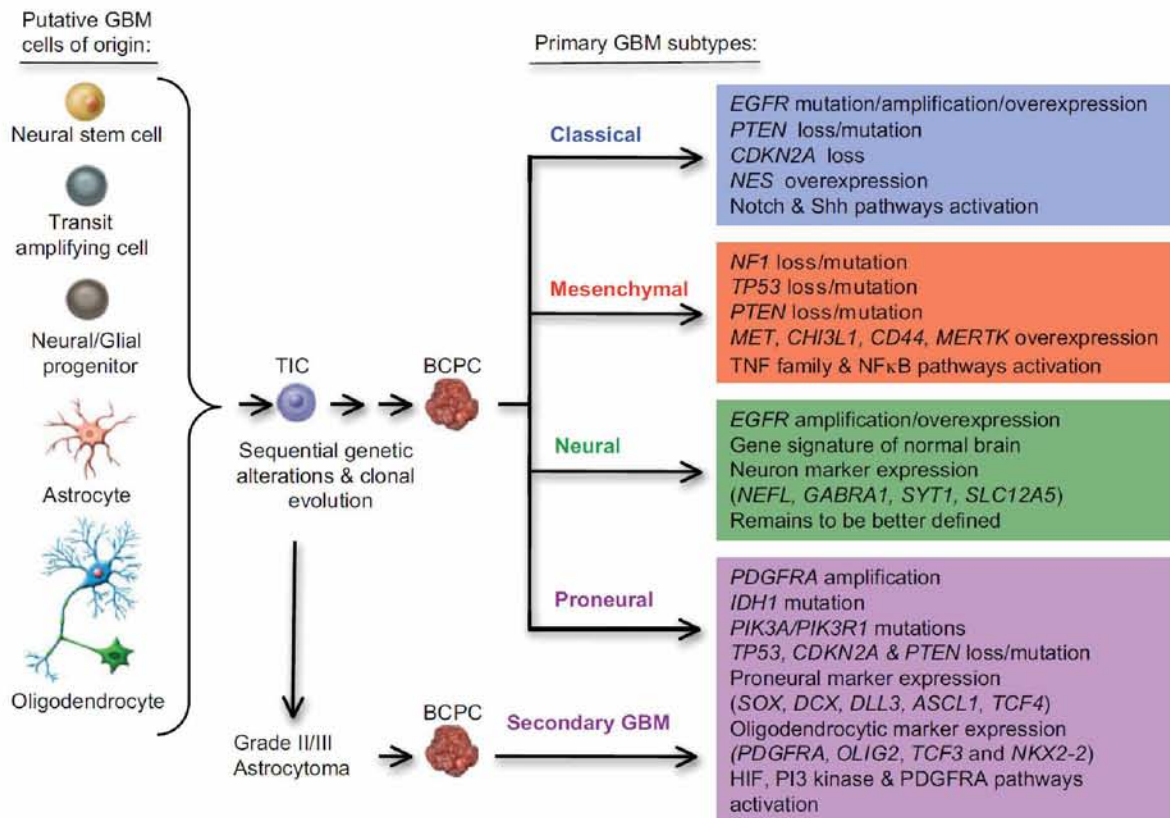
της οδού της phosphoinositide 3-kinase (PI3K), που αποτελεί το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι για την ευόδωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ως απάντηση στην έκθεση σε αυξητικούς παράγοντες [33]. Η τελευταία μεγάλη ανακάλυψη ήρθε το 2008, όπου βρέθηκε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν την ισοκιτρική αφυδρογονάση 1 (IDH1) (και σε μικρότερο βαθμό την IDH2) βρέθηκαν να είναι μεταλλαγμένα σε γλοιώματα χαμηλής κακοήθειας και σε μια υποκατηγορία γλοιοβλαστωμάτων («προνευρικός» τύπος, ως εξέλιξη από χαμηλότερης κακοήθειας όγκους) [34]. Είναι ενδιαφέρον ότι μόνο ένα αντίγραφο του γονιδίου είναι μεταλλαγμένο στους όγκους, γεγονός που συνιστά ότι οι μεταλλάξεις δεν οδηγούν σε απλή απώλεια λειτουργίας. Η μετάλλαξη είναι πολύ συγκεκριμένη και οδηγεί σε αλλαγή ενός μονήρους αμινοξέος (η αργινίνη στη θέση 132 συνήθως αντικαθίσταται από ιστιδίνη) στο ενεργό κέντρο της IDH1, ενώ το ένζυμο χάνει την ικανότητά του να καταλύει τη μετατροπή του ισοκιτρικού σε κετογλουταρικό οξύ. Προτάθηκε ότι αυτό μπορεί να έχει έμμεσο ογκογόνο αποτέλεσμα μέσω ενεργοποίησης της οδού του παράγοντα επαγόμενου από την υποξία (hypoxia-inducible factor pathway, HIF), που είναι μια κεντρική οδός για τη μεταβολική προσαρμογή των όγκων στην αναερόβια ανάπτυξη και τη νεοαγγείωση [35, 36]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το ένζυμο αποκτά μια νέα λειτουργία: τη μετατροπή της αναγνώρισης του υποστρώματος [π.χ., την ικανότητα κατάλυσης της εξαρτώμενης από nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) αναγωγής του κετογλουταρικού σε 2-υδροξυγλουταρικό (2HG)] [37]. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα επιτρέπουν την ταξινόμηση των ασθενών με βάση μοριακά κριτήρια συμπληρωματικά της κλασικής ιστοπαθολογικής ταξινόμησης.

1.2.2 Μοριακή ταξινόμηση γλοιοβλαστώματος

Η διάγνωση των όγκων εγκεφάλου στηρίζεται στην πλήρη ιστοπαθολογική εξέταση η οποία επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών βαθμών διαφοροποίησης (grades) για κάθε ιστολογικό υπότυπο, όπως το αστροκύτωμα, που έχουν προγνωστική αξία ως προς την κλινική έκβαση. Ωστόσο είναι εμφανές από γενετικές και κλινικές αναλύσεις ότι υπάρχουν υποομάδες ασθενών σε κάθε grade. Γενετικές αναλύσεις ευρείας κλίμακας στο γλοιοβλάστωμα έδειξαν ότι το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης αντανακλά τη μοριακή βιολογία του όγκου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ιστολογικής ταξινόμησης (π.χ. ως ένας έμμεσος δείκτης του βαθμού διαφοροποίησης), της κλινικής έκβασης και της ανταπόκρισης στη θεραπεία [38]. Ένα επιπλέον συμπέρασμα αυτών των γενετικών αναλύσεων είναι ότι κάθε όγκος έχει μοναδικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης και συνεπώς βιολογικό υπόβαθρο, γεγονός που επιτείνει την ανάγκη εξατομίκευσης της θεραπείας. Η δυνατότητα ταξινόμησης των μοριακών δεδομένων σε μοριακούς υποτύπους που καθορίζονται από την υπερ- ή υπο-έκφραση συνδυασμού γονιδίων θα επιτρέψει την παραγωγή περισσότερο ομοιογενών ανταποκρίσεων των υποομάδων των ασθενών στους θεραπευτικούς χειρισμούς. Επιπλέον, καθιστά δυνατή την επιλογή μιας συγκεκριμένης θεραπείας για συγκεκριμένη υποομάδα ασθενών με βάση την κοινή βιολογία της νόσου και τον έλεγχο της δράσης της σε κλινικές μελέτες. Αυτό αποτελεί μεγάλη πρόοδο, διότι αποτελέσματα παλιότερων μελετών παρέβλεψαν δυνητικά δραστικές θεραπείες λόγω μεγάλης ετερογένειας των ασθενών που συμπεριέλαβαν, σε μοριακό επίπεδο.

Το γλοιοβλάστωμα είναι από τους πρώτους κακοήθεις όγκους που χαρτογραφήθηκαν στον άτλαντα του γονιδιώματος του καρκίνου [The Cancer Genome Atlas (TCGA)], μια γιγαντιαία προσπάθεια των μεγαλύτερων ογκολογικών κέντρων των ΗΠΑ που συνέλεξαν κεντρικά 500 δείγματα γλοιοβλαστώματος τα οποία υποβλήθηκαν σε πολλαπλές

γενετικές αναλύσεις σε επίπεδο DNA (αριθμός αντιγράφων γονιδίων, sequencing, επιγενετική μεθυλίωση), mRNA (προφίλ γονιδιακής έκφρασης), και micro-RNA (μικρά RNA που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση) [39]. Οι μέχρι τώρα ενδείξεις από τις αναλύσεις αυτές συνηγορούν υπέρ της διάκρισης του γλοιοβλαστώματος σε τέσσερις συγκεκριμένους υποτύπους (Εικόνα 1.2.2.1) [32, 40].



Εικόνα 1.2.2.1 Γενετικές μεταβολές κατά την παθογένεση των υποτύπων γλοιοβλαστώματος [40].

Ο πρώτος υπότυπος έχει προφίλ χαρακτηριστικό ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και ονομάστηκε «κλασσικός». Οι όγκοι αυτής της υποομάδας έχουν καθολικά προσθήκες στο χρωμόσωμα 7, που συνοδεύονται από απώλειες στο χρωμόσωμα 10 (93%) και συχνά εστιακές απώλειες στο τμήμα του χρωμόσωματος 9p21.3 (95%). Αυτές οι χρωμοσωμικές μεταβολές οδηγούν σε υπερέκφραση του *EGFR* γονιδίου (στις μισές περιπτώσεις με γενετικό ανασυνδυασμό) και σε απώλεια των γενετικών τόπων των

γονιδίων *PTEN* και *CDKN2A*. Μεταβολές στα γονίδια *TP53*, *NF1*, *PDGFRA*, ή *IDH1* είναι σχεδόν πλήρως απύσες. Το κλασσικό γλοιοβλάστωμα ανταποκρίνεται στην κλασσική ΑΚΘ και ΧΜΘ, πιθανώς διότι η μεσολαβούμενη από το p53 κυτταρική απάντηση στη βλάβη του DNA είναι ενεργός και ανεπηρέαστη σ' αυτούς τους ασθενείς. Τέτοιοι όγκοι μπορούν επίσης να ανταποκριθούν σε αναστολείς Mdm2, που είναι ο αρνητικός ρυθμιστής του p53. Σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, ο κλασσικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση των σηματοδοτικών οδών του neural precursor and stem cell marker (*NES*), του Notch (*NOTCH3*, *JAG1*, and *LFNG*) και του Sonic hedgehog (*SMO*, *GAS1*, and *GLI2*) [32].

Ο δεύτερος υπότυπος καθορίζεται από ένα προφίλ έκφρασης που σχετίζεται με το μεσέγγυμα και την αγγειογένεση και περιλαμβάνει την υπερέκφραση των γονιδίων *CHI3L1/YKL40* και *MET*, καθώς και των αστροκυτταρικών δεικτών *CD44* και *MERTK*, και των γονιδίων που ανήκουν στις οικογένειες των *TNF* και *NFκB*, αντίστοιχα. Αυτός ο υπότυπος ονομάζεται «μεσεγγυματικός» και παρουσιάζει συχνά απενεργοποίηση των γονιδίων *NF1* (37%), *TP53* (32%), και *PTEN* (32%). Αυτοί οι όγκοι ανταποκρίνονται σε επιθετική χημειο-ΑΚΘ και πιθανώς να είναι ευαίσθητοι σε αναστολείς των *Ras*, *PI3K*, και της αγγειογένεσης.

Ένας τρίτος υπότυπος, ο «προνευρικός» έχει προφίλ έκφρασης που θυμίζει την ενεργοποίηση γονιδίων κατά την ανάπτυξη των νευρώνων. Αυτό περιλαμβάνει ένα υψηλό επίπεδο έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αναπτυξιακή διαδικασία των ολιγοδενδροκυττάρων (*PDGFRA*, *OLIG2*, *TCF3*, and *NKX2-2*) και προνευρικών κυττάρων (*SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1*, and *TCF4*). Σ' αυτή την ομάδα οι ασθενείς είναι νεότεροι και η υπερέκφραση ή ενίσχυση/μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα α του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων [platelet-derived growth factor receptor-α (*PDGFRA*)] καθώς και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* (30% των περιπτώσεων) χαρακτηρίζουν τη μοριακή υπογραφή του συγκεκριμένου υποτύπου. Συχνά παρατηρούνται επίσης μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53* (54%) και *PIK3CA/PIK3R1* (19%), ενώ η ενίσχυση του

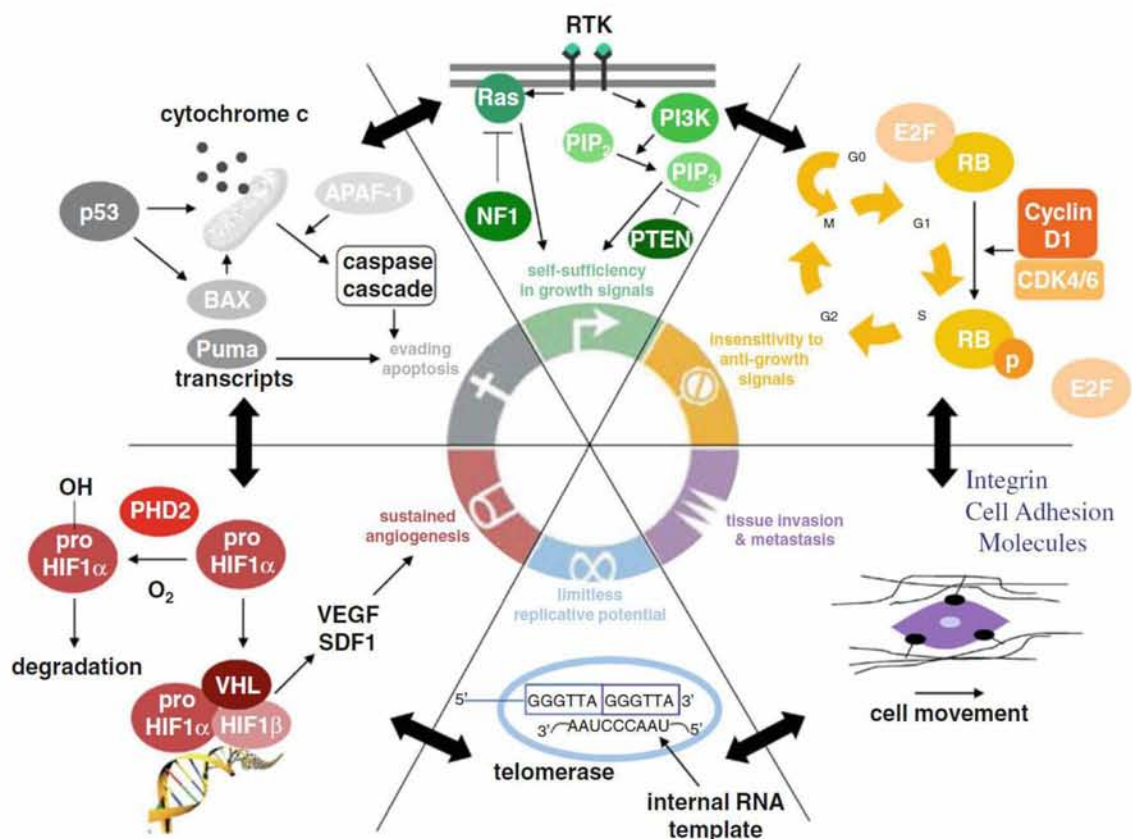
χρωμοσώματος 7 και η απώλεια στο χρωμόσωμα 10 είναι σημαντικά αλλά λιγότερο συχνά ευρήματα σε σύγκριση με τον «κλασικό» υπότυπο. Η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια IDH1/2 σε γλοιώματα χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας πιθανότατα εμπλέκει το δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα σ' αυτό τον υπότυπο [32, 34]. Αυτός ο υπότυπος ανταποκρίνεται περισσότερο σε αναστολείς των οδών HIF, PI3K, και PDGFRA. Η επιβίωση είναι λίγο μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υπόλοιπους 3 υποτύπους, ωστόσο οι όγκοι αυτοί έχουν τη μικρότερη ανταπόκριση σε επιθετική κλασική θεραπεία.

Ο τέταρτος υπότυπος, ο «νευρικός» είναι λιγότερο αυστηρά καθορισμένος και η γονιδιακή του υπογραφή είναι παρόμοια με αυτή του φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού, με ενεργοποίηση νευρωνικών δεικτών όπως NEFL, GABRA1, SYT1, και SLC12A5. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν μικρό βαθμό διήθησης από φυσιολογικά κύτταρα, ενώ το μοριακό τους προφίλ υποδηλώνει την παρουσία κυττάρων με διαφοροποιημένο φαινότυπο.

Η σύγκριση των μοριακών προτύπων των 4 υποτύπων γλοιοβλαστώματος με τα αντίστοιχα από καλλιέργειες αστροκυττάρων, ολιγοδενδροκυττάρων, νευρώνων και μικρογλοίας συνιστά ότι οι υπότυποι αυτοί αντιπροσωπεύουν κυτταρικούς πληθυσμούς διαφορετικής προέλευσης [32]. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η παραπάνω μοριακή ταξινόμηση μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμη στον καθορισμό των καλύτερων μοριακών στόχων σε κάθε ομάδα, η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών οδών του p53 (70%) και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) (68-80%) είναι συχνή σε όλους τους υποτύπους και συνεπάγεται ενεργοποίηση των αυξητικών οδών σηματοδότησης με υποδοχείς τυροσινικών κινασών [39].

Οι μεταλλάξεις που αναδείχθηκαν από το TCGA αφορούν σε μέλη οδών ή/και δικτύων μοριακής σηματοδότησης που καλύπτουν όλα τα χαρακτηριστικά του καρκινικού φαινοτύπου, όπως έχει περιγραφεί από τους Hanahan και Weinberg και συνοψίζονται σε αναστολή της απόπτωσης, αυτο-επάρκεια σε σήματα αύξησης, απευαισθητοποίηση σε

σήματα αναστολής της αύξησης, ικανότητα διήθησης και μετάστασης, ανεξάντλητο δυναμικό πολλαπλασιασμού και νεο-αγγειογένεση (Εικόνα 1.2.2.2) [41].



Εικόνα 1.2.2.2 Μεταλλάξεις οδών και φαινότυπος του καρκίνου στο γλοιοβλάστωμα [41].

Συνεπώς, σε αντίθεση με την παλαιότερη άποψη της παθογένεσης του γλοιοβλαστώματος σε ένα γραμμικό μοντέλο εξέλιξης από διαδοχική συσσώρευση μεταλλάξεων, από τα δεδομένα του TCGA προκύπτει ότι πολλαπλές οδοί συμμετέχουν ως απάντηση στην εκλεκτική πίεση από το περιβάλλον του όγκου ώστε να αποκτήσει τελικά τα χαρακτηριστικά του καρκινικού φαινοτύπου [41].

Η αλληλεπίδραση του όγκου με το μικροπεριβάλλον και η κλωνική ετερογένεια που τον χαρακτηρίζει είναι δύο επιπλέον χαρακτηριστικά που ωστόσο περιορίζουν την πλήρη και πιστή αντυπροσώπηση της βιολογίας του γλοιοβλαστώματος από το προφίλ γονιδιακής έκφρασης που διαθέτει [42, 43]. Επιπλέον, η ύπαρξη και άλλων μελετών ανάλυσης του

γενετικού προφίλ στο γλοιοβλάστωμα με διαφορές στη συλλογή δειγμάτων, στη μεθοδολογία και στην ερμηνεία με τη χρήση βιοπληροφορικής καθιστά δυσχερή την ερμηνεία όλων των δεδομένων υπό ένα πρίσμα [32, 44-47]. Φαίνεται ότι ο «προνευρικός» και ο «μεσεγγυματικός» υπότυπος αποτελούν τους δύο πόλους στο φάσμα της μοριακής βιολογίας του γλοιοβλαστώματος [32, 44, 47]. Ωστόσο, παραμένει υπό διερεύνηση κατά πόσο οι υπόλοιποι υπότυποι έχουν πραγματικά ξεχωριστό βιολογικό υπόβαθρο ή αποτελούν μια διαβάθμιση των φαινοτύπων μεταξύ των δύο πόλων [41].

Ως προς την κυτταρική προέλευση των διαφορετικών υποτύπων με βάση τις γονιδιακές υπογραφές, επίσης υπάρχει ασυμφωνία για το αν πρόκειται για τον ίδιο κυτταρικό τύπο με διαφορετική έκφραση σηματοδοτικών οδών ή αν οι ίδιες οδοί ενεργοποιούνται σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς ή αν συγκεκριμένες μεταλλάξεις φρενάρουν τα κύτταρα σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης που οδηγούν στην ογκογένεση με συγκεκριμένες μοριακές μεταβολές [41]. Αφετέρου, παρατήθηκε ότι μέσα στον πληθυσμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος υπάρχει ένας υποπληθυσμός με ικανότητα αυτό-ανανέωσης που ονομάστηκαν TICs (tumors-initiating cells) [48, 49]. Οι πολλές λειτουργικές ομοιότητες των TICs με τα νευρικά βλαστικά κύτταρα οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα TICs προέρχονται από τα βλαστικά κύτταρα [50]. Ωστόσο, ο ορισμός των TICs παραμένει λειτουργικός, καθώς δεν υπάρχει καθολική αποδοχή των προτεινόμενων μοριακών δεικτών επιφανείας (CD133, L1CAM, CD15, A2B5, ιντεγκρίνη α6), αλλά εξαρτάται από την ικανότητα ενός καρκινικού κυττάρου να αυτο-ανανεώνεται και να οδηγεί σε ανάπτυξη γλοιοβλαστώματος μετά από μεταμόσχευση σε ανοσοκατασταλμένα πειραματόζωα [51]. Συνεπώς, μένει να διευκρινιστεί εάν το αρχικό κύτταρο είναι πολυδύναμο βλαστικό ή περισσότερο διαφοροποιημένο αρχέγονο ή και τα δύο [12].

1.2.3 Το μικροπεριβάλλον του γλοιοματικού όγκου

Η εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος δε θα μπορούσε, τουλάχιστον εν μέρει, να πραγματοποιηθεί χωρίς την επικοινωνία – ανταλλαγή σηματοδότησης μεταξύ των διακριτών υποπληθυσμών νεοπλασματικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος, τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση και εξέλιξη της νεοπλασματικής εξεργασίας και πιθανότατα και στην λειτουργική εξειδίκευσή της [42]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση του EGFRvIII, παραλλαγή του EGFR που προκύπτει περίπου στο 20% των περιπτώσεων γλοιοβλαστώματος από διαγραφή των εξωνίων 2-7, και οδηγεί σε υπερέκφραση του EGFR και χειρότερη πρόγνωση [52, 53]. Ο μοριακός μηχανισμός που εξηγεί αυτή την αυξημένη επιθετικότητα του γλοιοβλαστώματος με υπερέκφραση του EGFRvIII περιλαμβάνει τη μεσολαβούμενη από τον EGFRvIII υπερέκφραση των διαλυτών κυτταροκινών ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και leukemia inhibitory factor, οι οποίες ενεργοποιούν τον EGFR στα υπόλοιπα κύτταρα του όγκου μέσω φωσφορύλιωσης της γλυκοπρωτεΐνης gp130 (Εικόνα 3) [54].

Σε ότι αφορά τα μη νεοπλασματικά κύτταρα που διευκολύνουν την πρόοδο του νεοπλασματικού όγκου, γενικά μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: στα ενδοθηλιακά ή προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, στους ινοβλάστες και στα κύτταρα της ανοσιακής λειτουργίας [51]. Ο σχηματισμός νέων αγγείων από τα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα επάγεται από τον εκκρινόμενο από τα καρκινικά κύτταρα VEGF [55]. Εναλλακτικά, μπορεί να στρατολογηθούν προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα από την αιματική κυκλοφορία [56]. Ένας τρίτος μηχανισμός αφορά τη διαφοροποίηση των ίδιων των TICs σε ενδοθηλιακά κύτταρα [57]. Οι ινοβλάστες που βρίσκονται εγγύς των καρκινικών κυττάρων «επαναπρογραμματίζονται» σε υπερέκφραση οδών σηματοδότησης που προωθούν και διατηρούν την ανάπτυξη ενός πιο επιθετικού φαινοτύπου, είτε μέσω άμεσης κυτταρικής

αλληλεπίδρασης με τα καρκινικά κύτταρα είτε μέσω κυτταροκινών [58]. Τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος έχουν επιπλέον αναπτύξει μηχανισμούς που τους επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση και καταστολή. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν απελευθέρωση ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών όπως IL-10, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, transforming growth factor β (TGF- β), ή έκφραση μορίων επιφανείας που διευκολύνουν την ανοσοκαταστολή, όπως B7-H1 [59-61]. Η απώλεια της ογκοκατασταλτικής φωσφατάσης PTEN λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την ογκογένεση παίζει κεντρικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία καθώς είναι αρνητικός ρυθμιστής των IL-10 B7-H1 [61]. Οι μεταβολές αυτές οδηγούν με τη σειρά τους στην επαγωγή των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (Tregs), στην καταστολή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με συνοδό απώλεια της λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων ή των υποδοχέων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας I (MHC I) [62, 63]. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συμβάλουν στη δημιουργία ενός εχθρικού μικροπεριβάλλοντος που καταστέλλει την ικανότητα του ανοσιακού συστήματος, ιδιαίτερα των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων που διαπερνούν τον ΑΕΦ, να εκριζώσουν τον όγκο [64].

1.2.4 Επιγενετική ρύθμιση του γλοιοβλαστώματος

Ο όρος «επιγενετική ρύθμιση» περιγράφει το φαινόμενο κατά το οποίο κληρονομήσιμες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων συμβαίνουν απουσία αλλαγών στις αλληλουχίες του DNA που κωδικοποιούν λειτουργικά γονίδια. Ο μηχανισμός στον οποίο στηρίζεται περιλαμβάνει μεθυλίωση βάσεων κυτοσίνης ή μεταβολές των ιστονών που τροποποιούν την προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στους εκκινητές γονιδίων [65]. Η μεθυλίωση τυπικά συμβαίνει μέσα σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κυτοσίνης-γουανίνης (νησίδες CpG) εκκινητών και οδηγεί σε μεταγραφική αποσιώπηση των

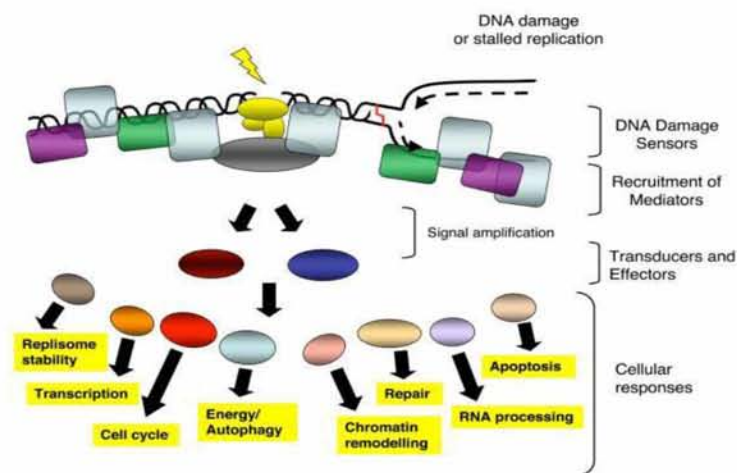
αντίστοιχων γονιδίων [65]. Στο γλοιοβλάστωμα δύο είναι οι βασικοί τύποι μεθυλίωσης εκκινήτη με κλινική σημασία: ο φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδων CpG (glioma-CpG island methylator, G-CIMP) και η μεθυλίωση του εκκινήτη ενός γονιδίου, η έκφραση του οποίου εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, της μεθυλοτρανσφεράσης της μεθυλογουανίνης (MGMT).

Ο φαινότυπος G-CIMP παρατηρείται σε μια υποομάδα γλοιοβλαστωμάτων με μεθυλίωση νησίδων CpG σε πολλαπλές περιοχές του γονιδιώματος και συνεπάγεται αποσιώπηση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου [66]. Συνεπώς οι όγκοι με φαινότυπο G-CIMP τείνουν να έχουν λιγότερο κακοήθη συμπεριφορά και οι αντίστοιχοι ασθενείς έχουν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση [66].

Η MGMT κωδικοποιεί ένα ένζυμο που αφαιρεί τα σύμπλοκα αλκυλίων στη θέση O6 της γουανίνης [67]. Επειδή η αλκυλίωση σ' αυτή τη θέση είναι ιδιαίτερα τοξική και συνιστά τον κύριο μηχανισμό για την κυτταροτοξική δράση της τεμοζολομίδης (TMZ), τα επίπεδα έκφρασης της MGMT σχετίζονται με την ανταπόκριση των ασθενών στην TMZ [68]. Οι νησίδες CpG στο ανθρώπινο γονίδιο της MGMT εκτείνονται σε περίπου 1000 βάσεις γύρω από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, εκ των οποίων 108 είναι μεθυλιωμένες [69] και σχετίζονται με μεταγραφική αποσιώπηση της MGMT [70]. Η κλινική σημασία της μη έκφρασης της MGMT έγκειται στη βελτιωμένη έκβαση τόσο των ασθενών που λαμβάνουν TMZ (προβλεπτική αξία) όσο και των ασθενών που δε λαμβάνουν TMZ (προγνωστική αξία) [71, 72]. Φαίνεται ότι η MGMT συμμετέχει, εκτός από την επιδιόρθωση του DNA μετά από έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες, και στην «αποτοξίνωση» από συσσώρευση βλαβών του DNA ενδογενώς, επιτρέποντας έτσι την ταχύτερη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, η οποία μπορεί να μεταφράζεται σε μικρότερη επιβίωση των ασθενών [73].

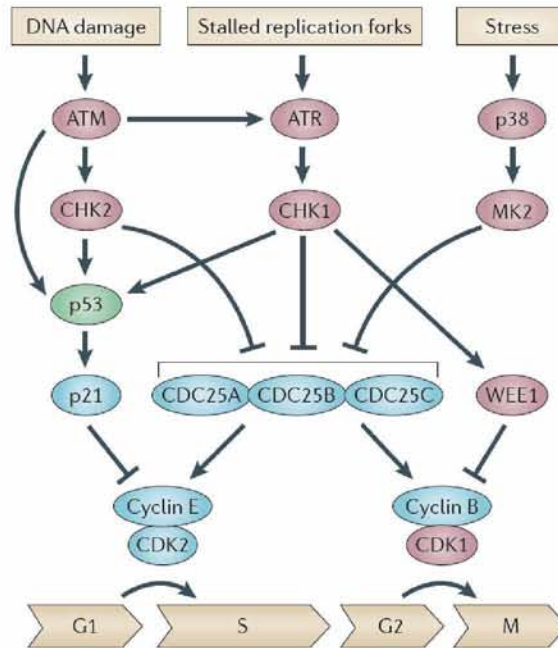
1.3 Η κυτταρική απάντηση στη βλάβη του DNA

Υπάρχουν διάφοροι τύποι βλαβών του DNA όπως αναντιστοιχίες ζευγών βάσεων, σπάσιμο της έλικας, απώλεια βάσεων, ογκώδη σύμπλοκα, και διασταυρώσεις. Η προσβολή της ακεραιότητας του DNA μπορεί να προέρχεται είτε ενδογενώς από απαμίνωση ή υδρόλυση είτε εξωγενώς από έκθεση σε ιοντίζουσα ή υπεριώδη ακτινοβολία, ή χημικούς παράγοντες [74]. Η απάντηση στη βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR) αποτελεί, σε κυτταρικό επίπεδο, μια «ενορχηστρωμένη» προσπάθεια ανίχνευσης, και σηματοδότησης για επιδιόρθωση των βλαβών του DNA που είναι απαραίτητη για την επιβίωση [75]. Η DDR αναφέρεται ουσιαστικά σε όλους τους «καταρράκτες» μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τη βλάβη του DNA και συντονίζουν την επιδιόρθωση του DNA, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου ώστε να διευκολύνουν την αξιόπιστη αντιγραφή του γενετικού υλικού μετά τη βλάβη. Η διαδικασία ξεκινά με την αναγνώριση της βλάβης από ειδικές πρωτεΐνες-ανιχνευτές, οι οποίες με τη σειρά τους στρατολογούν ή/και ενεργοποιούν «αισθητήριες» πρωτεΐνες που μεταδίδουν το σήμα στις «εκτελεστικές» πρωτεΐνες που ευθύνονται για τις κυτταρικές «απαντήσεις» με τη μορφή διακοπής του κυτταρικού κύκλου, απόπτωσης, μεταγραφής και επιδιόρθωσης του DNA (Εικόνα 1.3.1) [75, 76].



Εικόνα 1.3.1 Μοντέλο απάντησης στη βλάβη του DNA [75].

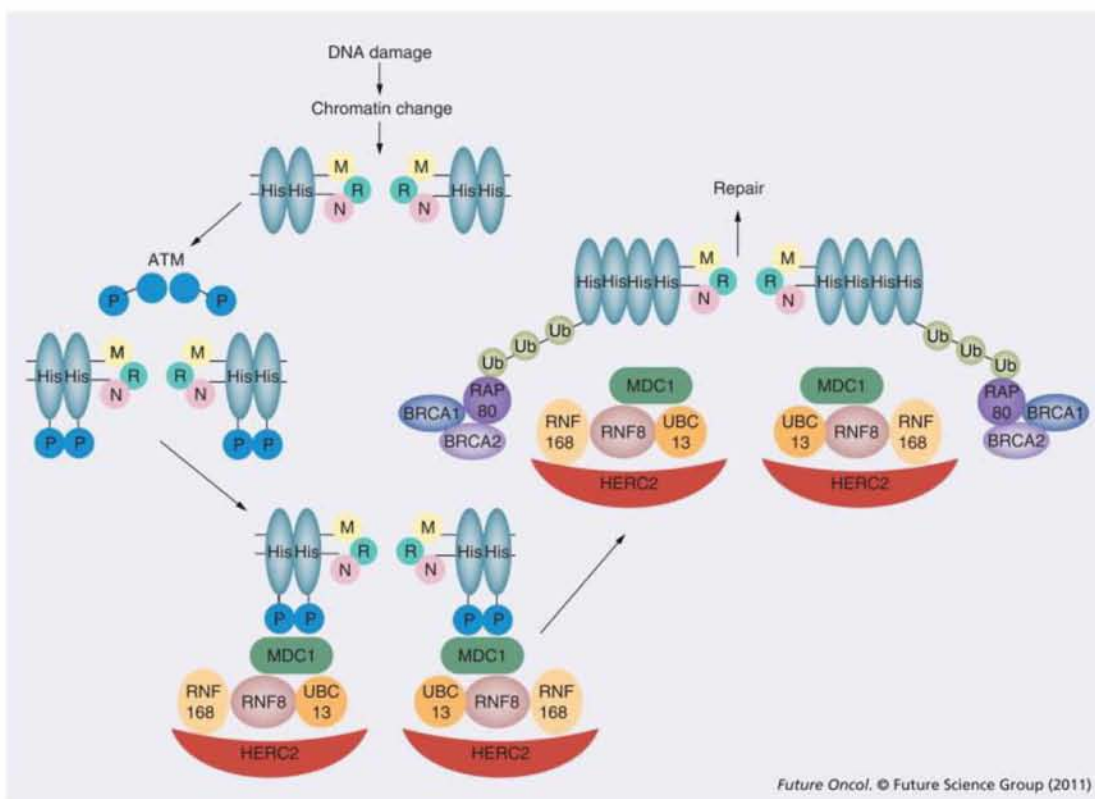
Μετά τη βλάβη του DNA, οι πρωτεϊνικές κινάσες ATM και ATR ξεκινούν ένα καταρράκτη μοριακών γεγονότων που οδηγούν σε ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G1/S και G2/M και επιδιόρθωση του DNA [77]. Δεδομένης της συχνής λειτουργικής απενεργοποίησης του p53 σε πολλούς κακοήθεις όγκους, και της επακόλουθης διαταραχής του σημείου ελέγχου G1/S, η ακεραιότητα του έτερου σημείου ελέγχου G2/M είναι κριτικής σημασίας για τη μοίρα του κυττάρου (Εικόνα 1.3.2) [77, 78].



Εικόνα 1.3.2 Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου μετά τη βλάβη του DNA [78].

Μετά τη βλάβη, οι ασυνέχειες στην έλικα του DNA οδηγούν σε αλλαγές στην τοπολογία του DNA λόγω ακετυλίωσης των ιστονών και φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών της χρωματίνης [79]. Το «σπάσιμο» της έλικας που αποκαλύπτεται αναγνωρίζεται από το σύμπλεγμα Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), το οποίο έχει διπλή δράση ως εξωνουκλεάση/ενδονουλεάση για την επεξεργασία του σημείου διπλού σπασίματος του DNA σε ουρές μονών αλυσίδων και μέσω της στρατολόγησης της σηματοδοτικής πρωτεϊνικής κινάσης ATM στο σημείο του διπλού σπασίματος [80]. Στο σημείο της βλάβης,

το ανενεργό διμερές της ATM αυτοφωσφορυλιώνεται και η ενεργοποιημένη ATM φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2AX γύρω από την περιοχή που περιβάλλει την βλάβη [81, 82]. Η φωσφορυλιωμένη H2AX (γνωστή και ως γ -H2AX) στρατολογεί την πρωτεΐνη MDC1, η οποία λειτουργεί ως σκελετός για τη σύνδεση του συμπλέγματος E3 λιγκάσης ουβικουΐτινης, UBC13-RNF8 που χρησιμεύει για την προσθήκη ουβικουΐτινης στην H2AX [6, 75]. Μια δεύτερη λιγκάση ουβικουΐτινης, η RNF168 στρατολογείται στο σημείο της βλάβης μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες HERC2 και RNF8 [51]. Η πολυουβικουΐτινωση αλλάζει τοπικά τη δομή της χρωματίνης, προφέροντας δυνατότητα σύνδεσης με την πρωτεΐνη RAP80, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με το σύμπλεγμα BRCA1-BRCA2-RAD51 [83]. Έτσι ξεκινά η επιδιόρθωση του διπλού σπασίματος του DNA καθώς και η διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω ενεργοποίησης του σημείου ελέγχου της βλάβης του DNA (Εικόνα 1.3.3) [84].

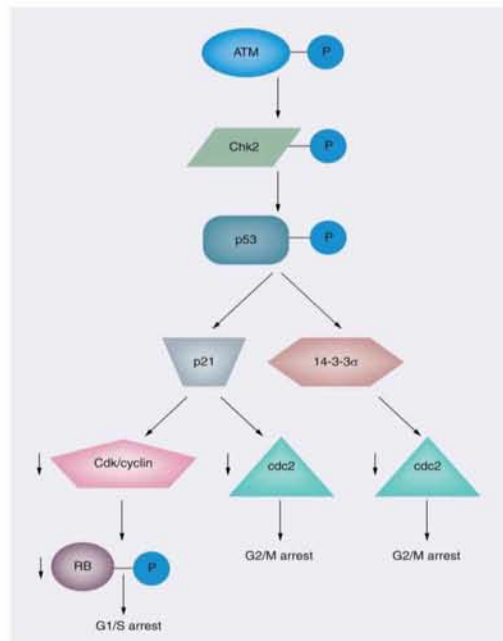


Εικόνα 1.3.3 Μοριακοί μηχανισμοί απάντησης στη βλάβη του DNA [84].

1.3.1 Μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου

Εκτός από τη συνάθροιση των συμπλεγμάτων επιδιορθωτικών πρωτεϊνών του DNA, η σηματοδότηση της βλάβης του DNA αφορά επίσης πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όπως το σύμπλεγμα κινάσης εξαρτώμενης από κυκλίνη (cyclin-dependent kinase, CDK)-κυκλίνης. Το μεγαλύτερο μέρος των οδών σηματοδότησης που αφορά τη διαδικασία μεταγωγής σημάτων λόγω της βλάβης του DNA περιλαμβάνει καταρράκτες φωσφορυλίωσης καθώς και άλλους τύπους αντιστρεπτών μεταβολών, όπως ουβικουιτίνωση και σουμοιλίωση [85]. Η ενεργοποιημένη κινάση ATM φωσφορυλιώνει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και την κινάση Chk2, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες p53 και MDM2. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η σταθεροποίηση του p53 μέσω διακοπής της σύνδεσής της με τον MDM2, που φυσιολογικά στοχεύει τον p53 προς αποδόμηση [41]. Ο ενεργοποιημένος p53 επάγει στη συνέχεια τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του, συμπεριλαμβανομένου και του p21. Η πρόσδεση του p21 στα συμπλέγματα CDK-κυκλίνης της φάσης G1-S του κυτταρικού κύκλου προλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb), η οποία σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό απομονώνοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F και προλαμβάνοντας τη μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για την πρόοδο του κύκλου από τις φάσεις G1 και S [86]. Αλλά και στο σημείο ελέγχου G2-M του κύκλου, η ενεργοποίηση του ATM οδηγεί σε επαγόμενη από το p53 μεταγραφή του p21 και του 14-3-3σ. Η πρωτεΐνη 14-3-3σ απομονώνει το σύμπλεγμα κυκλίνης B-κινάσης cdc2 στο κυτταρόπλασμα και προλαμβάνει τις αντιδράσεις φωσφορυλίωσης στον πυρήνα που απαιτούνται για την πρόοδο από τη φάση G2/M [87]. Επιπλέον, ο p21 προσδέεται στο υπολειμματικό cdc2 που εισέρχεται στον πυρήνα προλαμβάνοντας την ενεργοποίησή του. Έτσι το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στις

φάσεις G1-S και G2-M παρέχει χρόνο για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA (Εικόνα 8) [88].



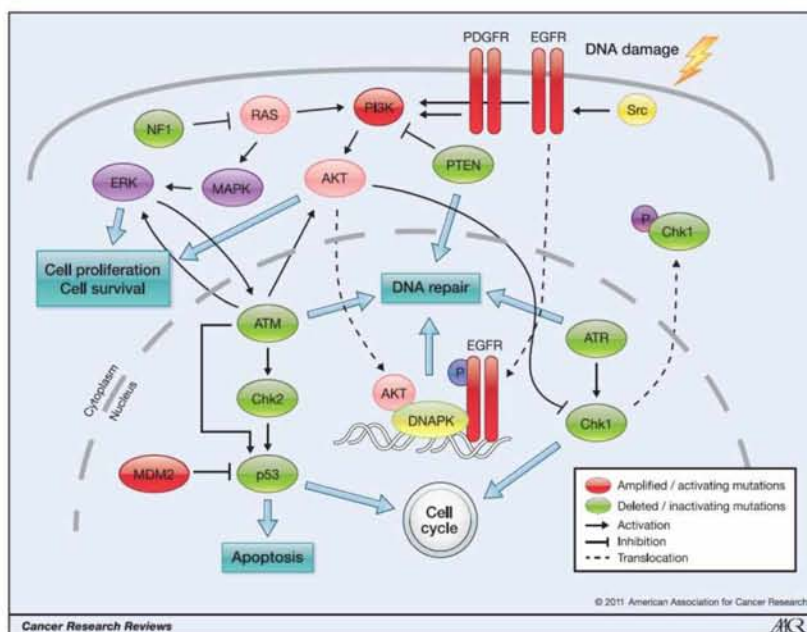
Εικόνα 1.3.1.1 Ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μετά τη βλάβη του DNA [84].

Ανάλογο ρόλο με την ATM στη σηματοδότηση της βλάβης έχει και η πρωτεΐνη ATR, η οποία ενεργοποιείται από «σπασίματα» μονής έλικας του DNA [89]. Η σηματοδότηση μέσω των κινασών ATM και ATR, εκτός από την αναστολή της δράσης των CDKs, ενισχύει την επιδιόρθωση του DNA μέσω μεταγραφικής επαγωγής ή/και μετα-μεταφραστικής τροποποίησης επιδιορθωτικών πρωτεϊνών, στρατολόγησής τους στο σημείο της βλάβης, και ενεργοποίησής τους με φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, ουβικουιτίνωση ή σουμολίωση [6]. Την επιτυχή επιδιόρθωση του DNA ακολουθεί η απενεργοποίηση του DDR, ενώ σε αδυναμία επιδιόρθωσης της βλάβης η σηματοδότηση καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο ή γήρανση (μόνιμη έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο) [90].

Ανάμεσα στη βλάβη του DNA και στον καρκίνο υπάρχει μια στενή σύνδεση που προέρχεται στα αρχικά στάδια από τη γενετική αστάθεια και το στρες αναδιπλασιαμού του

DNA λόγω της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων και απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που αποτελεί εγγενές χαρακτηριστικό του, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια από την υποξία [91, 92]. Η απενεργοποίηση του DDR με μεταλλάξεις ή επιγενετική απενεργοποίηση είναι κριτικής σημασίας για την επιλογή κλώνων που επιτρέπουν την εξέλιξη του καρκίνου. Από την άλλη πλευρά, οι κυριότερες αντικαρκινικές θεραπείες (ΑΚΘ, ΧΜΘ) λειτουργούν μέσω επαγωγής βλάβης στο DNA και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσής του αποτελούν ένα συνήθη μηχανισμό αντίστασης στη θεραπεία.

Για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα η ακεραιότητα των μηχανισμών DDR είναι ιδιαίτερα σημαντική. Πρώτον, η καθιερωμένη αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος περιλαμβάνει συνδυασμό ΑΚΘ και ΧΜΘ με TMZ με κύριο μηχανισμό δράσης την αλκυλίωση του DNA και τη δημιουργία σπασίματος στη διπλή έλικα. Δεύτερον, η αντίσταση στις θεραπείες αυτές είναι χαρακτηριστική ιδιότητα του γλοιοβλαστώματος και υπαγορεύει τη μειωμένη απάντηση στη θεραπεία [48]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μέλη των οδών ATM/Chk2 και ATR/Chk1 υπόκεινται συχνά σε απώλεια του αριθμού των αντιγράφων τους σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, με συχνότερη την ετερόζυγη απώλεια του CHEK2 (περίπου στο 20% των περιπτώσεων) (Εικόνα 9) [93, 94].



Επιπλέον, η απώλεια γονιδίων των οποίων η έκφραση είναι κριτικής σημασίας για την καταστολή των γλοιωμάτων, όπως των ATM, Chk2, p53, όχι μόνο επιταχύνει την ανάπτυξη αυτών των όγκων αλλά αυξάνει και τη συχνότητα εμφάνισης επιθετικών, υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκων (γλοιοβλαστωμάτων). Η απαλοιφή του Chk2 οδηγεί σε ελλείματα στους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης, που αποτρέπουν το όφελος από την ΑΚΘ. Αντίθετα, η αναστολή της κινάσης ATM (που είναι ενεργοποιητής της Chk2) οδηγεί σε ακτινοευαισθητοποίηση των γλοιωμάτων *in vitro*, μειώνοντας τόσο την επιδιόρθωση του DNA όσο και τον επαγόμενο από τις κινάσες AKT και ERK (extracellular signal regulated kinase) κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διήθηση [95, 96]. Η λειτουργικότητα του p53 επηρεάζει αυτή την απάντηση, με τους p53-λειτουργικούς όγκους να είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε σύγκριση με τους όγκους με μεταλλάξεις του p53 [97]. Συνδυασμένη αναστολή των Chk1 και Chk2 μειώνει την ακτινοαντοχή των CD133+ βλαστικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος *in vitro* [48]. Ανάλογα με την ΑΚΘ, η TMZ οδηγεί σε Chk1- και Chk2-εξαρτώμενη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M. Η αποσιώπηση του Chk2 αναστέλλει αυτό το αποτέλεσμα, ενώ η αποσιώπηση του ATR ή η αναστολή του Chk1 αυξάνουν τη χημειοευαισθησία [98, 99]. Επίσης, η πρωτεΐνη WEE1 είναι απαραίτητη για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G2-M και την επιδιόρθωση του DNA σε ζωικό μοντέλο γλοιοβλαστώματος μετά την έκθεση σε TMZ ή ΑΚΘ [100].

Η σηματοδότηση μέσω του EGFR, και της μεταλλαγμένης παραλλαγής του (EGFR VIII) μέσω των οδών PI3K/AKT και Ras/MAPK μειώνει την ευαισθησία των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος στην ΑΚΘ αλληλεπιδρώντας άμεσα ή επάγοντας έμμεσα τους

μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Εικόνα 9) [94, 101]. Η απώλεια της λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής φωσφατάσης PTEN, που είναι αρνητικός ρυθμιστής της οδού PI3K/AKT/mTOR, έχει διπλό ρόλο καθώς αφενός αυξάνει τη χημειοευαισθησία αστροκυττάρων και γλοιοβλαστώματος μειώνοντας την επιδιόρθωση των διπλών σπασιμάτων του DNA, αφετέρου αυξάνει την ακτινοαντοχή λόγω ανεξέλεγκτης σηματοδότησης της οδού PI3K [102, 103]. Ανάλογα με τον EGFR, η αναστολή του PDGFR αυξάνει την ακτινοευαισθησία των γλοιωμάτων *in vitro* και *in vivo* [104].

Από όλα τα παραπάνω δεδομένα για το γλοιοβλάστωμα προκύπτει ότι η απάντηση στη βλάβη του DNA κατέχει κεντρική θέση και συνδετικό ρόλο ανάμεσα στους παθογενετικούς μηχανισμούς ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου και στον καθορισμό της τελικής έκβασης σε κυτταρικό επίπεδο ως προς τη δράση των αντικαρκινικών θεραπειών [94]. Έτσι, γενετικές και επιγενετικές μεταβολές παραγόντων του DDR συμβαίνουν τόσο κατά την παθογένεση όσο και ως απάντηση στη θεραπεία [48, 105, 106]. Η εξέλιξη του όγκου παρουσία ενός ενεργοποιημένου δικτύου DDR συχνά συνοδεύεται από την εμφάνιση «ελλειμάτων» σε μία ή περισσότερες από τις οδούς ανίχνευσης της βλάβης, σηματοδότησης και επιδιόρθωσης του DNA, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις μεταλλάξεις της οδού ATM-Chk2-p53 [93].

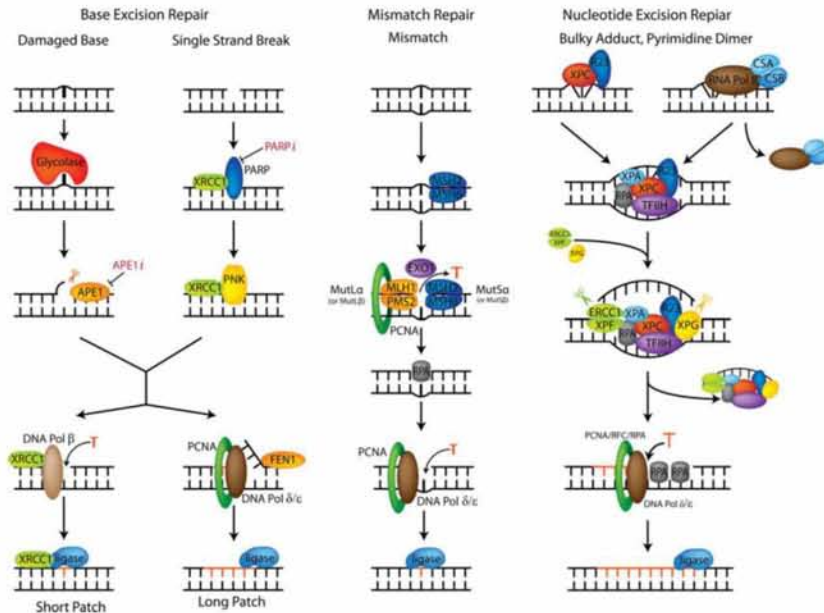
Η επακόλουθη μη ορθή λειτουργία του DDR αφενός διευκολύνει την εξέλιξη του όγκου επιτρέποντας τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την επαγόμενη γήρανση ή απόπτωση, αφετέρου όμως τον καθιστά ευάλωτο σε συγκεκριμένους τύπους βλάβης του DNA, ανάλογα με την ελαττωματική οδό DDR. Η εκμετάλλευση τέτοιων τρωτών σημείων συνιστά την αρχή της «συνθετικής θνησιμότητας» (synthetic lethality) με συνδυασμό φαρμακευτικής επαγωγής της βλάβης και αναστολής του μηχανισμού επιδιόρθωσής της [75]. Επομένως η στρατηγική «υπερφόρτωσης» των γλοιωματικών κυττάρων με βλάβες στο

DNA από τη χρήση TMZ και ταυτόχρονης αναστολής παραγόντων του DDR αποτελεί μια εύλογη θεραπευτική στρατηγική που έχει προοπτική κλινικής εφαρμογής. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν περιορισμοί στις δυνατότητες τροποποίησης του DDR τόσο λόγω της μη ειδικής στόχευσης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, που συνεπάγεται αύξηση της τοξικότητας, όσο και από την ετερογένεια του όγκου που οδηγεί σε διαφορετικές απαντήσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις αυξάνει τη συχνότητα των μεταλλάξεων και τη γενετική αστάθεια, επιλέγοντας πιο επιθετικούς κλώνους [77].

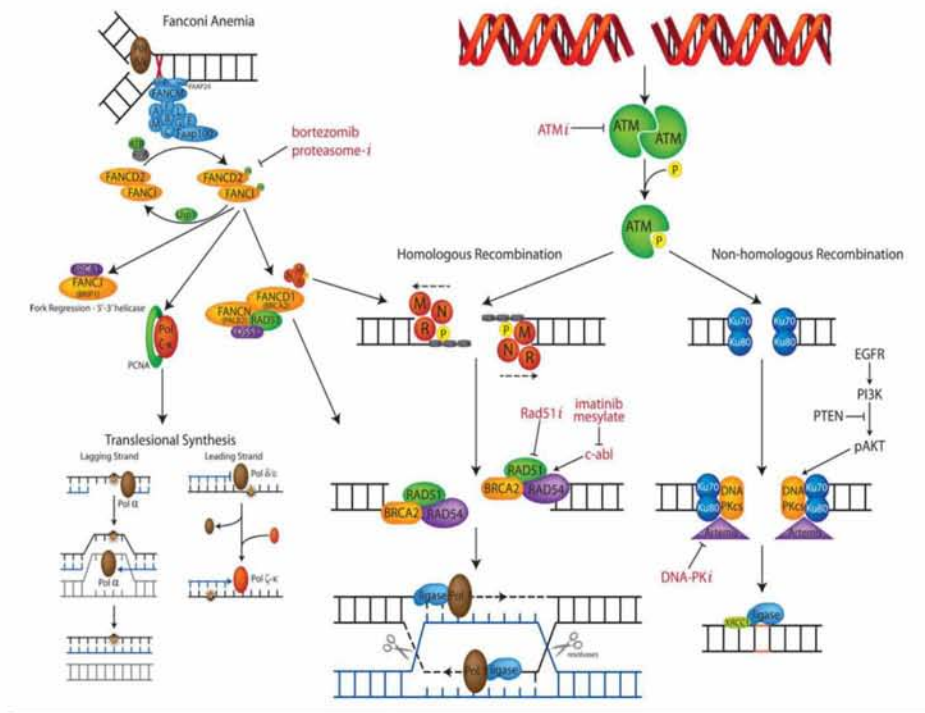
1.3.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA

Ανάλογα με το είδος της βλάβης, υπάρχουν 6 κύριες οδοί επιδιόρθωσης του DNA: η επιδιόρθωση εξαγωγής βάσεων του DNA (base excision repair, BER), η επιδιόρθωση εξαγωγής βάσεων (nucleotide excision repair, NER), η επιδιόρθωση αναντιστοιχίας (mismatch repair, MMR), ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination, HR), η μη ομόλογη ένωση των άκρων (non-homologous end-joining, NHEJ), η σύνθεση διαμέσου της βλάβης (translesion synthesis, TLS) και η οδός της αναιμίας Fanconi (Fanconi anemia, FA). Η επιδιόρθωση του DNA μπορεί επίσης να γίνει με άμεση αναστροφή της βλάβης (direct reversal, DR), μηχανισμός που εμπλέκεται στην απάντηση στη βλάβη από αλκυλιωτικούς παράγοντες [77]. Σε γενικές γραμμές, η βλάβη του DNA διακρίνεται αδρά σε βλάβη της μονής ή της διπλής έλικας, εκ των οποίων η δεύτερη είναι πιο τοξική για το κύτταρο. Η πραγματικότητα είναι πιο σύνθετη λόγω της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ των οδών και ορισμένων επιδιορθωτικών ενζύμων, που όταν απουσιάζουν από μια οδό αναπληρώνονται από άλλες οδούς. Επιπλέον, η ενεργότητα των οδών επιδιόρθωσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου, τη φάση του κύκλου και το είδος της βλάβης [107]. Από την άλλη πλευρά, σε όλες τις οδούς υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς την

αναγνώριση της βλάβης, την απομάκρυνση της αντίστοιχης αλληλουχίας του DNA και την επιδιόρθωση του ελλείμματος [77]. BER, NER, και MMR εμπλέκονται στην επιδιόρθωση βλαβών της μονής έλικας (Εικόνα 1.3.2.1), ενώ HR, NHEJ, και FA επιδιορθώνουν τα σπασίματα της διπλής έλικας και τις διασταυρώσεις (Εικόνα 1.3.2.2) [77].



Εικόνα 1.3.2.1 Οδοί BER, MMR, NER [77].



Εικόνα 1.3.2.2 Οδοί HR, NHEJ, FA, TLS [77].

1.3.2.1 BER

Η BER είναι κύρια οδός που ενεργοποιείται από μικρές περιοχές βλάβης του DNA, όπως υπολείμματα νουκλεοτιδίων και σπασίματα μονής έλικας, και είναι ο κύριος φύλακας από τις βλάβες λόγω κυτταρικού μεταβολισμού και ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) [107]. Η BER ξεκινάει όταν ένα μέλος της οικογένειας DNA γλυκοσυλάσης αποκόπτει το κατεστραμμένο υπόλειμμα. Στη συνέχεια η PARP [Poly (ADP-ribose) polymerase] και η πολυνουκλεοτιδική κινάση (PNK) αναγνωρίζουν τα σπασίματα της μονής έλικας και τα σημεία χωρίς βάση. Η απουρινική/απυριμιδινική ενδονουκλεάση 1 (APE1) αναγνωρίζει τα σημεία χωρίς βάση, αφαιρεί το υπόλειμμα δεοξυριβόζης, αποκόπτει το 5' άκρο του σκελετού του DNA και στρατολογεί το επόμενο ένζυμο στο σημείο της βλάβης. Στη short-patch BER (η κύρια οδός BER) το επόμενο ένζυμο είναι η DNA πολυμεράση β (DNA pol β) που αποκόπτει το 3' άκρο με τη δράση λυάσης που διαθέτει και γεμίζει το κενό που δημιουργείται με τη δράση πολυμεράσης. Τελικά, το σύμπλεγμα XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1)-λιγκάσης 3 σφραγίζει το σημείο τομής. Η πρωτεΐνη XRCC1 ενεργεί και ως υποστήριγμα για τη διευκόλυνση της διαδικασίας εκτομής. Στη long-patch BER, η λειτουργία της λυάσης αδυνατεί να ολοκληρώσει την πλήρη εκτομή του σακχάρου λόγω του μεγέθους της έλικας ή της πολυπλοκότητας με αποτέλεσμα να προκύπτει παρεκτόπιση της έλικας. Η DNA pol β ή οι μεγαλύτερες πολυμεράσες pol δ και pol ε γεμίζουν το κενό ενώ η έλικα που φέρει τη βλάβη παραμένει προσδεδεμένη με το 3' άκρο. Η υποστηρικτική πρωτεΐνη PCNA διευκολύνει αυτή την αντίδραση ενώ η ενδονουκλεάση FEN1 αποκόπτει το 3' άκρο της έλικας με τη βλάβη και το κενό ενώνεται από τη DNA λιγκάση 1 [77].

1.3.2.2 MMR

Το σύστημα MMR είναι επιφορτισμένο με την επιδιόρθωση λανθασμένης αντιστοίχισης των DNA πολυμερασών και προσθήκης ή απαλοιφής λόγω ολίσθησης των πολυμερασών κατά τον αναδιπλασιασμό ή τον ανασυνδυασμό. Τα διμερή συμπλέγματα MSH2/MSH6 (MutSα) και MSH2/MSH3 (MutSβ) αναγνωρίζουν το σημείο αναντιστοιχίας και η εξαγωγή γίνεται από τα διμερή MLH1/PMS2 (MutLα) και MLH1/MLH3 (MutLβ) με τη βοήθεια της εξωνουκλεάσης EXO1. Το κενό που προκύπτει στημονή έλικα σταθεροποιείται από την πρωτεΐνη RPA και καλύπτεται τελικά μέσω της DNA πολυμεράσης δ, της πρωτεΐνης PCNA και της DNA λιγκάσης I [77].

1.3.2.3 NER

Η NER εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών που διαταράσσουν τη δομή της έλικας συμπεριλαμβανόμενων συμπλόκων που εισάγονται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Χωρίζεται σε δύο επιμέρους οδούς: τη συνολική επιδιόρθωση του γονιδιώματος (global genomic repair, GGR) που αποτελεί μη ειδικό μηχανισμό επιτήρησης ολόκληρου του γονιδιώματος και την επιδιόρθωση συζευγμένη με τη μεταγραφή (transcription coupled repair, TCR) η οποία αναγνωρίζει βλάβες που εμποδίζουν τη λειτουργία της RNA πολυμεράσης II. Η έναρξη της NER γίνεται με την αναγνώριση του σημείου της βλάβης από την πρωτεΐνη XPC και τη σταθερή πρόσδεση της πρωτεΐνης HHRAD23B, που δημιουργεί μια φωλιά για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών XPA, RPA, TFIIH, XPG και τη στρατολόγηση του ετεροδιμερούς συμπλέγματος ERCC1-XPF, με ιδιότητα ενδονουκλεάσης. Η αποκοπή της έλικας με τη βλάβη στα 3' και 5' άκρα της ακολουθείται από το γέμισμα του κενού με τη

δράση της DNA πολυμεράσης δ ή ε και τη βοήθεια των PCNA, RPA και RFC, ενώ το τελικό σφράγισμα της εγκοπής γίνεται από τη DNA λιγκάση [77].

1.3.2.4 HR και NHEJ

Τα σπασίματα της διπλής έλικας είναι αποτέλεσμα βλάβης από ιοντίζουσα ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ενδογενώς παραγόμενες ρίζες οξυγόνου, και από τη μετατροπή σπασιμάτων της μιας έλικας κατά τον αναδιπλασιασμό. Η επιδιόρθωσή τους πραγματοποιείται είτε μέσω του HR, που χρησιμοποιεί συμπληρωματικό DNA από το ομόλογο χρωμόσωμα κατά τη φάση S ως οδηγό για το γέμισμα των κατεστραμμένων περιοχών, είτε του περισσότερο επιρρεπούς σε λάθη NHEJ. Η έναρξη του HR σηματοδοτείται με την ATM-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση του συμπλέγματος RAD50/MRE11/NBS1 (MRN) που έχει ιδιότητα εξωνουκλεάσης. Ένα σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη RAD52 ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη KU για την επιλογή της οδού επιδιόρθωσης μεταξύ HR και NHEJ. Το 3' άκρο εισέρχεται στην ομόλογη περιοχή της αδελφής χρωματίδας με τη βοήθεια των πρωτεϊνών RAD51, BRCA2, RAD54 και μια DNA πολυμεράση επεκτείνει το 3' άκρο χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλυσίδα, επιστρέφοντας την αρχική μετά την ένωση από τη DNA λιγκάση. Το σύμπλεγμα που προκύπτει καλείται σύνδεση Holiday ("Holiday junction").

Η ιδιαίτερα επιρρεπής σε λάθη επιδιόρθωση με NHEJ κατευθύνεται από τη DNA πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK) που αποτελείται από μια ρυθμιστική υπομονάδα, το ετεροδιμερές KU80/KU70, και μια καταλυτική υπομονάδα, τη DNA-PKcs που είναι μέλος της PI3K οικογένειας κινασών. Το ετεροδιμερές KU80/KU70 προσδέεται στο κενό της διπλής έλικας ανεξαρτήτως αλληλουχίας συμπληρωματικότητας και μαζί με την ενεργοποιημένη

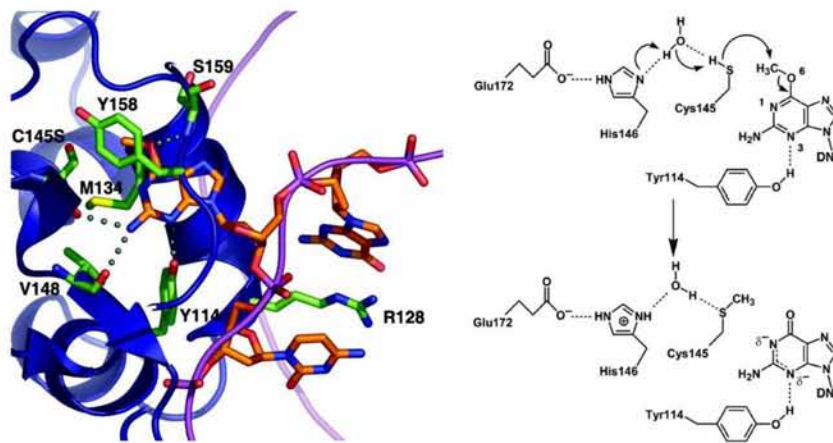
από την κινάση ATM ενδονουκλεάση Artemis επεξεργάζεται ή αποκόπτει τα άκρα επιτρέποντας την επανασύνδεση του σπασίματος. Το σύμπλεγμα XRCC4/DNA λιγκάσης IV σφραγίζει τα μη συμπληρωματικά άκρα [77].

1.3.2.5 TLS

Όταν ογκώδη σύμπλοκα και διμερή θυμίνης προκαλούν σταμάτημα της DNA πολυμεράσης δ στο βρόχο της αντιγραφής η επιδιόρθωση TLS επιτρέπει την αντικατάσταση από μια περισσότερο επιρρεπή σε λάθη DNA πολυμεράση με σκοπό την υπέρβαση των σημείων μηχανικού κωλύματος. Τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις πολυμεράσες αυτές [77].

1.3.2.6 Άμεση επιδιόρθωση (MGMT)

Εκτός από την ικανότητα της DNA πολυμεράσης δ να αναγνωρίζει και να απομακρύνει βλάβες με την ιδιότητα της 3'-5' εξωνουκλεάσης που διαθέτει, ο βασικός μηχανισμός άμεσης επιδιόρθωσης αφορά την άμεση απομάκρυνση ομάδων αλκυλίων από την O6 θέση της γουανίνης που καταλύεται από το επιδιορθωτικό ένζυμο αλκυλο (μεθυλο)-τρανσφεράση της αλκυλο (μεθυλο)-γουανίνης (AGT ή MGMT). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης περιλαμβάνει τη μη αναστρέψιμη μεταφορά της αλκυλομάδας από τη γουανίνη σε μια κυστεΐνη στη θέση 145 του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Εικόνα 1.3.2.6) [77, 108].

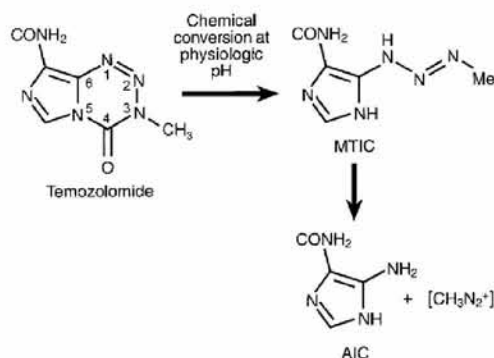


Εικόνα 1.3.2.6 Σύμπλεγμα AGT-υποστρώματος και μηχανισμός αντίδρασης. Σύμπλεγμα C145S μεταλλαγμένης AGT προσδεμένο στην O6-μεθυλογουανίνη του DNA. Μηχανισμός αντίδρασης με ενεργοποίηση της Cys 145 μέσω αλληλεπιδράσεων με Glu172-His146-H₂O-C145 [108].

1.4 Ο ρόλος της τεμοζολομίδης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Η σύνθεση της τεμοζολομίδης ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του '80 ως συνέχεια μιας σειράς νεότερων ιμιδαζοτετραζινονών, με το πλεονέκτημα της καλύτερης αντικαρκινικής δράσης σε σύγκριση με τις παλαιότερες δικυκλικές τριαζένες διότι περιείχαν τρία γειτονικά άτομα αζώτου [109]. Η τεμοζολομίδα είναι ένα μικρό (194 Da) λιπόφιλο μόριο που ανήκει στους μονολειτουργικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες και αποτελεί το 3-μεθυλιωμένο παράγωγο της μιτοζολομίδης με παρόμοια αποτελεσματικότητα και μικρότερη τοξικότητα, γεγονός που επέτρεψε τη διεξαγωγή κλινικών μελετών του φαρμάκου, μέχρι την τελική καθιέρωσή του στη σύγχρονη ΧΜΘ-ΑΚΘ και επικουρική ΧΜΘ του γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον πλεονεκτήματα της τεμοζολομίδης αποτελούν η ευρεία ιστική κατανομή του, με διείσδυση στο ΚΝΣ, η 100% βιοδιαθεσιμότητα μετά την p.o. χορήγηση και η απουσία ενζυμικής μετατροπής στον ενεργό μεταβολίτη MTIC [109]. Η TMZ δρα ως προ-φάρμακο, όντας σταθερή σε όξινο pH, γεγονός που επιτρέπει την p.o. χορήγησή της, αλλά είναι ασταθής σε pH>7, με χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα 1.8 ώρες σε pH 7.4 [110]. Η TMZ απορροφάται ταχέως και διασπάται σε 5-(3-μεθυλτριαζεν-1-υλ)-ιμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο

(MTIC). Η MTIC αντιδρά περαιτέρω με νερό για την απελευθέρωση 5-αμινοιμιδαζολο-4-καρβοξαμιδίου (AIC) και του πολύ αντιδραστικού κατιόντος μεθυλδιαζονίου (Εικόνα 12) [109, 110].

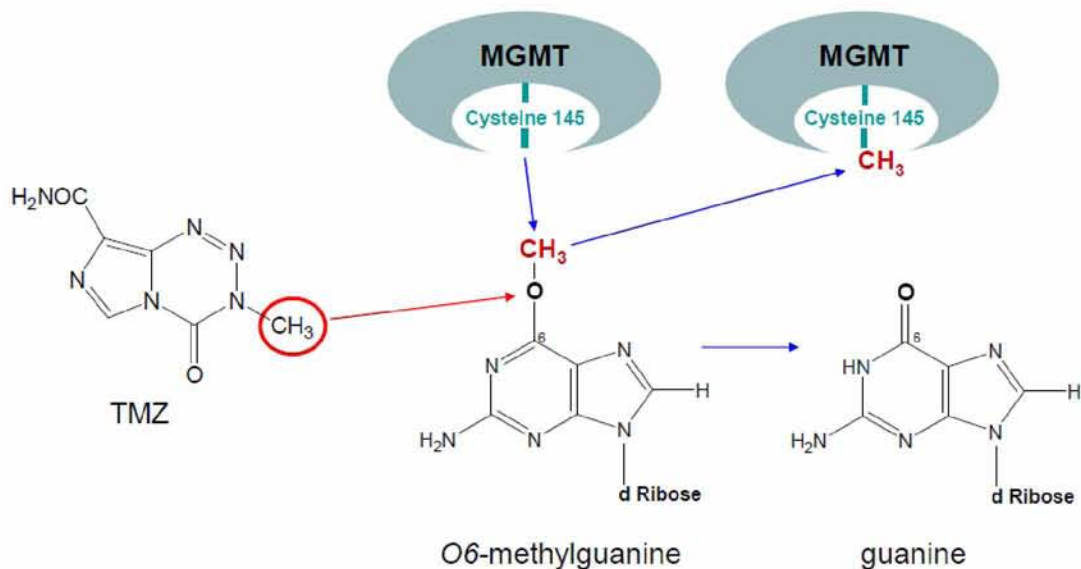


Εικόνα 1.4 Χημική δομή της τεμοζολομίδης [109].

Οι ενεργές ρίζες του κατιόντος μεθυλδιαζονίου μεθυλιώνουν το DNA κατά προτίμηση στις N7 θέσεις της γουανίνης σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη (N7-MeG 70%) καθώς και τη N3 αδενίνη (N3-MeA 9%) και τις θέσεις O6 της γουανίνης (O6-MeG 6%) [110]. Υπάρχει ένα στενό εύρος τιμών pH κοντά στο φυσιολογικό στο οποίο μπορεί να συμβεί η όλη διαδικασία ενεργοποίησης της TMZ και τελικά μεταφοράς μεθυλομάδων. Οι όγκοι εγκεφάλου χαρακτηρίζονται από περισσότερο αλκαλικό pH σε σύγκριση με τους γύρω γειτονικούς ιστούς, γεγονός που ευνοεί την ενεργοποίηση του προφαρμάκου κατά προτίμηση μέσα στον καρκινικό ιστό [110].

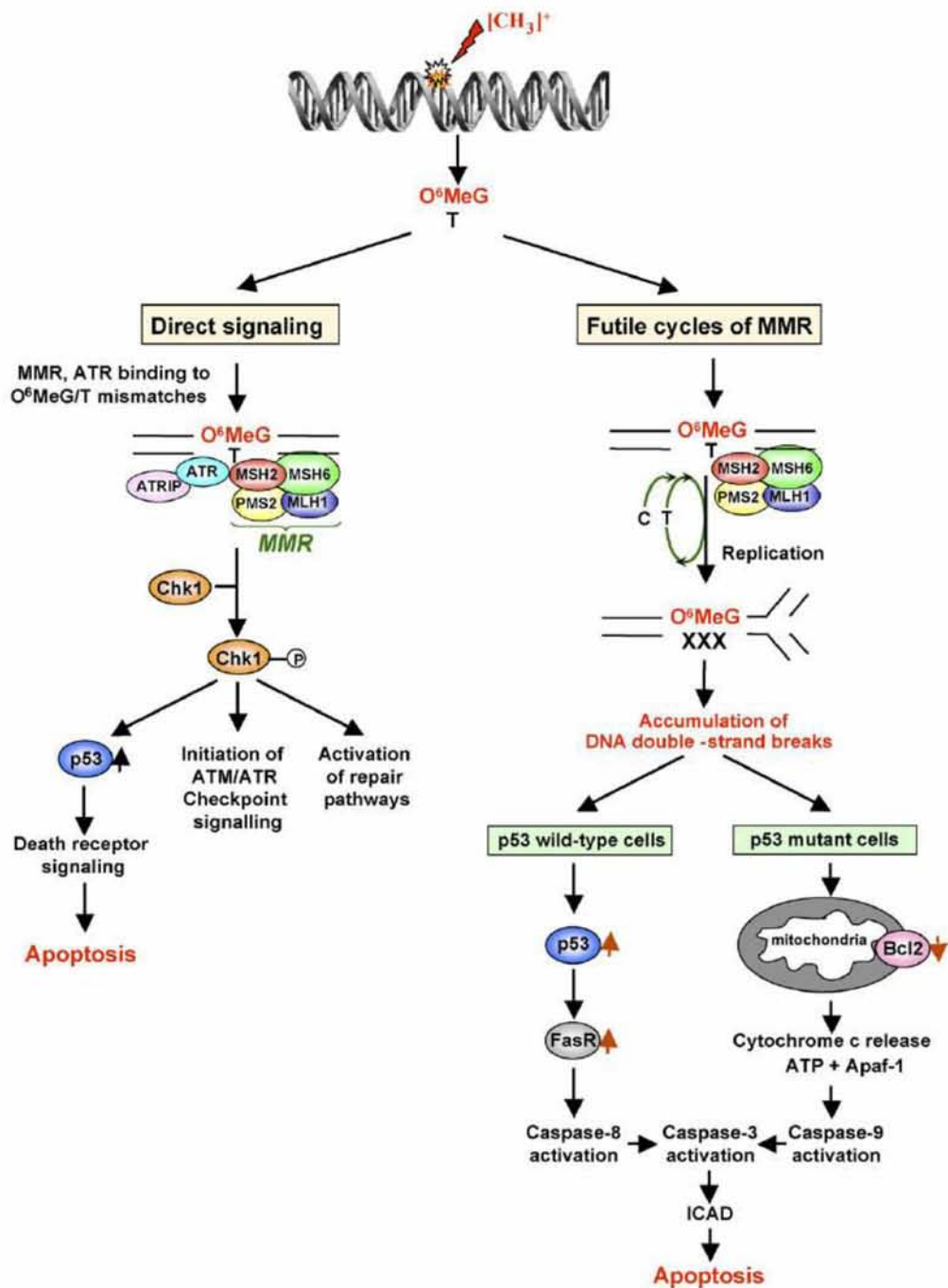
1.4.1 Μηχανισμός δράσης της τεμοζολομίδης

Η κυτταροτοξικότητα της TMZ μεσολαβείται κατά κύριο λόγο από την O6-MeG, μια καρκινογόνο, μεταλλαξιογόνο και τοξική βλάβη, της οποίας η επιδιόρθωση εξαρτάται από την MGMT (Εικόνα 1.4.2.1) [110].



Εικόνα 1.4.2.1 Επιδιόρθωση της O6-MeG από την MGMT [110].

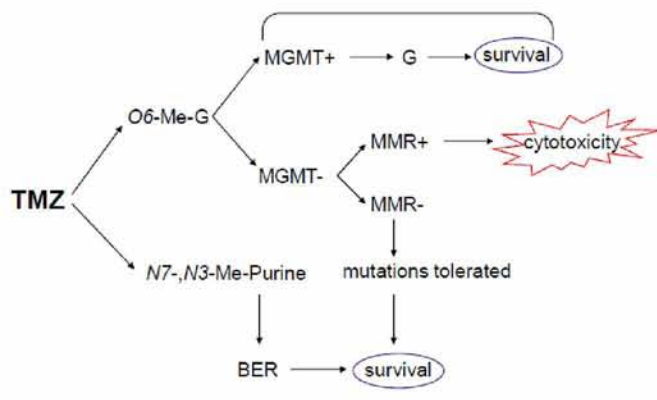
Σε απουσία επιδιόρθωσης, η O6-MeG σχηματίζει ζεύγος με θυμίνη (και όχι κυτοσίνη, με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων), ενεργοποιώντας το σύστημα MMR. Το MMR αναγνωρίζει αποκλειστικά την κακώς τοποθετημένη θυμίνη στη θυγατρική αλυσίδα και την αφαιρεί, ωστόσο η O6-MeG παραμένει στη μητρική αλυσίδα. Αυτό οδηγεί σε μάταιους, επαναλαμβανόμενους κύκλους επανεισαγωγής και αφαίρεσης θυμίνης που καταλήγουν σε εμμένοντα σπασίματα των ελίκων του DNA και τελικά κατάρρευση των βρόχων αντιγραφής του DNA. Ακολουθεί ATM/Chk1-εξαρτώμενη σηματοδότηση για διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M η οποία συμβαίνει στο δεύτερο κυτταρικό κύκλο μετά τη χορήγηση του φαρμάκου και καταλήγει σε απόπτωση, το είδος της οποίας εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγμένου p53 (Εικόνα 1.4.2.2) [111]. Συνεπώς η ανταπόκριση στη θεραπεία με TMZ απαιτεί λειτουργικό και ακέραιο MMR και χαμηλά επίπεδα MGMT.



Εικόνα 1.4.2.2 Αποπτωτικές οδοί που ενεργοποιούνται από την O⁶-MeG [111].

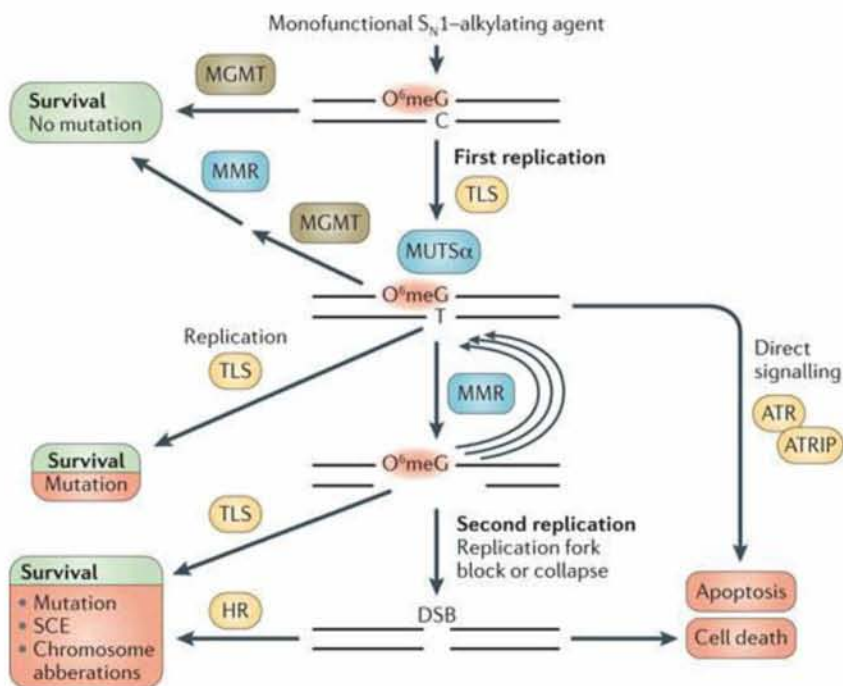
Οι πιο άφθονες N7-MeG και N3-MeA βλάβες επιδιορθώνονται ταχέως από στο σύστημα BER. Η N7-MeG δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα τοξική, σε αντίθεση με τη N3-MeA που είναι θανατηφόρος αν δεν επιδιορθωθεί. Συνεπώς, οι κύριες οδοί επιδιόρθωσης του DNA που

εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης και κυτταροτοξικότητας της TMZ είναι η άμεση ανατροφή-επιδιόρθωση (DR, MGMT), το MMR και το BER (Εικόνα 1.4.2.3) [110].



Εικόνα 1.4.2.3 Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA που καθορίζουν την απάντηση στην TMZ [110].

Μια πιο λεπτομερής προσέγγιση της αλληλουχίας των μοριακών γεγονότων που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο μετά την εμφάνιση της O6-MeG εμπλέκει, επιπλέον την οδό TLS και κυρίως τις οδούς HR ή/και NHEJ από τη στιγμή της δημιουργίας σπασιμάτων διπλής έλικας (Εικόνα 1.4.2.4) [91].



Εικόνα 1.4.2.4 Μηχανισμοί επεξεργασίας και επιδιόρθωσης της βλάβης O6-MeG [91].

1.4.2 Η θέση της τεμοζολομίδης στην κλινική πράξη

Οι κλινικές μελέτες που καθιέρωσαν την TMZ ως μέρος της πολύ-συστηματικής αντιμετώπισης του γλοιοβλαστώματος περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1 [112].

Πίνακας 1.4.2 Τυχαιοποιημένες μελέτες τεμοζολομίδης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα [112].

<i>Primary therapy</i>				
Author	Year published Type of trial	Number of patients	Treatment schedule	Outcomes
Athanasiou [66]	2005, RCT	130	Concomitant TMZ daily with RT for 6 weeks. Adjuvant TMZ on days 1-5 and 15-19 for less than 6 cycles.	Primary: Survival; PFS. Secondary: Safety
Stupp [64]	2005, RCT	573	Concomitant daily TMZ (75mg/m ² /day) during RT (<7weeks). Adjuvant TMZ for first 5 days out of 28 for 6 or fewer cycles. RT was 60Gy focally to the tumour and a 2-3cm margin over 30 sessions and 6 weeks.	Primary: Survival. Secondary: PFS, Safety, QoL.
<i>Recurrent disease</i>				
Yung [67]	2000, RCT	225	Temozolomide: 200mg/m ² /day (if chemotherapy naive) or 150mg/m ² /day (if prior chemotherapy) for 5 days out of a 28 day cycle. Procarbazine 150mg/m ² /day (chemotherapy naive) or 125mg/m ² /day (if prior chemotherapy) for 28 consecutive days in a 56 day cycle	Objective response, sixmonth PFS, median PFS, survival, adverse events

Η προσθήκη της TMZ στην αρχική θεραπεία οδήγησε σε αύξηση της συνολικής επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (χωρίς TMZ) και στις 2 μελέτες (HR 0.84, 95% CI: 0.50-0.68, $p < 0.001$). Επίσης υπήρχε αύξηση στην διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (HR 0.52, 95% CI: 0.42-0.64, $p < 0.001$). Στην υποτροπιάζουσα νόσο, η TMZ παρέτεινε το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (HR 0.68, CI: 0.51-0.90, $p = 0.008$), χωρίς να επηρεάσει τη συνολική επιβίωση [112].

1.4.3 Μηχανισμοί αντίστασης των γλοιωμάτων στην τεμοζολομίδη

Η αντίσταση στη ΧΜΘ των κακοήθων γλοιωμάτων, είτε εγγενής είτε επίκτητη, οδηγεί σε αποτυχία της θεραπείας και κακή πρόγνωση. Κατά βάση, ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα στα γλοιώματα είναι η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA. Πρακτικά, ανάλογα με το είδος του κυτταροτοξικού παράγοντα (ΧΜΘ, ΑΚΘ) και του μηχανισμού δράσης, οι περισσότερες οδοί επιδιόρθωσης του DNA συμμετέχουν στη διαμόρφωση του βαθμού ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας (Πίνακες 1.4.3.1, 1.4.3.2) [91, 113].

Πίνακας 1.4.3.1 Πρωτείνες επιδιόρθωσης του DNA και ευαισθησία σε αλκυλιούντες παράγοντες [91].

DNA repair protein	Alteration	Cancer
<i>BER</i>		
AAG	Single nucleotide polymorphisms and altered expression	Osteosarcoma, breast cancer and astrocytic tumours
MYH	Autosomal recessive mutations	Colorectal cancer
APE	Altered expression or localization	Numerous cancers
Pol β	Single nucleotide polymorphisms	Numerous cancers
XRCC1	Single nucleotide polymorphisms	Numerous cancers
<i>Direct repair</i>		
MGMT	Increased expression and activity	Multiple cancers, glioblastoma and paediatric brain tumours
<i>MMR</i>		
MLH1	Loss-of-function mutations and loss of expression	Colorectal, endometrial, gastric and urothelial cancers
MSH2		
MSH3		
MSH6		
MLH3		
PMS2		
<i>HR</i>		
BRCA1	Loss-of-function mutations	Breast, ovarian, fallopian tube, prostate and pancreatic cancer, malignant melanoma and Fanconi anaemia
BRCA2		
BRIP1		
PALB2		
<i>TLS</i>		
Pol η	Autosomal recessive mutations	Skin cancer
Pol κ	Overexpression	Non-small-cell lung cancer and glioma

Πίνακας 1.4.3.2 Επιδιόρθωση του DNA και αποτελεσματικότητα ΧΜΘ, ΑΚΘ στα γλοιώματα [113].

DNA Repair Mechanism-Enzyme	Higher	Similar	Lower	Therapeutic Agent	Therapeutic Efficacy		
					Increased	Unchanged	Decreased
MGMT			↓	CENU		↓	
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ+IR	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ ACNU BCNU Procarbazine	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MGMT			↓	TMZ+IR	↓		
MGMT			↓	TMZ	↓		
MLH1			↓				↓
MSH2,MSH6,PMS2			↓	TMZ		↓	↓
MSH6			↓	TMZ		↓	↓
MSH6			↓	TMZ		↓	↓
MSH6			↓	Alkylating agents			↓
APE1/Ref-1	↓						
APE1/Ref-1			↓	MMS TMZ BCNU	↓		
APE1/Ref-1			↓	IR BCNU CCNU Procarbazine	↓		
APE1/Ref-1			↓	Me-Lex	↓		
AAG			↓	Me-Lex	↓		
PARP			↓	TMZ	↓		
PARP			↓	TMZ	↓		
DSB repair			↓	TMZ	↓		
Rad51			↓	IR	↓		
Rad51			↓	IR	↓		
BRCA1			↓	IR Cisplatin	↓		
DNA-PKcs			↓	IR	↓		
KUB3			↓	IR	↓		
DNA-PK			↓	Cisplatin	↓		
Ku86			↓	Cisplatin	↓		
Ku70			↓	Cisplatin	↓		
Resolution of γ -H2AX foci			↓	IR		↓	
Phosphorylation of histone H2AX			↓	IR			
FA pathway			↓	TMZ BCNU	↓		
Various DNA repair activities (MGMT DNA-PK Ku70 Ku80 ERCC-1)			↓	Cisplatin Etoposide Camptothec. Doxorubicin IR	↓		
Expression of various DNA repair genes		↓		TMZ			↓

1.4.3.1 MGMT

Σχετικά με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, είναι αναμενόμενο ότι εγγενής ή επίκτητη αντίσταση είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα της ενεργότητας της MGMT, δεδομένης της αντίστροφης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της MGMT και της ευαισθησίας στην TMZ *in vitro* και *in vivo* καθώς και της δευτερογενούς επαγωγής του ενζύμου μετά την έκθεση σε οριακά κυτταροτοξικές δόσεις TMZ [110]. Επιπλέον η έκφραση της MGMT μπορεί να αυξηθεί όχι μόνο από αλκυλιωτικούς παράγοντες αλλά και από την ιοντίζουσα ακτινοβολία καθώς και από τα γλυκοκορτικοειδή, που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της θεραπείας [110].

Μια λεπτομερής ανασκόπηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της MGMT, σε επίπεδο γονιδίου και πρωτεΐνης είναι ουσιώδης για την κατανόηση της συμβολής της έκφρασης του ενζύμου στη διαμόρφωση της αντοχής στην TMZ.

1.4.3.1.1 Ρύθμιση της έκφρασης της MGMT

1.4.3.1.1.1 Επιγενετική ρύθμιση MGMT

Η έκφραση της MGMT εξαρτάται κυρίως από τη μεθυλίωση του γονιδίου της στο χρωμόσωμα 10q26, και συγκεκριμένα από την παρουσία 5-μεθυλοκυτοσίνης σε ειδικές νησίδες κυτοσίνης-γουανίνης (CpG) του εκκινητή. Συνολικά 97 CpG περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί στον εκκινητή και οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν σε 2 περιοχές μεταξύ των θέσεων -249 και -103 καθώς και μεταξύ +107 και +196 του γονιδίου αντίστοιχα, που ευθύνονται για την μεταγραφική αποσιώπηση. Σε συνθήκες απομεθυλίωσης το σημείο έναρξης της μεταγραφής συνορεύει με 4 νουκλεοσώματα που επιτρέπουν τη μεταγραφή του γονιδίου. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων οδηγεί σε ετεροχρωματινοποίηση με αναδιάταξη και τυχαία τοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων που οδηγεί σε αποκλεισμό του σημείου έναρξης από τη μεταγραφική μηχανή. Η συχνότητα και η θέση των μεθυλιωμένων CpG νησίδων είναι μεταβλητή σε κύτταρα, αλλομοσχεύματα και *in situ* γλιοβλαστώματα σε απουσία της MGMT. Ένας μεταγραφικός παράγοντας που πιθανώς εμπλέκεται είναι ο p53, βάσει της συχνότερης της μεθυλίωσης του εκκινητή της MGMT σε p53 μεταλλαγμένους όγκους. Ο μηχανισμός που πιθανολογείται είναι η p53-εξαρτώμενη καταστολή της κυριότερης μεθυλτρανσφεράσης του DNA, DNA (κυτοσίνη-5)-μεθυλτρανσφεράση 1 (DNMT1) και της αποακετυλάσης των ιστονών histone deacetylase 1 (HDAC1). Η ακετυλίωση των ιστονών και η δομή της χρωματίνης καθώς και οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές CBP and p300, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης της MGMT

[114]. Επιπλέον, εκτός από τη μεθυλίωση του εκκινητή, η μεθυλίωση εντός του γονιδίου επίσης επηρεάζει την έκφραση της MGMT και μάλιστα όταν περιλαμβάνει εξώνια οδηγεί σε υπερέκφραση της MGMT και συνοδό επίκτητη χημειοαντοχή [115].

1.4.3.1.1.2 Μεταγραφική ρύθμιση MGMT

Σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος η μεταγραφή της MGMT καταστέλλεται από τον μεταγραφικό παράγοντα p53 μέσω αποτροπής της πρόσδεσης ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα, του Sp1, οδηγώντας σε χημειοευαισθητοποίηση σε αλκυλιούντες παράγοντες. Ο Sp1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του βασικού επιπέδου έκφρασης της MGMT, και αυτό είναι εμφανές από τα πολλαπλά σημεία πρόσδεσης που υπάρχουν στον εκκινητή της MGMT. Εκτός από τον Sp1, ο εκκινητής της MGMT περιέχει σημεία πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid responsive elements, GRE), και AP-1. Τα δύο σημεία πρόσδεσης AP-1 μπορούν να ενεργοποιηθούν από τη συνέκφραση των c-Fos and c-Jun. Επιπλέον η έκφραση της MGMT αυξάνεται από ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) όπως phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) και διακυλογλυκερόλη (DAG) [115]. Ο συμπαράγοντας MGMT-enhancer binding protein (MEBP) επίσης συμβάλλει στην μεταγραφή της MGMT με την πρόσδεσή του στην αλληλουχία του ενισχυτή στο όριο μεταξύ του πρώτου ιντρονίου και εξωνίου [114]. Νεότερα δεδομένα έχουν αναδείξει τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και hypoxia inducible factor 1alpha (HIF-1α) ως κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστές της MGMT και μεσολαβητές της αντοχής σε αλκυλιωτικούς παράγοντες [116, 117].

1.4.3.1.1.3 Μετα-μεταγραφική ρύθμιση MGMT

Τα επίπεδα mRNA της MGMT μετά τη σύνθεσή του τροποποιούνται από το μικρό ρυθμιστικό RNA 181d (miR-181d) η ενδοκυττάρια εισαγωγή του οποίου μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της. Επίσης τα επίπεδα miR-181d έχουν αντίστροφη συσχέτιση με την έκφραση MGMT και αποτελούν προβλεπτικό παράγοντα ανταπόκρισης στην TMZ [118].

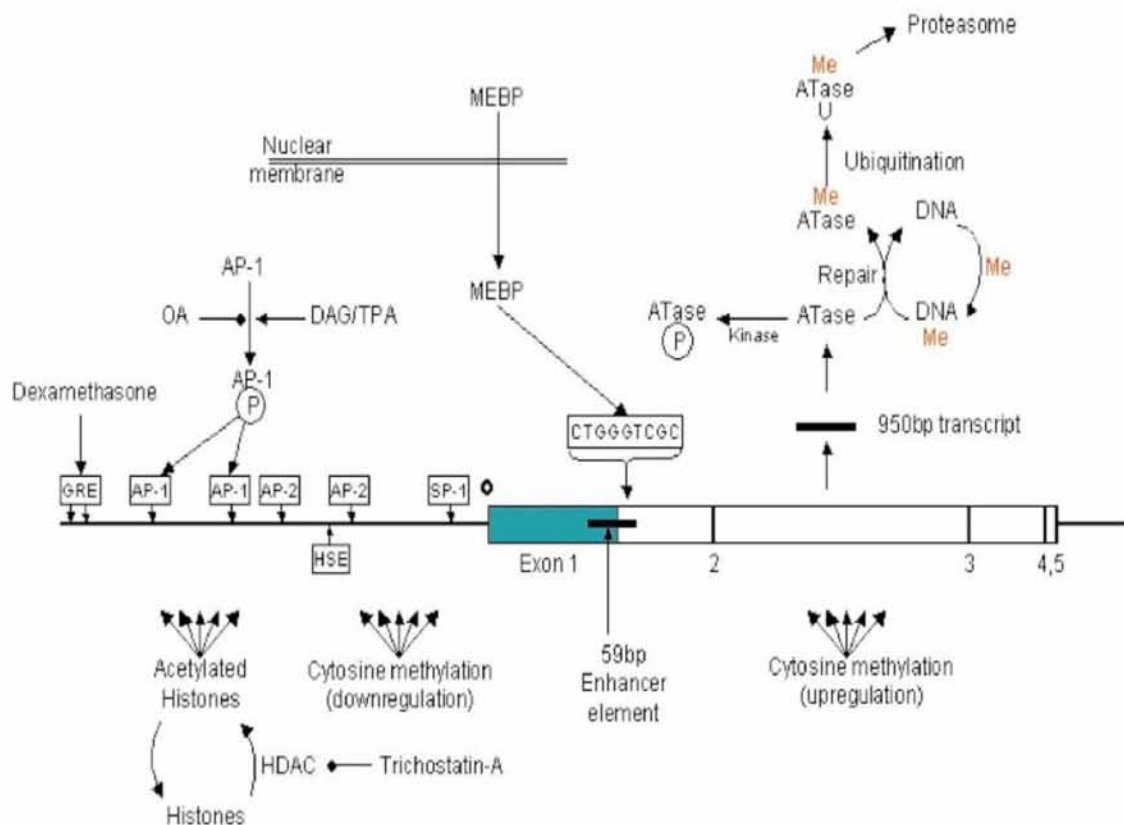
1.4.3.1.1.4 Μετα-μεταφραστική ρύθμιση MGMT

Η άμεση ρύθμιση των επιπέδων του ενζύμου πραγματοποιείται από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος και περιλαμβάνει τη σταδιακή (εντός 3-18 ωρών) μετατροπή της απενεργοποιημένης MGMT σε μορφές που είναι συζευγμένες με μόρια ουβικουιτίνης και οδηγούνται σε πρωτεολυτική αποδόμηση από το πρωτεάσωμα [119]. Ο μηχανισμός πρωτεόλυσης περιλαμβάνει αλλαγή της στερεοδιάταξης από το άνοιγμα μιας ασπαραγγίνης μετά την ένωση του αλκυλωμένου συμπλόκου με το ενεργό κέντρο. Η νέα στερεοδομή της απενεργοποιημένης πρωτεΐνης αποκτά αυξημένη συγγένεια αναγνώρισης και σύζευξης με μια λιγκάση της ουβικουιτίνης που στοχεύει την πρωτεΐνη και την οδηγεί προς αποδόμηση [120]. Η σημασία της αποδόμησης της απενεργοποιημένης πρωτεΐνης έγκειται στη μείωση των επιπέδων του ενζύμου στον πυρήνα, που επιτρέπει τη μετατόπιση νεοσυντιθέμενης MGMT από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Επίσης δε μπορεί να αποκλειστεί ότι η αποδόμηση παρέχει σήμα για τη σύνθεση νέας πρωτεΐνης [121].

Ο ενεργοποιημένος μετά από φωσφορυλίωση μεταγραφικός παράγοντας signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) σχετίζεται με αντοχή στην TMZ μεσολαβούμενη από τη μετα-μεταφραστική σταθεροποίηση των επιπέδων της MGMT *in vitro*, με παράλληλη συσχέτιση των επιπέδων ανοσοιστοχημικής έκφρασης p-STAT3 και MGMT *in vivo* [122].

Η MGMT υπόκειται επίσης σε φωσφορυλίωση η οποία μειώνει την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Επίσης η φωσφορυλίωση στη σερίνη της θέσης 204 κάνει την πρωτεΐνη περισσότερο ανθεκτική στην πρωτεολυτική της αποδόμηση από το πρωτεάσωμα [114].

Η δομή του γονιδίου της ανθρώπινης MGMT και σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση και την ενεργότητά της φαίνονται στην Εικόνα 1.4.3.1.1.4 [113].



Εικόνα 1.4.3.1.1.4 Δομή του γονιδίου της ανθρώπινης MGMT και παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση και την ενεργότητά της [114].

1.4.3.1.2 Κλινική σημασία της MGMT

Πρώιμες μελέτες που εξέτασαν την προγνωστική αξία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της MGMT δεν έδειξαν σταθερή συσχέτισή της με την έκβαση, ωστόσο υπήρχαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των μελετών (Πίνακας 1.4.3.1.2) [123].

Πίνακας 1.4.3.1.2 Κλινικές μελέτες με αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης MGMT [123].

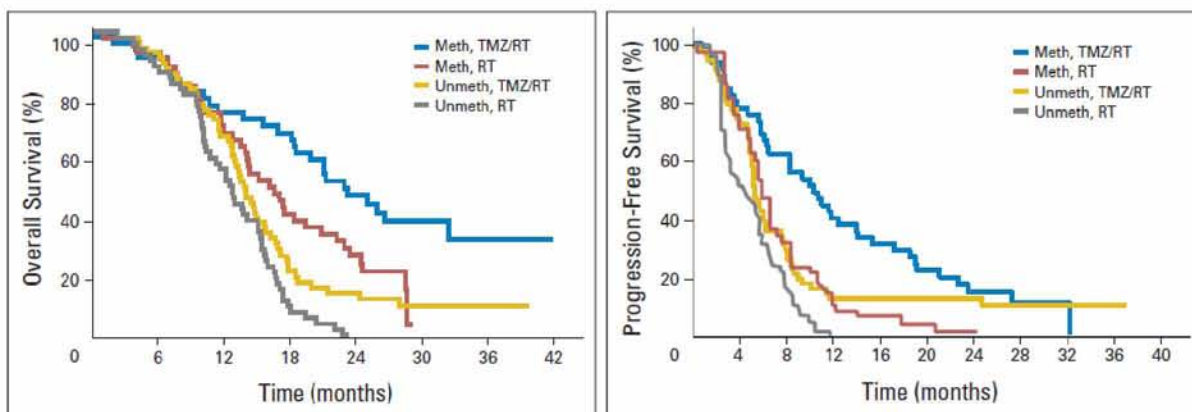
Authors	IHC cohort	Antibody	IHC cut-off (%)	Methylation analysis method	Concordance MGMT positive (% unmethylated)	MGMT negative (% methylated)	IHC significant with survival?	Tumour type
Anda et al. (2003)	18	MT3.1 Neomarkers		n/a			Yes	GBM
Balana et al. (2011)	63	MT3.1 Neomarkers	10	MSP	64.91	66.67		GBM
Brell et al. (2005)	93	MT3.1 Neomarkers		MSP	44.83	36.36	Yes	Anaplastic glioma
Cankovic et al. (2007)	22	MT23.2 Invitrogen	5	MSP	75.00	80.00		Glioma
Cao et al. (2009)	83	MT3.1 Abcam		MSP (40)	55.17	70.45	*	GBM
Capper et al. (2008)	162	MT3.1 Chemicon	15	n/a			Yes	Astrocytoma (WHO II-IV)
Chinot et al. (2007)	25	MT3.1 Chemicon	35	n/a			Yes	Newly diagnosed inoperable GBM
Felsberg et al. (2009)	67	MT3.1 Dako	10	MSP	70.59	47.50	No	Primary GBM
Grasbon-Frodl et al. (2007)	25	MT3.1 Dako	10	MSP	60.00	50.00		High-grade glioma, primary and secondary
Maxwell et al. (2006)	32	MT3.1 (?)	20	MSP (28)	87.50	40.00		Glioma
Mellai et al. (2009)	104	MT3.1 Chemicon	20	MSP	73.08	34.88	No	GBM
Metellus et al. (2009)	42	MT3.1 Chemicon	10	MSP and MethyLight	96.00	84.61	Yes	Recurrent GBM
Möller et al. (2005)	43	MT3.1 Neomarkers	10	MSP	14.29	86.36		Oligodendrocytoma
Nakagawa et al. (2009)	23	MT3.1 Chemicon		MSP (11)	83.30	100.00	Yes	GBM
Nakasu et al. (2004)	51	MT3.1 Neomarkers	10	n/a			Yes	High-grade glioma
Parkinson et al. (2008)	18	MT23.2 Affinity	10	MSP (16)	100.00	66.67		GBM
Preusser et al. (2008a)	164	MT3.1 (Dako) and MT23.2 (Zymed)	10	n/a			No	GBM
Quillien et al. (2012)	100	MT3.1 Chemicon	23	MSP, MethyLight, Pyro, MS-HRM			Yes	GBM
Rodríguez et al. (2008)	50	MT3.1 Neomarkers	10	MSP	85.71	43.75	No	GBM
Sasai et al. (2008)	21	MT3.1 Chemicon		MSP (19)	42.86	63.64		Glioma (WHO II-IV)
Sonoda et al. (2009)	18	MT3.1 Chemicon	10	MSP	77.78	88.80	No	GBM
Uno et al. (2011)	51	MT3.1 Neomarkers	10	MSP and Pyro	52.63	69.23	No	GBM

MSP methylation-specific polymerase chain reaction, Pyro pyrosequencing, MS-HRM methylation-specific high-resolution melting, GBM glioblastoma

* Yes when used in combination with MSP

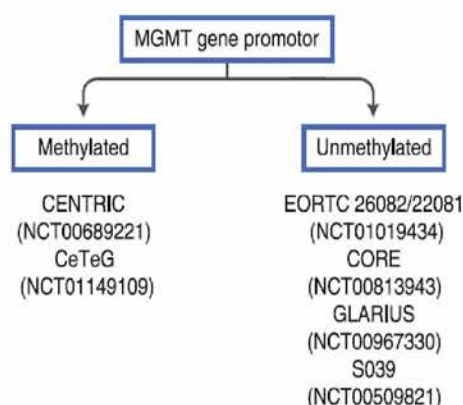
Ο χρυσός κανόνας της εκτίμησης της έκφρασης της πρωτεΐνης είναι ο καθορισμός σε φρέσκο καρκινικό ιστό, ωστόσο δεν είναι πρακτική η κλινική χρήση της δεδομένου ότι απαιτεί άμεση επεξεργασία των φρέσκων δειγμάτων μετεγχειρητικά. Συνεπώς οι περισσότερες πρόσφατες μελέτες στράφηκαν σε ανάλυση της μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου της MGMT. Τα δεδομένα της κατάστασης μεθυλίωσης συσχετίστηκαν σταθερά και ισχυρότερα με την κλινική έκβαση σε σύγκριση την ανοσοϊστοχημεία. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική ακρίβεια των δύο μεθόδων αλλά και στο γεγονός ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση αποκλείει τη διάκριση μεταξύ MGMT-θετικών καρκινικών κυττάρων και μη νεοπλασματικών κυττάρων του ξενιστή που διηθούν τον όγκο (π.χ. μικρογλοία). Η μεθυλίωση του γονιδίου της MGMT συσχετίστηκε με το όφελος από την προσθήκη TMZ στην ΑΚΘ σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα στη μελέτη φάσης III της Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Έρευνα και Θεραπεία του Καρκίνου (EORTC) σε

συνεργασία με την Ομάδα Κλινικών Μελετών του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου του Καναδά (NCIC) (EORTC 26981/22981-NCIC CE.3) (Εικόνα 1.4.3.1.2) [68].



Εικόνα 1.4.3.1.2.1 Ολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου ανάλογα με την κατάσταση μεθυλίωσης της MGMT και το σκέλος θεραπείας (AKΘ έναντι TMZ/AKΘ) [68].

Αλλά και στη μελέτη σύγκρισης του κλασσικού (5/28 ημέρες) με το εντατικοποιημένο σχήμα TMZ (21/28 ημέρες) οι ασθενείς με μεθυλωμένη MGMT στον όγκο είχαν σημαντικά μεγαλύτερη διάμεση συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς μεθυλωμένο εκκίνητη (23.2 έναντι 16 μηνών) [124]. Αντίθετα στα αναπλαστικά γλιώματα η κατάσταση μεθυλίωσης της MGMT έχει προγνωστική αλλά όχι προβλεπτική αξία. Οι τρέχουσες μελέτες σε ασθενείς με γλιοβλάστωμα που χρησιμοποιούν τη μεθυλίωση του γονιδίου της MGMT ως κριτήριο ένταξης ή διαστρωμάτωσης περιλαμβάνονται στην Εικόνα 1.4.3.1.2.2 [124].



Εικόνα 1.4.3.1.2.2 Τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες με αξιολόγηση της μεθυλίωσης της MGMT [124].

1.4.3.2 MMR

Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) δεν είναι συχνή σε γλιώματα υψηλής κακοήθειας ωστόσο, η δυσλειτουργία του MMR σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη ανοχής στις βλάβες O6-MeG, και συνεπώς αντίσταση στην TMZ. Σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια των MSH2, MLH1, MSH6 σε γλιωματικά κύτταρα, αλλομοσχεύματα και όγκους ασθενών επιφέρουν αντίσταση στην TMZ ανεξάρτητα από την έκφραση MGMT. Επιπλέον, από την ανάλυση ιστολογικού υλικού ασθενών προκύπτει ότι η απώλεια της MSH6 σε μια υποομάδα ασθενών σχετίζεται με πρόοδο νόσου υπό θεραπεία με TMZ. Σ' αυτό το συμπέρασμα συνηγορεί και η αποκατάσταση της ευαισθησίας μετά από αποκατάσταση της έκφρασης MSH6 *in vitro* καθώς και η ανεύρεση μεταλλάξεων στο 26% των υποτροπών γλιοβλαστώματος μετά από ΧΜΘ με αλκυλιούντες παράγοντες οι οποίες δεν προϋπήρχαν.

1.4.3.3 BER

Η συμβολή του BER, που επιδιορθώνει τις βλάβες N-Me πουρίνης, στη διαμόρφωση της αντίστασης στην TMZ αποδεικνύεται από επαγωγή της APE-1, η αναστολή της οποίας είτε μέσω ολιγονουκλεοτιδίων είτε μέσω PARP αναστολέα οδηγεί σε μείωση της χημειοαντοχής. Επιπλέον η APE-1 αποτελεί προγνωστικό και προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης σε θεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες και δυνητικό θεραπευτικό στόχο.

1.4.3.4 Απορρύθμιση της απόπτωσης

Η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του p53, η υπερέκφραση Bcl-2 ή Bcl-xL, ή/και υπερέκφραση του EGFR διακόπτουν τη φυσιολογική προ-αποπτωτική απάντηση στη βλάβη

του DNA [125]. Επιπλέον, τα γλοιώματα χαρακτηρίζονται από μια φυσική αντίσταση στην απόπτωση που είναι απόρροια των συχνών μεταλλάξεων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, η οποία οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω των κινασών AKT, PI3K, mTOR, και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

1.4.3.5 Αντλίες μεταφοράς φαρμάκων

Η εγγενής οφείλεται συχνά στην παρουσία εντός των όγκων πρωτεϊνικών συστημάτων αντλιών που είναι επιφορτισμένες με την πρόσληψη και ενεργό εξωκυττάρια μεταφορά διαφόρων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων πολλών χημειοθεραπευτικών. Η ATP-εξαρτώμενη ομάδα αποτελείται από την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), τις πρωτεΐνες αντίστασης πολλαπλών φαρμάκων (multi-drug resistance proteins, MRP) και την πρωτεΐνη αντοχής του καρκίνου του μαστού (breast cancer resistance protein, BCRP) [126]. Η έκφραση του γονιδίου MDR1/ABCB1, που κωδικοποιεί την P-γλυκοπρωτεΐνη μειώνει την ευαισθησία στην TMZ [110].

1.4.3.6 Στελεχιαία καρκινικά κύτταρα

Η επίκτητη χημειοανθεκτικότητα προκύπτει, κατ' αναλογία με την εξελικτική θεωρία του Δαρβίνου, ως συνέπεια της επιλεκτικής πίεσης για γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στα νεοπλασματικά κύτταρα που οδηγούν στην επαγωγή και επιλογή γονιδίων η οποία παρέχει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης, ή προκύπτουν από επιλογή προϋπαρχόντων ανθεκτικών κυτταρικών κλώνων [74]. Έτσι στους αρχικά ετερογενείς όγκους η χημειοθεραπεία εξαλείφει τους χημειοευαίσθητους υποπληθυσμούς κακοήθων κυττάρων αλλά επιτρέπει την επιβίωση των ανθεκτικών στελεχιαίων ή βλαστικών κυττάρων του καρκίνου (cancer

stem cells, CSCs) τα οποία δύνανται να οδηγήσουν σε αναγέννηση του όγκου και αποτυχία της θεραπείας. Οι ιδιότητες που διαθέτουν τα κύτταρα αυτά και τους παρέχουν αντοχή σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες περιλαμβάνουν μειωμένη κυτταρική πρόσληψη και αυξημένη εκροή από αντλίες της μεμβράνης, ενδοκυττάρια αδρανοποίηση του φαρμάκου, ενισχυμένη επισκευή των φαρμακο-επαγώμενης βλάβης στο DNA ή καταστολή της επισκευής με αποτέλεσμα την ανοχή σε βλάβες του DNA και μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση. Είναι χαρακτηριστικό ότι ένας τέτοιος φαινότυπος στελεχιαίων κυττάρων, βασισμένος στη γονιδιακή υπογραφή της ανανέωσης των λευχαιμικών κυττάρων αναγνωρίστηκε σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα υπο ΧΜΘ-ΑΚΘ και σχετίστηκε με πτωχή πρόγνωση [127].

1.4.3.7 Ο ρόλος των miRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μη κωδικοποιούσες μονές αλυσίδες RNA που ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά τη μετάφραση του mRNA-στόχου. Στο γλοιοβλάστωμα η υπερέκφραση του miR-21 αναστέλλει το αποπτωτικό αποτέλεσμα της TMZ μέσω καταστολής της έκφρασης Bax και κασπάσης 3, επαγωγής Bcl-2 και καταστολής του LRRFIP1, το προϊόν του οποίου αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κB [126]. Επίσης τα miR-195, miR-455-3P και miR10a υπερεκφράζονται σε χημειοάντοχα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, ενώ το miR-181d καταστέλλει την έκφραση της MGMT και αποτελεί προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης στην TMZ [118, 126].

1.4.4 Στρατηγικές αναστροφής της χημειοαντοχής

1.4.4.1 Εναλλακτικά σχήματα τεμοζολομίδης

Το σκεπτικό αυτής της στρατηγικής έγκειται στην παρατεταμένη απενεργοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας MGMT με σκοπό τη μεγέθυνση του κυτταροτοξικού αποτελέσματος σε σύγκριση με το καθιερωμένο 5νθήμερο σχήμα κάθε 28 ημέρες. Μια άλλη προσέγγιση στην οποία στηρίζεται η δοκιμή εναλλακτικών σχημάτων TMZ είναι η παρατήρηση ότι η μετρονομική χορήγηση (μικρές και συχνές δόσεις) μπορεί να αναστείλει την αγγειογένεση. Στον Πίνακα 1.4.4.1 περιλαμβάνονται διάφορα συχνά και εναλλακτικά σχήματα χορήγησης TMZ [128].

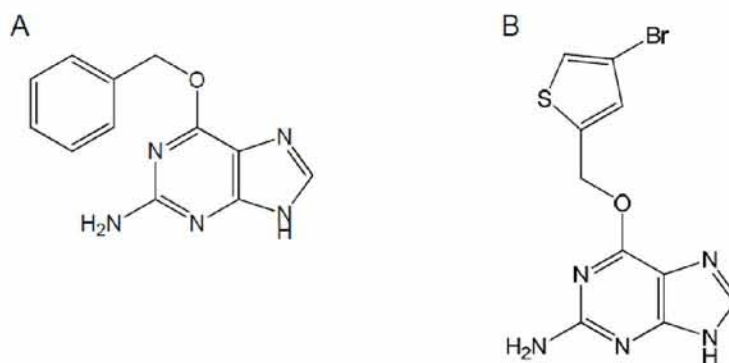
Πίνακας 1.4.4.1 Σχήματα χορήγησης TMZ (p.o.) [128].

Newly diagnosed	
With concurrent radiation	75 mg/m ² per day × 42 days
Maintenance following radiation	Cycle 1: 150 mg/m ² per day × 5 days Cycles 2 through 6: 200 mg/m ² per day × 5 days, every 28 days
Recurrent disease	
No prior chemotherapy	200 mg/m ² per day × 5 days, every 28 days
Prior chemotherapy	150 mg/m ² per day × 5 days, every 28 days
Alternative schedules	50–175 mg/m ² per day × 7 days, every 14 days 75 mg/m ² per day × 21 days, every 28 days 200 mg/m ² × 1 dose, followed by 90–100 mg/m ² every 12 h × 9 doses, every 28 days

Το κλασσικό 5νθήμερο σχήμα φαίνεται ότι πλεονεκτεί έναντι αυτού των 21 ημερών ως προς τη συνολική επιβίωση χημειοευαίσθητων ασθενών με υποτροπή γλοιωμάτων υψηλής κακοήθειας, ενώ η συνεχής χορήγηση (50mg/m²/ημέρα) έδειξε όφελος, ωστόσο αναμένονται περισσότερα δεδομένα από τρέχουσες μελέτες [126, 128].

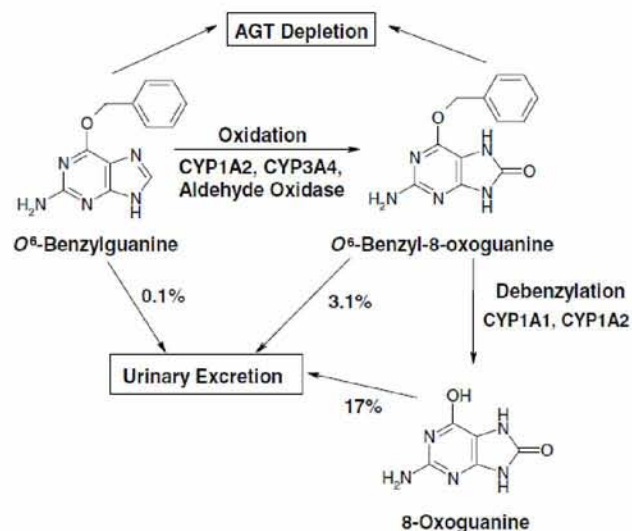
1.4.4.2 Αναστολή MGMT

Οι ισχυροί μη τοξικοί αναστολείς της MGMT Ο6-βενζυλογουανίνη (Ο6-BG) και Ο6-(4-βρωμοθενυλο)γουανίνη (Ο6-BTG, Lomeguatrib, PaTrin-2), έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την δέσμευση της MGMT πριν από τη χορήγηση αλκυλιωτικού παράγοντα (Εικόνα 1.4.4.2.1) [110].



Εικόνα 1.4.4.2.1 Χημικές δομές Α) Ο6-βενζυλογουανίνης και Β) Ο6-(4-βρωμοθενυλο)γουανίνης [110].

Η Ο6-BG λειτουργεί ως ένα ψευδουπόστρωμα και δεσμεύει την MGMT, ομοιοπολικά μεταφέροντας το δακτύλιο βενζηνίου στην κυστεΐνη της θέσης 145, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, προκαλώντας μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση του. Η Ο6-BG δεν ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων, και αντιδρά άμεσα τόσο με την κυτταροπλασματική όσο και με την πυρηνική MGMT. Έκθεση των καρκινικών κυττάρων που περιέχουν υψηλά επίπεδα με MGMT με Ο6-BG αυξάνει τη δραστηριότητα της TMZ *in vitro* και *in vivo*, αλλά έχει μικρή δράση στα κύτταρα του όγκου που διαθέτουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα MGMT. Μετά την IV χορήγηση, η Ο6-BG οξειδώνεται στον ενεργό μεταβολίτη της, την 8-οξοβενζυλογουανίνη (8-ΟχοBG) ο οποίος στη συνέχεια υφίσταται αποβενζυλίωση σε 8-οξογουανίνη. Τόσο η Ο6-BG όσο και η 8-οχοBG είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της ενεργότητας της MGMT (Εικόνα 1.4.4.2.2) [129].



Εικόνα 1.4.4.2.2 Μεταβολισμός O6-BG [129].

Οι κυριότερες μελέτες φάσης II της συγχορήγησης O6-BG και αλκυλιωτικών παραγόντων συνοψίζονται στον Πίνακα 1.4.4.2.1 [130].

Πίνακας 1.4.4.2.1 Κλινικές μελέτης φάσης II με O6-BG [130].

tumour	Anticancer drug	Readout
Glioblastoma multiforme	<i>O</i> ⁶ -BG (Bolus of 120 mg/m ² + continuous infusion of 30 mg/m ² /day) + carmustine wafers	Safety of application no impact on clinical outcome
Glioblastoma multiforme anaplastic glioma	<i>O</i> ⁶ -BG (Bolus of 120 mg/m ² + continuous infusion of 30 mg/m ² /day) + TMZ (472 mg/m ²)	Safety of application no impact on clinical outcome
CNS tumours	<i>O</i> ⁶ -BG (120 mg/m ²) + 40 mg/m ² carmustine	No impact on clinical outcome
Multiple myeloma	<i>O</i> ⁶ -BG (120 mg/m ²) + 40 mg/m ² carmustine	No impact on clinical outcome
Advanced melanoma	<i>O</i> ⁶ -BG (120 mg/m ²) + 40 mg/m ² carmustine	No impact on clinical outcome
Advanced soft tissue sarcoma	<i>O</i> ⁶ -BG (120 mg/m ²) + 40 mg/m ² carmustine	No impact on clinical outcome

Η προσθήκη O6-BG αποκατέστησε την ευαισθησία στην TMZ στο αναπλαστικό αστροκύττωμα χωρίς ωστόσο παρόμοιο αποτέλεσμα στο γλοιοβλάστωμα, ενώ οι μισοί ασθενείς εκδήλωσαν σοβαρή (βαθμού 4) αιματολογική τοξικότητα [131].

Η Lomeguatrib είναι ένας ισχυρός, p.o. αναστολέας-ψευδουπόστρωμα της MGMT. Ομοιοπολική μεταφορά της βρωμοθενυλικής ομάδας στην δραστική κυστεΐνη αδρανοποιεί

την MGMT. Η Lomeguatrib έχει δείξει υποσχόμενη δραστηριότητα χημειοευαισθητοποίησης σε TMZ και BCNU σε αλλομοσχεύματα όγκων με μικρή τοξικότητα. Μετά την αποτυχία της πρώτης τυχαιοποιημένης μελέτης φάσης II στο μελάνωμα λόγω ταχείας ανάκαμψης των επιπέδων MGMT του όγκου εντός 24ώρου, ο επανασχεδιασμός του τρόπου χορήγησης επέτρεψε τη δραστικότητα του φαρμάκου σε ασθενείς με μελάνωμα, και όγκους του ΚΝΣ, του προστάτη και του παχέος εντέρου (Πίνακας 1.4.4.2.2) [130].

Πίνακας 1.4.4.2.2 Κλινικές μελέτες Lomeguatrib (O6-BTG) [130].

tumour model	Anticancer drug	Readout
Phase I		
Advanced solid tumours	<i>O</i> ⁶ -BTG (≥ 10 mg/m ² /day i.v. or ≥ 20 mg/m ² /day) TMZ (150 mg/m ²)	Depletion of MGMT in PBMCs and tumour biopsies, maximal tolerated dose
Metastatic colorectal cancer	<i>O</i> ⁶ -BTG (80 mg/day) Irinotecan (300 mg/m ²)	Depletion of MGMT in PBMCs and maximal tolerated dose
Refractory acute leukaemia	<i>O</i> ⁶ -BTG (40 mg/m ² /day, day 0–10), temozolomide (150 mg/m ² /day, day 1–7)	Depletion of MGMT, response rate
Metastatic melanoma	<i>O</i> ⁶ -BTG (40 mg) for 10 or 14 day plus TMZ (75–100 mg/m ²) day 1–5	Toxicity, adverse effects, response rate
Colorectal cancer	<i>O</i> ⁶ -BTG (120 mg)	Complete MGMT inactivation in the tumour after 12 h
Prostate cancer	<i>O</i> ⁶ -BTG (120 mg)	
CNS cancer	<i>O</i> ⁶ -BTG (160 mg)	
Phase II		
Metastatic melanoma	<i>O</i> ⁶ -BTG (40–80 mg) 5× TMZ (125 or 200 mg/m ²) 5×	Response rate, median time to disease progression
Metastatic colorectal carcinoma	<i>O</i> ⁶ -BTG (40 mg) 5× TMZ (50–200 mg/m ²) 5×	Median time to disease progression, pharmacokinetics of TMZ and <i>O</i> ⁶ -BTG depletion of MGMT activity in PBMCs
Metastatic melanoma	<i>O</i> ⁶ -BTG (40–80 mg) 5× TMZ (125 or 200 mg/m ²) 5×	Pharmacodynamic analysis for [105] and [107], depletion and recovery of MGMT activity in PBMCs and tumour biopsies

Ωστόσο, δεδομένης της χαμηλής έκφρασης MGMT εντός του μυελού των οστών που καθιστά αυτόν τον ιστό ιδιαίτερα χημειοευαίσθητο, η αυξημένη μυελοκαταστολή από τη συνδυαστική χορήγηση MGMT αναστολέων και αλκυλιωτικών παραγόντων παραμένει μια σχεδόν απαγορευτική επιλογή της χημειοθεραπείας. Για την προστασία των αιμοποιητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, αναπτύσσεται η γονιδιακή

μεταφορά γονιδίου μεταλλαγμένης ανθεκτικής MGMT, και τα αποτελέσματα φάσης I/II μελετών αναμένονται.

Μια σύνοψη των προαναφερθέντων καθώς και νεότερων στρατηγικών αναστολής της MGMT σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.4.4.2.3 [132].

Πίνακας 1.4.4.2.3 Φαρμακευτική στόχευση MGMT [132].

Inhibitors of MGMT	Alkylating Agent	Tumor Targeted	Studies
<i>Pseudo-substrates</i>			
O ⁶ -benzylguanine	TMZ	Glioma	Phases I/II
		Melanoma	<i>in vivo</i>
		Pediatric/solid tumors	Phase I
Lomeguatrib	TMZ	Glioblastoma	A clinical trial
		Melanoma	A clinical trial
		Prostate, CNS, colorectal cancer	A clinical trial
		Acute leukemia	<i>in vitro</i>
		Pancreatic	Phase I
		Breast cancer	<i>in vitro/in vivo</i>
		Ovarian cancer	<i>in vitro</i>
<i>Antiepileptic drugs</i>			
Levetiracetam	TMZ	Glioma	<i>in vitro</i>
<i>Oncolytic adenoviruses</i>			
Δ-24-RGD	TMZ	Glioma	<i>in vitro</i>
<i>Gene therapy</i>			
p53	TMZ	Pancreatic	<i>in vitro</i>
IL-24	TMZ	Melanoma	<i>in vitro</i>
IFN-β	TMZ	Neuroblastoma	<i>in vitro/in vivo</i>
		Glioma	<i>in vitro/in vivo</i>
<i>RNA interference</i>			
MGMT-siRNA	TMZ	Glioma	<i>in vitro/in vivo</i>
<i>Temperatures</i>			
Hyperthermia	TMZ	Melanoma	<i>in vitro</i>

1.4.4.3 Αναστολή PARP

Η συμβολή του BER στην TMZ επαγόμενη τοξικότητα απουσία MGMT και παρουσία λειτουργικού MMR είναι μικρή. Ωστόσο, όταν οι O6-MeG βλάβες υφίστανται επιδιόρθωση (MGMT) ή ανοχή (MMR-), και η PARP ανασταλεί, οι N7-MeG και N3-MeA βλάβες συμβάλουν σημαντικά στην κυτταροτοξικότητα της TMZ. Πράγματι, ο συνδυασμός TMZ και του PARP αναστολέα AG 014699 σε κλινικές δοκιμές αύξησε το ποσοστό ανταπόκρισης και

το διάμεσο χρόνο ελεύθερο προόδου νόσου σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με TMZ. Ένας άλλος αναστολέας PARP, ο ABT-888 κατέδειξε ευρεία *in vivo* δραστικότητα σε συνδυασμό με TMZ σε διάφορους όγκους (Πίνακας 1.4.4.3) [133]. Τουλάχιστον 8 αναστολείς PARP υποβάλλονται σήμερα μελέτες φάσης I, II, ή III με ή χωρίς συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Πίνακας 1.4.4.3 Μελέτες αναστολέων PARP στο γλοιοβλάστωμα [133].

PARP inhibitor	Mechanism of action	Study
AG14447	Chemosensitization potency at tolerable doses.	<i>In vivo</i>
CEP-6800	Potentiated the anti-tumor efficacy of TMZ against human tumor xenografts	<i>In vitro/in vivo</i>
CEP-8983	Can sensitize chemotherapy-resistant cell lines and subcutaneous xenografts to the effects of TMZ	<i>In vitro</i>
ABT-888	Sensitizing effects limited to tumor cell lines that have not been previously exposed to TMZ.	<i>In vitro/ In vivo</i>

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου BRCA2 βρέθηκε πρόσφατα ότι επίσης αυξάνει την κυτταροτοξικότητα της TMZ σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, εμπλέκοντας και την οδό του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) στον καθορισμό της χημειοευαισθησίας δεδομένου ότι η μεσολαβούμενη από την οδό HR επιδιόρθωση των σπασιμάτων διπλής έλικας που προκύπτει από την παραμονή των συμπλόκων O6-meG μπορεί να συμβάλει στην αντίσταση στην TMZ [134]. Μάλιστα, η αρχή της συνδυασμένης θνησιμότητας (synthetic lethality) έχει θέση στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος μέσω διακοπής της λειτουργίας του HR καθώς ο συνδυασμός αποσιώπησης του γονιδίου RAD51 και αναστολής της PARP με olaparib αυξάνει περαιτέρω την κυτταροτοξικότητα της TMZ *in vitro* [134]. Συνεπώς η ταυτόχρονη στόχευση δύο επιδιορθωτικών οδών, HR και BER (PARP) κατά τη διάρκεια της ΧΜΘ με TMZ αποτελεί μια νέα ελπιδοφόρα θεραπευτική στρατηγική που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω [135].

1.4.4.4 Αναστολή APE-1

Μικρομοριακοί αναστολείς της APE-1 αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των αλκυλιωτικών παραγόντων σε προκλινικά μοντέλα. Επίσης ο αναστολέας τοποισομεράσης II Iucanthrone αναστέλλει την APE-1, προκαλώντας συσσώρευση απουρινικών/απυριμιδινικών (AP) περιοχών και ευνοώντας την κυτταροτοξικότητα της TMZ. Η μεθοξουαμίνη (Methoxyamine, MA) προσδένεται σε σημεία AP και έμμεσα αναστέλλει την APE-1 εμποδίζοντας την να επεξεργαστεί τις εν λόγω περιοχές του DNA. Η δράση της αυξάνει την κυτταροτοξικότητα χημειοθεραπευτικών ανεξάρτητα από τη λειτουργικότητα του MMR και βρίσκεται σε εξέλιξη μελέτη φάσης I του συνδυασμού MA και TMZ [110].

1.4.4.5 Στόχευση των στελεχιαίων καρκινικών κυττάρων

Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές για τη στόχευση των στελεχιαίων καρκινικών κυττάρων (cancer stem cells, CSCs) όπως η διακοπή της σηματοδότησης του μικροπεριβάλλοντος στις περιοχές αγγείωσης (VEGF, SDF-1) και υποξίας (HIF-1 α), η αναστολή των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA που ενεργοποιούνται εκλεκτικά στα CSCs μετά την κυτταροτοξική βλάβη, η στόχευση μορίων επιφανείας, σηματοδοτικών οδών αυτοανανέωσης (Shh, Wnt, Notch, TGF- β /BMP) και διακοπής του κυτταρικού κύκλου (p16/CDK4/Rb, ATM, Chk1, Chk2) και μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για την επιβίωσή τους και η επαγωγή διαφοροποίησης [113]. Δεδομένου ότι τα CSCs του γλοιοβλαστώματος στηρίζονται πιθανότατα στην ίδια σηματοδότηση που χαρακτηρίζει τα φυσιολογικά στελεχιαία νευρικά κύτταρα, η απομόνωση εξειδικευμένων θεραπευτικών στόχων δεν είναι απλή υπόθεση. Αφετέρου, ο ακριβής ρόλος των CSCs του γλοιοβλαστώματος και κατά συνέπεια η κλινική

σημασία τους δεν έχουν καθοριστεί με σαφήνεια, απουσία σαφώς ταυτοποιημένου φαινοτύπου [113, 135].

Μια πληθώρα φαρμακευτικών αναστολέων των διαφόρων οδών επιδιόρθωσης του DNA ή του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται σε κλινική φάση ανάπτυξης (Πίνακας 1.4.4.5.1) [77].

Πίνακας 1.4.4.5.1 Στόχευση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA ή του κυτταρικού κύκλου [77].

Compound	Company	Route	Pathway	Target	Status	Glioma
Staurosporine (UCN-01)	None	IV	G2/M checkpoint	CHK1	Phase I, II	No
AZD7762	AstraZeneca	IV	G2/M checkpoint	CHK1, CHK2	Phase I	No
LY2603618	Eli Lilly	IV	G2/M checkpoint	CHK1	Phase I	No
LY2606368	Eli Lilly	IV	G2/M checkpoint	CHK1, CHK2	Phase I	No
CBP501	CanBas	IV	G2/M checkpoint	CHK1, CHK2	Phase I, II	No
PF-00477736	Pfizer	IV	G2/M checkpoint	CHK1	Phase I	No
SCH 900776	Schering-Plough	IV	G2/M checkpoint	CHK1	Phase I	No
XL844	Exelixis	Oral	G2/M checkpoint	CHK1, CHK2	Phase I	No
MK-1775	Merck	Oral	G2/M checkpoint	WEE1	Phase I	No
PD 0332991	Pfizer	Oral	G1/S checkpoint	CDK4/6	Phase II	Recurrent GBM
O6-BG	None	IV	Direct	MGMT	Phase I, II	New, recurrent GBM
Lomeguatrib	KuDos	Oral	Direct	MGMT	Phase II	No
TRC102	Tracon	Oral	BER	APE1	Phase I	No
AG-014699	Pfizer	IV	BER	PARP	Phase II	No
INO-1001	Inotek	IV	BER	PARP	Phase II	No
Olaparib (AZD2281)	AstraZeneca/KuDos	Oral	BER	PARP	Phase II	Recurrent GBM
Iniparib (BSI-201)	Sanofi Aventis/BiPar	IV	BER	PARP	Phase III	Newly diagnosed GBM
Veliparib (ABT-888)	Abbott	Oral	BER	PARP	Phase II	Newly diagnosed, recurrent GBM
MK-4827	Merck	Oral	BER	PARP	Phase I	Recurrent GBM
E7016	Eisai	Oral	BER	PARP	Phase I	No
CEP-9722	Cephalon	Oral	BER	PARP	Phase I/II	No
BMN673	Biomarin	Oral	BER	PARP	Phase I/II	No
Bortezomib (Velcade)	Millennium	IV	HR	Proteasome	Phase I, II	Newly diagnosed, recurrent GBM
Imatinib Mesylate (Gleevec)	Novartis	Oral	HR	c-ABL	Phase I, II, III	Recurrent GBM
Amuvatanib (MP470)	Supergen	Oral	HR	Rad51	Phase I	No
CC-115	Celgene	Oral	NHEJ	DNA-PK	Phase I	No

Άλλοι στόχοι (πέρα από τις επιδιορθωτικές οδούς του DNA) και οι αντίστοιχες στρατηγικές πρόληψης ή αναστροφής της χημειοαντοχής περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.4.4.5.2 [126].

Πίνακας 1.4.4.5.2. Στόχευση άλλων μηχανισμών χημειοαντοχής στο γλοιοβλάστωμα [126].

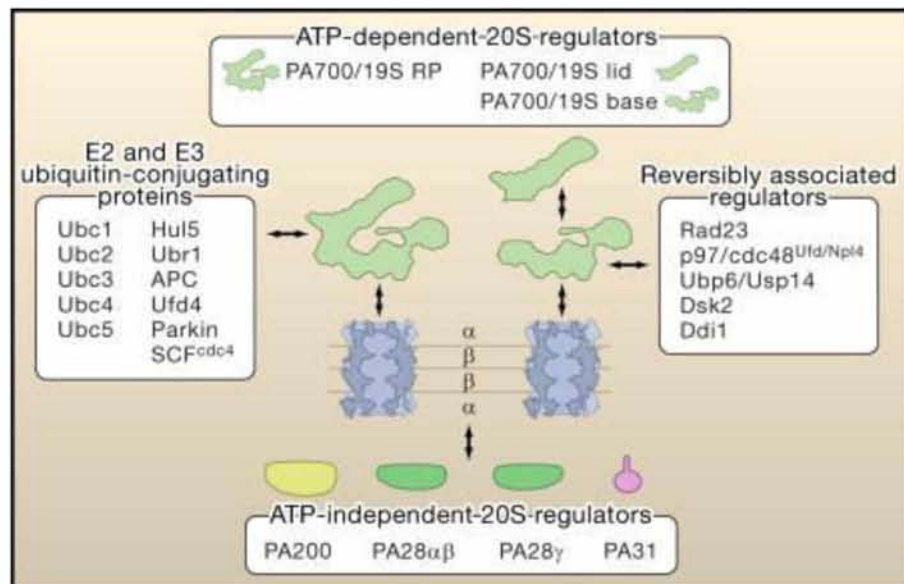
Reasons for resistance	Therapeutic mechanisms
Drug efflux	Synthetic <i>p</i> -glycoprotein inhibitors
Hypoxic areas	Molecular therapies
	Interruption of HIF cascades
	Vascular normalization
miRNAs	Hypoxia-targeted toxic agents
	Inhibition of miR-21
Glioblastoma stem cells	Inhibition of miR-195
	Checkpoint inhibition
	Side population inhibition
Bcl-2	Notch signaling inhibition
	Bcl-2 siRNA

1.5. Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος

1.5.1 Δομή και λειτουργία συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος

Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) είναι μια απαραίτητη κυτταρική ρυθμιστική μηχανή που παίζει βασικό ρόλο σε πρωτεολυτικές και μη- πρωτεολυτικές λειτουργίες που επηρεάζουν πολλές διεργασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ο έλεγχος της γήρανσης και της οξειδωσης, η απόπτωση, η κυτταρική σηματοδότηση, ο χρωματινικός ανασχηματισμός και η μεταγραφή [136]. Το πρωτεασωματικό σύμπλεγμα 26S είναι ένα μεγάλο (2.4MDa) ετερογενές σύμπλεγμα πολλών πρωτεϊνών με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα. Αποτελείται από δύο πολυ-πρωτεϊνικά υποσυμπλέγματα, ένα κεντρικό σύμπλοκο πρωτεάσης, το 20S πρωτεάσωμα, και μια ρυθμιστική υπομονάδα, το 19S πρωτεάσωμα ή PA700 [137]. Το καταλυτικό κέντρο αυτού του συμπλέγματος, το 20S πρωτεάσωμα (700kDa), είναι αυστηρά διατηρημένο εξελικτικά, με απλές μορφές παρούσες και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Το 20S πρωτεάσωμα είναι ένας σχηματισμός που αποτελείται από δύο αντίγραφα 14 πρωτεϊνικών υπομονάδων (α 1- α 7 και β 1- β 7), που συγκροτούν έναν κυλινδρικό σχηματισμό τεσσάρων επταμερών δακτυλίων. Το σύμπλεγμα διαθέτει δύο αντίγραφα από τρία ξεχωριστά καταλυτικά κέντρα. Αυτά τα καταλυτικά κέντρα μαζί, που βρίσκονται στους δύο κεντρικούς δακτύλιους των β υπομονάδων, υδρολύουν σχεδόν όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς. Τα υποστρώματα εισέρχονται στον κεντρικό καταλυτικό πυρήνα από εγκάρσιες εισόδους στους τελικούς δακτύλιους των α υπομονάδων, αλλά μόνο παρουσία ενεργοποιητών (όπως το PA700), ενώ σε απουσία των τελευταίων αυτές οι εισοδοί κλείνουν και η δραστηριότητα του πρωτεασώματος καταστέλλεται (Εικόνα 1.5.1.1) [136, 137].

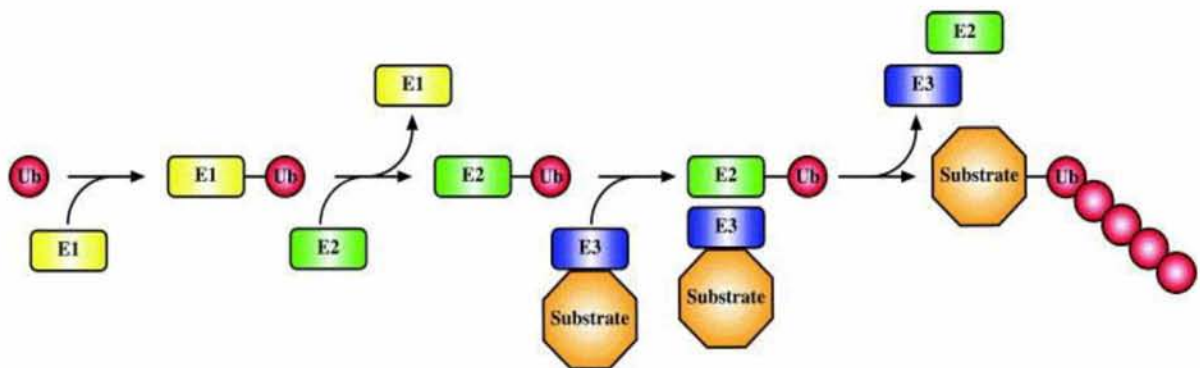


Εικόνα 1.5.1.1 Δομή του πρωτεασώματος [136, 137].

Η φωσφορυλίωση της αλληλουχίας PEST (proline-glutamate-serine-threonine) ή αλληλουχιών τύπου PEST, ως απάντηση σε σήματα κυτταρικής στόχευσης, προκαλεί την έναρξη της ουβικουιτίνωσης και σημαίνει τις πρωτεΐνες για πρωτεασωμική επεξεργασία και/ή αποδόμηση. Η φωσφορυλιωμένη αλληλουχία PEST αναγνωρίζεται από λιγκάσες

ουβικουιτίνης, που καταλύουν την προσθήκη ενός μορίου ουβικουιτίνης. Στην συνέχεια προστίθενται μια αλυσίδα πολυ- ουβικουιτίνης χαρακτηριστικού σχηματισμού, μέσω της οποίας το πρωτεάσωμα αναγνωρίζει πρωτεΐνες προς αποδόμηση [136-138]. Αναλυτικά, η σύνδεση μιας πρωτεΐνης με την ουβικουιτίνη επιτελείται σε 3 στάδια που καταλύονται από τρεις κατηγορίες ενζύμων. Η πρώτη κατηγορία είναι τα ένζυμα που ενεργοποιούν την ουβικουιτίνη (αποκαλούμενα και E1) τα οποία χρησιμοποιώντας ενέργεια από την αποδόμηση του ATP συνδέονται μέσω μιας κυστεΐνης με την ουβικουιτίνη και την ενεργοποιούν. Στη συνέχεια η ουβικουιτίνη μεταφέρεται σε μια κυστεΐνη ενός ενζύμου της κατηγορίας E2 (Ubiquitin Conjugating enzyme). Στο τρίτο στάδιο της διαδικασίας, η συνδεδεμένη ουβικουιτίνη μεταφέρεται με την βοήθεια ενός ενζύμου με δράση λιγκάσης της ουβικουιτίνης (αποκαλούμενο και E3) στην πρωτεΐνη στόχο. Στην αντίδραση αυτή συνδέεται η ε-αμίνη μιας λυσίνης του μορίου της πρωτεΐνης στόχου με την καρβοξυτελική γλυκίνη της ουβικουιτίνης. Επιπλέον μόρια ουβικουιτίνης μπορούν να συνδεθούν στο παραπάνω σύμπλεγμα μέσω αμινοξέων λυσίνης του μορίου της ουβικουιτίνης, συνήθως το K48. Η σύνδεση της ουβικουιτίνης με πρωτεΐνες- στόχους μέσω άλλων λυσινών του μορίου της όπως η K29 και η K63 δεν αποτελούν μήνυμα αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα για αποδόμηση αλλά εμπλέκονται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA και η ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μια αλυσίδα από τουλάχιστον 4 μόρια ουβικουιτίνης χρειάζεται ώστε η πρωτεΐνη στόχος να αναγνωριστεί και να αποδομηθεί από το πρωτεάσωμα. Η επιμήκυνση της αλυσίδας των ουβικουιτινών υποβοηθείται σε μερικές περιπτώσεις από ένα τέταρτο τύπο ενζύμων που ονομάζονται E4. Μια πλειάδα ενζύμων παίρνουν μέρος στην διαδικασία σύνδεσης με ουβικουιτίνη. Υπάρχουν τουλάχιστον 50 διαφορετικά ένζυμα τύπου E2 και πολλά E3 που ανήκουν σε τρεις οικογένειες: Αυτά που φέρουν τομείς HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus), αυτά με τομείς RING (Really Interesting New Gene) και αυτά που περιέχουν τομείς τύπου U-box (τομέας

που είχε περιγραφεί αρχικά στο E4 ένζυμο UFD2 στους μύκητες) [137, 139, 140]. Ακολούθως της αναγνώρισης μιας πολυ-ουβικουιτινωμένης πρωτεΐνης, μια από τις λειτουργίες της ρυθμιστικής υπομονάδας 19S είναι η απο-ουβικουιτυλίωση του υποστρώματος ως προετοιμασία για την πρωτεόλυση. Η αντίδραση καταλύεται επίσης από ειδικά αποσυνδεδετικά ένζυμα, τις απο-ουβικουιτινάσες. Έχουν περιγραφεί πάνω από 70 τέτοια ένζυμα στα ανθρώπινα κύτταρα [136, 137]. Το πρωτεάσωμα στοχεύει σε πρωτεΐνες που είναι κατεστραμμένες, οξειδωμένες ή εσφαλμένα περιελιγμένες. Επιπλέον, ενορχηστρώνει τη διατεταγμένη διάσπαση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που ορίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, την απόπτωση και τη διακίνηση κυττάρων [136, 138, 141]. Συνοπτικά, η σηματοδότηση της ουβικουιτίνης που ενορχηστρώνει την πορεία της πρωτεΐνης στόχου προς αποδόμηση από το πρωτεάσωμα φαίνεται στην Εικόνα 1.5.1.2 [140].



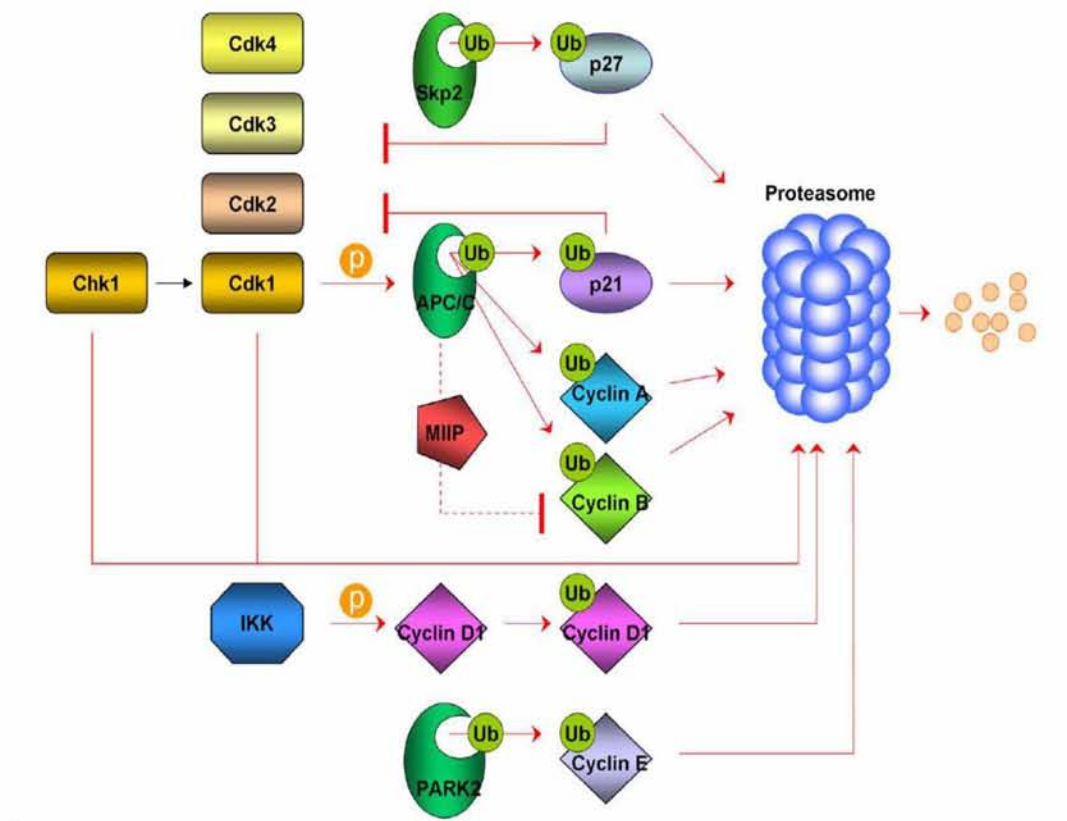
Εικόνα 1.5.1.2 Η διαδικασία της ουβικουιτινοποίησης [140].

Το πρωτεάσωμα είναι ένας ευαίσθητος μηχανισμός που μπορεί να προσαρμόζεται ανάλογα για να ελέγχει την ομοιόσταση της ουβικουιτίνης, ακόμα και υπό αναστολή [136, 142]. Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος, ως απάντηση στην αλλαγή των φυσικών απαιτήσεων (για παράδειγμα σαν ανταπόκριση στην βλάβη DNA που προκαλούν χημειοθεραπευτικοί παράγοντες), τόσο μεταβάλλοντας τον

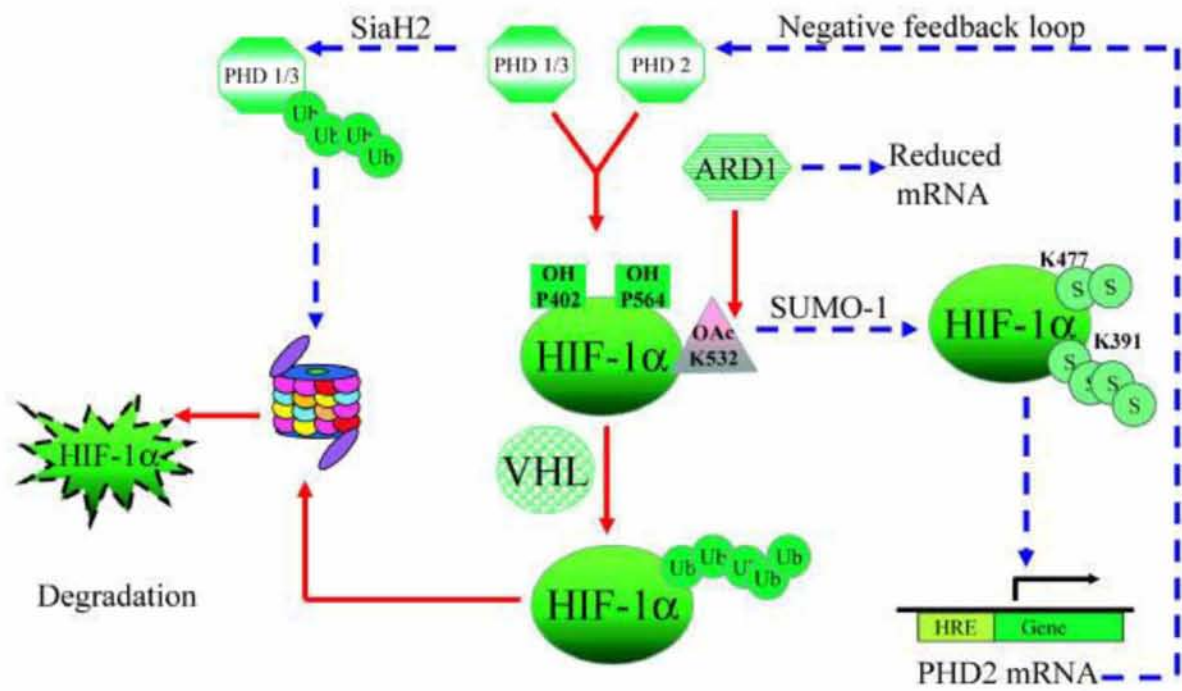
συνολικό αριθμό πρωτεασωμάτων, όσο και διαφοροποιώντας τη σύνθεση υπομονάδων των πρωτεασωμάτων αλλά και την υποκυτταρική εντόπιση του συμπλόκου [136, 143].

1.5.2 Ο ρόλος της οδού ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος στο γλοιοβλάστωμα

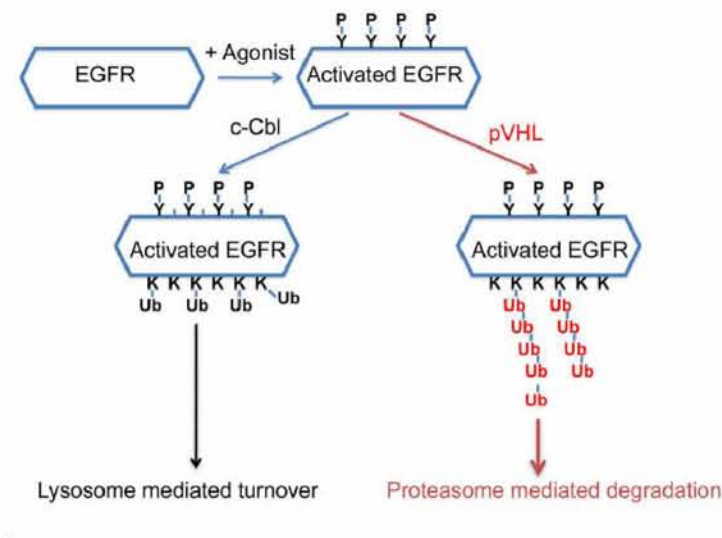
Η οδός ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που χαρακτηρίζουν το φαινότυπο του γλοιοβλαστώματος, ελέγχοντας πρωτεολυτικά τα επίπεδα πληθώρας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνες A, B, D1, E, CDKs, p21, p27), στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (EGFR), στην υποξία και στην αγγειογένεση (HIF-1 α , VEGF) (Εικόνες 1.5.2.1, 1.5.2.2, 1.5.2.3) [144-147].



Εικόνα 1.5.2.1 Πρωτεολυτική ρύθμιση κυκλινών, CDKs και CDK αναστολέων στο γλοιοβλάστωμα [144].



Εικόνα 1.5.2.2 Ρύθμιση του HIF-1α από το UPS (Ub, SUMO, πρωτεάσωμα) στο γλοιοβλάστωμα [146].

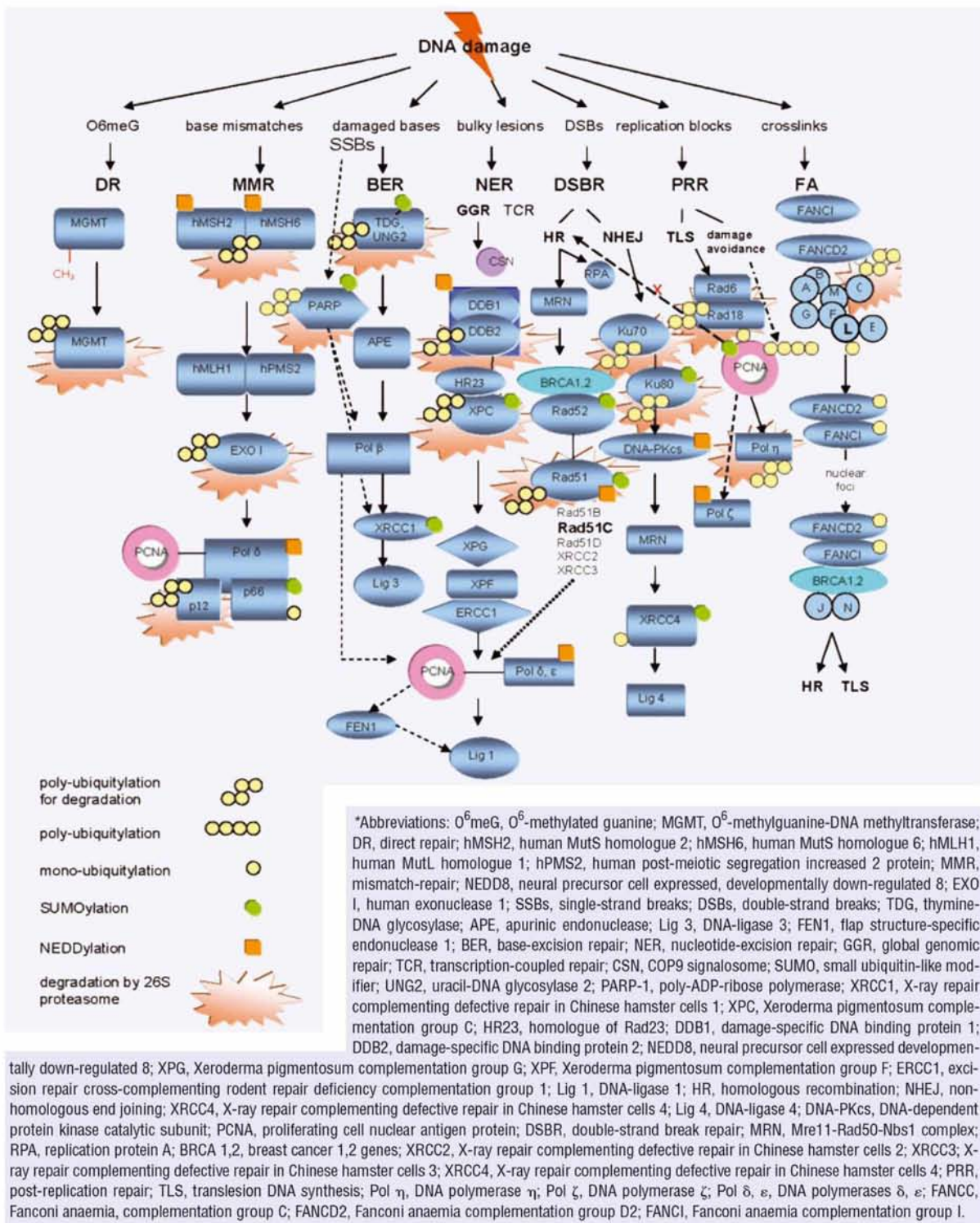


Εικόνα 1.5.2.3 Ρύθμιση του ενεργοποιημένου EGFR με λυσοσωμιακή και πρωτεασωματική αποδόμηση [147].

1.5.2.1 Η ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος

Δεδομένης της σημασίας που έχουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA για την επιβίωση των κυττάρων μετά την έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες και ιδιαίτερα σε TMZ, αξίζει να γίνει αναφορά στον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει η οδός ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος στην πρωτεολυτική και μη-πρωτεολυτική μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση πληθώρας επιδιορθωτικών ενζύμων σε όλες τις οδούς επιδιόρθωσης του DNA.

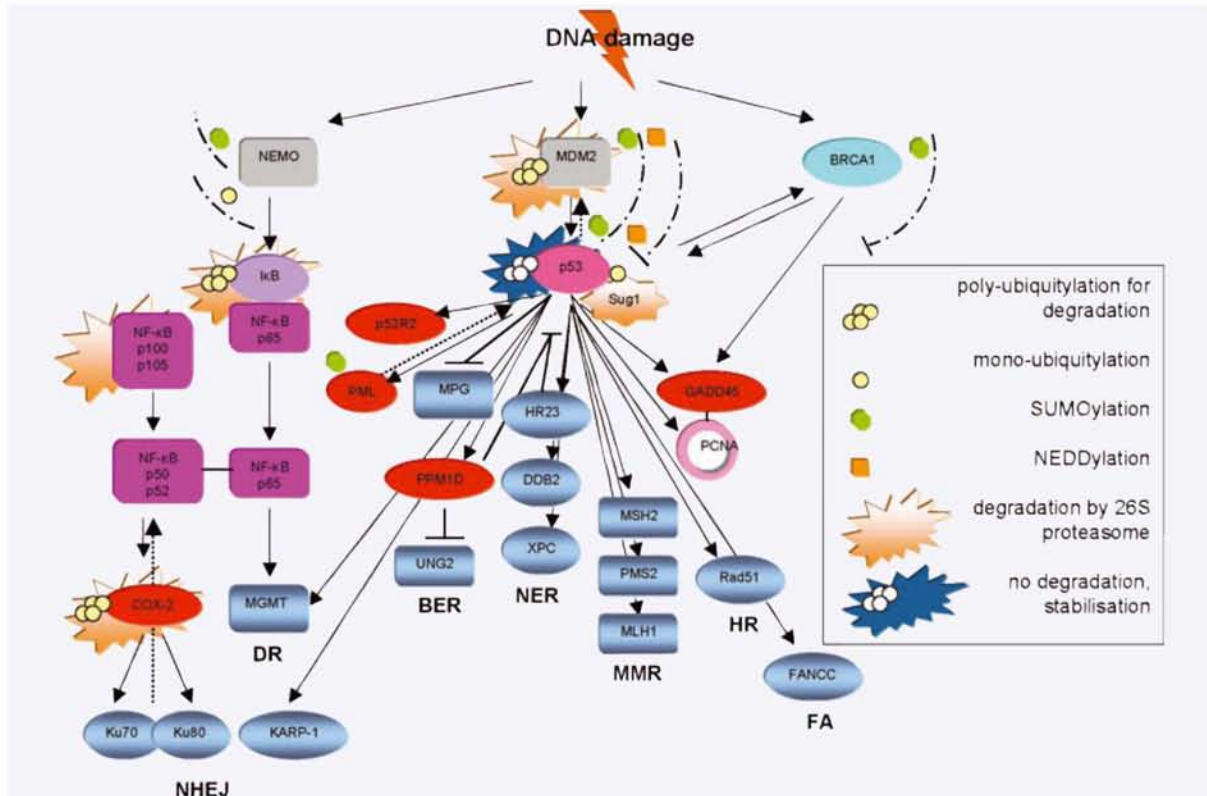
Έτσι, η ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο από το UPS περιλαμβάνει: α) σηματοδότηση για στρατολόγηση στη χρωματίνη (FANCD2-FANCI, XRCC4 μονο-ουβικουιτίνωση), β) σταθεροποίηση και διατήρηση της ενεργότητας (XPC, Rad52 σουμοϋλίωση), γ) διευκόλυνση αποδέσμευσης από το DNA και αποδόμησης (TDG, XPC σουμοϋλίωση), δ) επιλογή επιμέρους οδού (PCNA μονο-, πολυ- ουβικουιτίνωση, σουμοϋλίωση) και ε) πρωτεολυτική αποδόμηση επιδιορθωτικών ενζύμων μετά την ολοκλήρωση της επιδιόρθωσης (MGMT, hMutSa, hEXO1b, TDG, UNG2, PARP-1, XPC, Rad51, Ku70, Ku80, Rad18, FANCC). Η πρωτεολυτική ρύθμιση εξαρτάται από σύζευξη με πολλά μόρια ουβικουιτίνης ενώ η μη πρωτεολυτική ρύθμιση κατευθύνεται από τη σύζευξη με ένα μόριο ουβικουιτίνης ή με άλλους σηματοδοτικούς μεσολαβητές της ίδιας οικογένειας όπως SUMO (small ubiquitin-like modifier) και NEDD8 (Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8) (Εικόνα 1.5.2.1.1) [148].



Εικόνα 1.5.2.1.1 Μετα-μεταφραστική ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA από το UPS [148].

Επίσης, η οδός ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος εμπλέκεται και στη μεταγραφική επαγωγή της έκφρασης επιδιορθωτικών πρωτεϊνών μετά τη βλάβη του DNA, η οποία περιλαμβάνει π.χ. την ενεργοποίηση του NF-κΒ ή τη σταθεροποίηση του p53 που καταλήγουν, η πρώτη

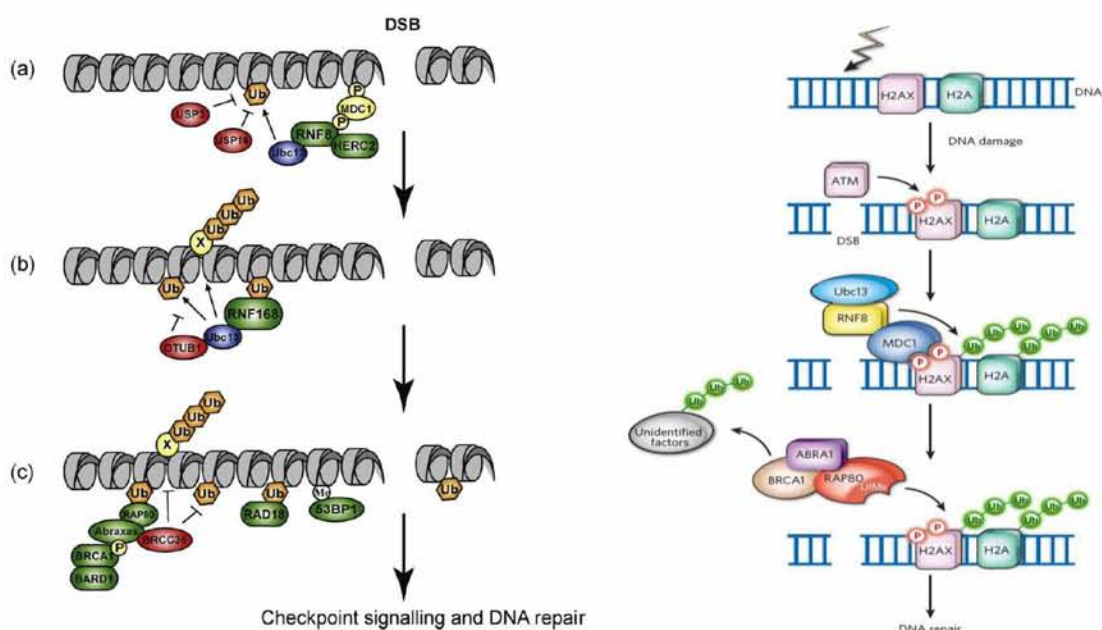
σε επαγωγή των MGMT, Ku70 και Ku80, και η δεύτερη σε επαγωγή διαφόρων γονιδίων των οδών BER, NER, MMR, DR, HR, NHEJ, και FA καθώς και άλλων βοηθητικών (GADD45, p53R2, PML) ή ανασταλτικών παραγόντων (PPM1D), που δρουν ανεξάρτητα ή σε συνεργασία με την πρωτεΐνη BRCA1 (Εικόνα 1.5.2.1.2) [149].



Εικόνα 1.5.2.1.2 Μεταγραφική ενεργοποίηση της επιδιόρθωσης του DNA από το UPS [149].

Ειδικά για το διπλό σπάσιμο της έλικας του DNA, αξίζει να τονιστεί ότι η δράση του UPS είναι σημαντική όχι μόνο για την ανακύκλωση των επιδιορθωτικών πρωτεϊνών (Πίνακας 20) [150] αλλά και για την αρχική σηματοδότηση της βλάβης. Η τελευταία ξεκινά από τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX, που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη MDC1. Η MDC1 επίσης φωσφορυλιώνεται και στρατολογεί την E3 λιγκάση της ουβικουϊτίνης RNF8 στο σημείο του δικπλού σπασίματος. Η RNF8 που προσδέεται στη χρωματίνη συνεργάζεται με την λιγκάση της ουβικουϊτίνης UBC13 για την ουβικουϊτίνωση των ιστονών τύπου H2A η

οποία είναι αντιστρεπτή μέσω των ενζύμων απο-ουβικουιτίνωσης ubiquitin-specific protease (USP) 3 και USP16. Η RNF8 αλληλεπιδρά με την E3 λιγκάση HERC2, που σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση RNF8/UBC13. Η RNF8/RNF168-μεσολαβούμενη ουβικουιτίνωση σε γειτνίαση με το διπλό σπάσιμο της έλικας είναι ουσιώδης για τη συνεχή στρατολόγηση σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών πρωτεϊνών όπως οι BRCA1 και RAD18 (που αποτελούν E3 λιγκάσες της ουβικουιτίνης) και 53BP1. Η πρωτεΐνη BRCC36 είναι μια σχετιζόμενη με τη BRCA1 από-ουβικουιτίνωση η οποία αντισταθμίζει τη δράση τους (Εικόνα 1.5.2.1.3) [151].



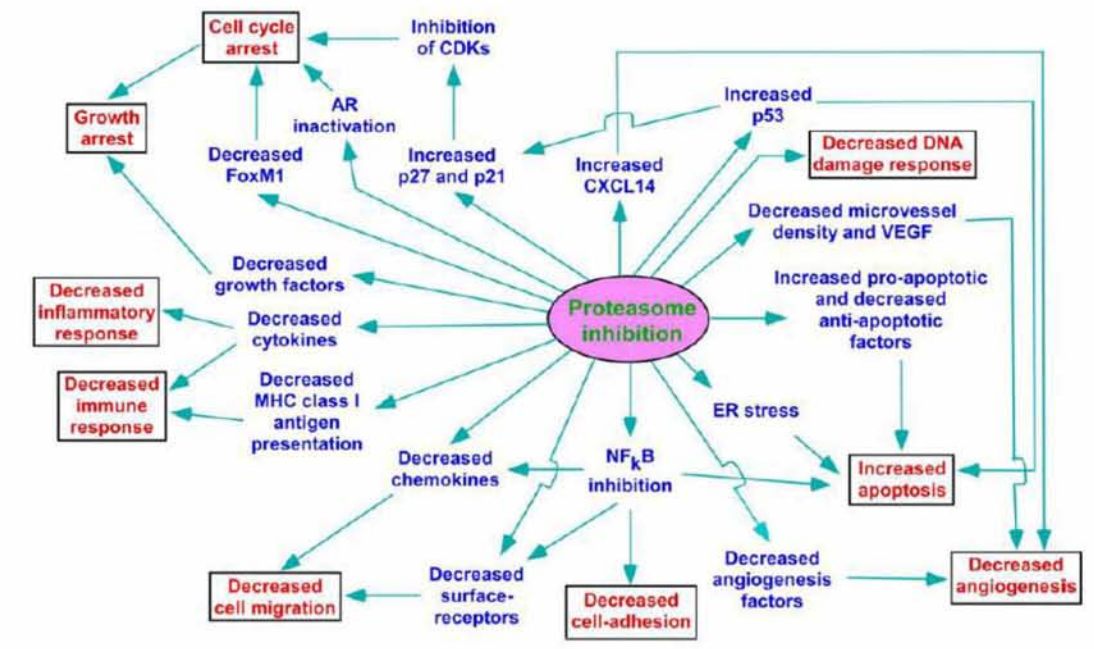
Εικόνα 1.5.2.1.3 Μοντέλο ουβικουιτίνωσης στα σημεία DSBs [151, 152].

Πίνακας 1.5.2.1 Πρωτεΐνες του DDR που αποδομούνται από το UPS στα σημεία DSBs [150].

Protein	K48-ubiquitinated/E3-ligase	Removal from DSBs/ proteasomal degradation	Consequences of inhibited degradation or removal from DSBs	Organism
MDC1	Yes/unidentified	Yes/yes	No BRCA1 recruitment	Mammals
Ku80	Yes/Cul1	Yes/yes	No effect on NHEJ	Xenopus laevis
BRCA1	Unidentified/HERC2 and Unidentified/unidentified	Unidentified/yes	Increased level of BRCA1 in S-phase. Delayed the onset of IR induced apoptosis	Mammals
CtIP	Unidentified/SLAH-1	Unidentified/yes	Unidentified	Mammals
Mms22	Unidentified/Cul4	Yes/yes	Mer11 retention, no ATRIP and Rad52 recruitment to DSBs; no Rad51 recruitment to DSBs	Yeast, mammals
Topoisomerase I	Yes/Cul3	Yes/yes	No DSBs formation after replication collapse	Mammals
53BP1	Unidentified/unidentified	Unidentified/yes	Unidentified	Mammals
Rad54	Unidentified/APC-C	Unidentified/yes	Sensitivity to DNA damaging agents and suppression of interhomolog recombinations in mitosis	Yeast
ATRIP	Unidentified/unidentified	Unidentified/yes	Unidentified	Mammals
Nbs1	Unidentified/unidentified	Unidentified/yes	Unidentified	Mammals

1.5.3 Η αναστολή του πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα επηρεάζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες που απορρυθμίζονται στον καρκίνο όπως η μίτωση, ο πολλαπλασιασμός, η χημειοταξία, η αντιγονοπαρουσίαση, η αγγειογένεση, και η απόπτωση. Αντίστροφα, η αναστολή του πρωτεασώματος προλαμβάνει την ενεργοποίηση του NFκB, και μειώνει την έκφραση παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση, την επιβίωση, την ανάπτυξη ενώ επάγει την απόπτωση σε διάφορες τύπους νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων και χημειοάντοχων κυτταρικών σειρών καθώς και κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Οι κύριοι μηχανισμοί που έχουν περιγραφεί περιλαμβάνουν τη σταθεροποίηση των κασπασών, την αναστολή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και άλλων όπως X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) και survivin, την αύξηση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου p53, p21 και p27 ακολουθούμενη από αναστολή κινάσων του κύκλου (cyclin-dependent kinases, CDKs) και διακοπή του κύκλου και της κυτταρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, η αναστολή του πρωτεασώματος δυσχεραίνει τη νεοαγγείωση και την έκφραση του VEGF (Εικόνα 1.5.3.1) [153].



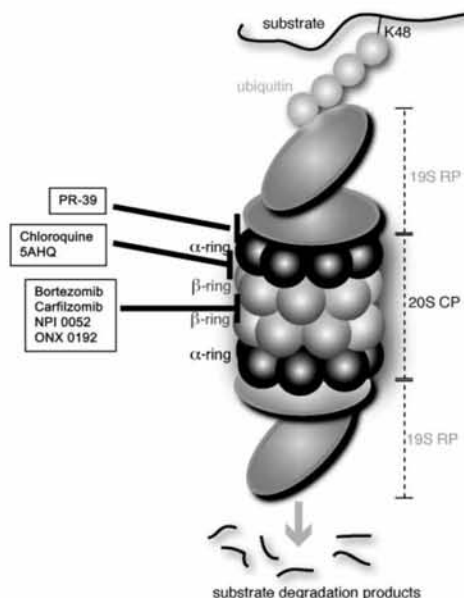
Εικόνα 1.5.3.1 Η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες [153].

Άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την αντικαρκινική δράση της αναστολής του πρωτεασώματος είναι η αναστολή της μετάφρασης, η επαγωγή οξειδωτικού στρες και στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, επαγωγή των υποδοχέων θανάτου, αναστολή της δραστηριότητας της τελομεράσης, ακετυλίωση των ιστονών, σταθεροποίηση της τουμπουλίνης, αναστολή της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, αναστολή της χημειοαντίστασης μέσω καταστολής της p-γλυκοπρωτεΐνης, αναστολή των σηματοδοτικών οδών PI3K/AKT και IL-6, και καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F και FoxO, FoxM1 [48]. Πλεονέκτημα αποτελεί τόσο η πολύ μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά έναντι των φυσιολογικών κυττάρων όσο και η μη αναγκαιότητα πλήρους αναστολής της λειτουργίας του πρωτεασώματος για την επίτευξη αντικαρκινικής δράσης.

Αναφορικά με το ρόλο της πρωτεασωμικής αναστολής στην επιδιόρθωση του DNA, που είναι κύριος παράγοντας χημειοαντίστασης στα γλοιώματα, η χρήση αναστολέων του πρωτεασώματος επηρεάζει το σχηματισμό του RAD51 και αναστέλλει τον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) χωρίς να επηρεάζει το NHEJ, μέσω αναστολής της αποσύνθεσης των σημείων συγκέντρωσης του MDC1, γεγονός που οδηγεί σε μη αποτελεσματική στρατολόγηση του BRCA1. Επιπλέον, η αναστολή του πρωτεασώματος αναστέλλει τη μονοουβικουιτίνωση της πρωτεΐνης FANCD2, προλαμβάνει την επαγόμενη από την ακτινοβολία επαγωγή των εστιών FANCD2, BRCA1 and RAD51 και οδηγεί σε παραμονή της βλάβης στο DNA [77].

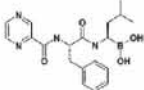
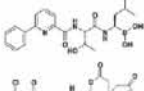
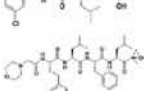
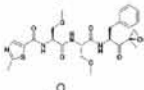
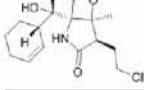

Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αναστολείς του πρωτεασώματος που ανάλογα με το μηχανισμό και τον τρόπο δράσης ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες. Ο αναστρέψιμος αναστολέας πρωτεασώματος μπορτεζομίμη (bortezomib) και οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς carfilzomib, ONX 0912, και NPI 0052 προσδέονται στο ενεργό κέντρο του πρωτεασώματος στην β5 υπομονάδα της 20S υπομονάδας του πυρήνα. Η χλωροκίνη

(chloroquine) και η 5-αμινο-8-υδροξυκινολίνη (5AHQ) αλληλεπιδρούν με το πρωτεάσωμα στην περιοχή μεταξύ των α και β υπομονάδων έξω από το ενεργό κέντρο του πρωτεασώματος. Το πεπτίδιο PR-39 προσδένεται στις α κοντά στη 19S υπομονάδα (Εικόνα 1.5.3.2, Πίνακες 1.5.3.1, 1.5.3.2) [154].



Εικόνα . Σημεία δράσης των αναστολέων πρωτεασώματος of proteasome inhibitors [154].

Πίνακας 1.5.3.1 Χημικές δομές και ιδιότητες αναστολέων πρωτεασώματος [154].

Chemical structure	Name	Type	Developer	Route of administration	Development status
	Bortezomib	Reversible	Millennium: The Takeda Oncology Company	Intravenous	FDA approved
	CEP-18770	Reversible	Cephalon	Intravenous, oral	Phase I
	MLN-9708	Reversible	Millennium: The Takeda Oncology Company	Intravenous, oral	Phase I
	Carfilzomib	Irreversible	Onyx	Intravenous	Phase IIb
	ONX 0912	Irreversible	Onyx	Oral	Phase I
	NPI-0052	Irreversible	Nereus	Intravenous	Phase I

Πίνακας 1.5.3.2 Χημικές ιδιότητες bortezomib και αναστολέων πρωτεασώματος 2^{ης} γενιάς [155].

<i>Proteasome inhibitor</i>	IC ₅₀ β5/β2/β1 (nM)	IC ₅₀ NF-κB (nM)	Dissociation t _{1/2} (min)	Stage of clinical development	Route of administration
Bortezomib	2.4–7.9/590–4200/24–74 [16,18,25]	36–40 [18,25,39]	110 [18]	Approved for MM and MCL	IV (SC also studied) [63]
MLN9708 [18]	3.4/3500/31	62	18	Phase I	IV (Oral dosing efficacious <i>in vivo</i>)
CEP-18770 [19,20]	3.8/>100/<100	NR	NR—slowly reversible	Phase I	IV
Carfilzomib [16]	6/3600/2400	NR	Irreversible	Phase II	IV
PR-047 [21]	36/NR/NR	NR	Irreversible	Preclinical	Orally bioavailable
NPI-0052	3.5/28/430 [25]	13–20 [25,39]	Irreversible	Phase I	IV

Abbreviations: IV, intravenous; MCL, mantle cell lymphoma; MM, multiple myeloma; NR, not reported; SC, subcutaneous.

1.5.3.1 Ο αναστολέας πρωτεασώματος μπορτεζομίμη

Η μπορτεζομίμη (PS-341, VELCADE®) είναι ο πρώτος και ο μόνος, προς το παρόν, αναστολέας του πρωτεασώματος που χρησιμοποιείται κλινικά. Είναι πεπτίδιο που ανήκει στις πεπτιδύλ-αλδεΐδες και είναι παράγωγο του βορονικού οξέος (N-πυραζιν-καρβονυλ-L-φαινυλαλανίνη-L-λευκίνη βορονικό οξύ). Η ομάδα αυτή παραγώγων, σε αντίθεση με άλλες πεπτιδύλ-αλδεΐδες όπως η λιουπεπτίνη και η παπαΐνη, είναι ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος. Αναστέλλει ειδικά την ενζυμική δραστηριότητα χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος ενώ δεν επηρεάζει άλλα σημαντικά ένζυμα του κυττάρου όπως η τρυψίνη, η θρομβίνη, η χυμοτρυψίνη, η καθεψίνη Β, και η ελαστάση [6, 141, 156]. Φαρμακοκινητικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της μπορτεζομίμης ακολουθεί μία κλασική διφασική μείωση μετά από χορήγηση μίας δόσης. Δεν εισέρχεται στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ ο καταβολισμός της γίνεται με οξειδωτική αφαίρεση του βορονικού οξέος, υδροξυλίωση των αποβοριομένων παραγώγων και ηπατική και νεφρική απέκκριση. Δόσεις 1.04 ως 1.38 mg/m² οδηγούν σε πρωτεασωμική αναστολή μεταξύ 60-70% της αρχικής. Συγκεντρώσεις στο πλάσμα γύρω στα 300-400 ng/ml έχουν σαν αποτέλεσμα πρωτεασωμική αναστολή της τάξης του 70-80% ενώ το ποσοστό πέφτει στο 20% με συγκεντρώσεις 10 ng/ml.

1.5.3.1.1 Η μπορτεζομίμη στο γλοιοβλάστωμα

1.5.3.1.1.1 In vitro δεδομένα

Η μπορτεζομίμη έχει βρεθεί ότι προκαλεί διακοπή της ανάπτυξης και απόπτωση σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν αυξορρύθμιση πρωτεϊνών που σχετίζονται με διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και απόπτωση (κυκλίνη B1, p21, p27, Bmf, TRAIL DR5), ενίσχυση της TRAIL-μεσολαβούμενης απόπτωσης, μειορρύθμιση πρωτεϊνών που σχετίζονται με πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και αντίσταση στην απόπτωση (CDK2, CDK4, E2F4, Bcl-2, Bcl-xl), και ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού JNK [157-160].

1.5.3.1.1.2 In vivo δεδομένα

Η πρώτη *in vivo* μελέτη της μπορτεζομίμης σε ζωικά μοντέλα γλοιοβλαστώματος δεν έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τα αλλομοσχεύματα TCG3 and U87 εμφυτεύθηκαν ετεροτοπικά σε ανοσοκατασταλμένους ποντικούς. Τρία δοσολογικά σχήματα της μπορτεζομίμης, 0.25, 0.45 και 0.90 mg/kg μελετήθηκαν. Η μπορτεζομίμη οδήγησε σε δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της πρωτεασωμικής χυμοθρυπτικής δραστηριότητας και στα δύο μοντέλα, με τη μέγιστη αναστολή να φτάνει το 30% της αρχικής 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση της απόπτωσης στον έλεγχο της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 ούτε αλλαγή στην κατανομή των κυττάρων στον κύκλο. Επιπλέον στη μέγιστη δόση που χρησιμοποιήθηκε (0.90 mg/kg), η μπορτεζομίμη δεν οδήγησε σε καθυστέρηση στην ανάπτυξη των όγκων, ούτε επηρέασε τον πολλαπλασιασμό τους με βάση τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο του Ki-67 [161]. Ωστόσο είναι εξαιρετικά πιθανό η δόση της μπορτεζομίμης να μην ήταν επαρκής στα συγκεκριμένα ζωικά μοντέλα ώστε να επαληθευτούν τα *in vitro* αποτελέσματα διακοπής του κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης.

Πράγματι, σε ένα άλλο, ορθοτοπικό μοντέλο με τη χρήση της κυτταροσειράς U87 και εκτίμηση της αύξησης του όγκου με βιο-φωταύγεια η χορήγηση Velcade σε δόση 1 mg/kg ενδοφλεβίως είχε σημαντικό αντικαρκινικό αποτέλεσμα και μάλιστα, η συγχορήγηση με 3ήμερο p.o. σχήμα TMZ 15 mg/kg/ημέρα οδήγησε σε μεγαλύτερη αναστολή της αύξησης του όγκου σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με TMZ, χωρίς εμφανείς ενδείξεις τοξικότητας [162].

1.5.3.1.1.3 Κλινικές μελέτες

Η πρώτη φάσης I κλινική μελέτη μπορτεζομίμπης, που ανακοινώθηκε το 2005 και δημοσιεύτηκε το 2010, καθόρισε τις επιπλοκές και τη μέγιστη ανεκτή δόση του φαρμάκου σε ασθενείς με υποτροπή γλοιώματος [163]. Ξεχωριστές διαβαθμίσεις της δόσης πραγματοποιήθηκαν σε 66 ασθενείς, 77% με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, ανάλογα με τη λήψη ή όχι αντιεπιληπτικής αγωγής που επάγει τα ηπατικά ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Η δόση εφόδου ήταν 0.9 mg/m² ενδοφλεβίως δις εβδομαδιαία για τις πρώτες 3 εβδομάδες κάθε κύκλου διάρκειας 4 εβδομάδων

Η μέγιστη ανεκτή δόση ήταν στην υποομάδα χωρίς αντιεπιληπτική αγωγή 1.70 mg/m² βάσει της εμφάνισης grade 3 θρομβοπενίας, αισθητικής νευροπάθειας και κόπωσης. Στην υποομάδα που λάμβανε αντιεπιληπτική αγωγή η αύξηση της δόσης τερματίστηκε στα 2.5 mg/m² χωρίς κριτήρια τοξικότητας. Ωστόσο, η αναστολή της πρωτεασωμικής δραστηριότητας δεν άλλαξε σε δόσεις άνω των 1.90 mg/m² οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι μεγαλύτερες δόσεις δεν αλλάζουν το βιολογικό αποτέλεσμα. Η μέση πρωτεασωμική αναστολή εμφάνισε πλατό στην υποομάδα υπό αγωγή στα 2.1 mg/m² μπορτεζομίμπης στο 77 ± 12% και στους ασθενείς χωρίς αντιεπιληπτική αγωγή και δόση μπορτεζομίμπης 1.7 mg/m² στο 79 ± 6%. Δύο μερικές ανταποκρίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των 61 ασθενών που ήταν

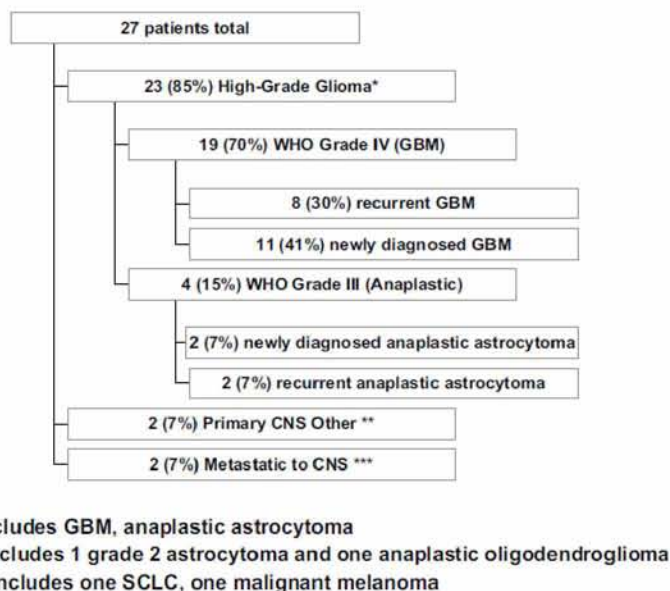
αξιολογήσιμοι, ενώ 14 ασθενείς εμφάνισαν σταθερότητα νόσου. Ένας ασθενής με μερική ανταπόκριση ανήκε στην υποομάδα χωρίς ταυτόχρονη λήψη αντιεπιληπτικής αγωγής, λαμβάνοντας δόση 1.25 mg/m² ενώ παρουσίασε πρόοδο της νόσου 6 μήνες αργότερα. Ο άλλος ασθενής ανήκε επίσης στην ίδια υποομάδα, έλαβε 1.9 mg/m² εμφάνισε σταθερότητα νόσου για 3 μήνες και στη συνέχεια βγήκε εκτός μελέτης λόγω τοξικότητας. Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 3%. Συνολικά 10 από τους 66 ασθενείς ήταν ελεύθεροι προόδου νόσου 6 μήνες μετά τη θεραπεία. Η διάμεση επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου ήταν για την υποομάδα συγχορήγησης αντιεπιληπτικών 1.9 μήνες και για την υποομάδα χωρίς αντιεπιληπτική αγωγή 2.6 μήνες, ενώ για όλους τους ασθενείς ήταν 2.1 μήνες. Η διάμεση συνολική επιβίωση ήταν 5.8, 6.1 και 6 μήνες αντίστοιχα.

Αν και ο σχεδιασμός αυτής της φάσης I μελέτης δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα της μπορτεζομίμπης σ' αυτό τον πληθυσμό ασθενών, η επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου στους 6 μήνες είναι συγκρίσιμη με προηγούμενες μελέτες κυτταροτοξικής ΧΜΘ και ενδεικτική μιας μικρής αντικαρκινικής δράσης της μπορτεζομίμπης παρά το μικρό ποσοστό ανταπόκρισης της τάξης του 3% [164].

Άρα η περαιτέρω μελέτη της χρήσης μπορτεζομίμπης στα υποτροπιάζοντα γλοιώματα έχει νόημα πιθανότατα σε συνδυασμούς με κυτταροτοξική ΧΜΘ ή/και στοχευτικούς παράγοντες σε ασθενείς που δε λαμβάνουν αντιεπιληπτική αγωγή η οποία μπορεί να επάγει την ηπατική ενζυμική δραστηριότητα.

Η δεύτερη ανακοινωμένη κλινική μελέτη της μπορτεζομίμπης σε κακοήθειες του ΚΝΣ ήταν μια φάσης I κλινική δοκιμή συνδυασμού μπορτεζομίμπης, TMZ και ΑΚΘ [165]. Αξιολογήθηκαν για την ασφάλεια χορήγησης 3 δόσεις ενδοφλέβιας χορήγησης 0.7, 1.0, και 1.3 mg/m²/δόση τις ημέρες 1, 4, 8, και 11 κάθε κύκλου 21-ημερών, σε συνδυασμό με σύγχρονη ΑΚΘ και TMZ σε ημερήσια δόση 75 mg/m² ξεκινώντας από την ημέρα 1. Το

πρωτεύον καταληκτικό σημείο ήταν η δόσο-περιοριστική τοξικότητα που καθορίστηκε ως οποιαδήποτε Grade 4-5 τοξικότητα ή Grade 3 τοξικότητα λόγω θεραπείας που απαιτεί ενδονοσοκομειακή νοσηλεία ή/και διακοπή της ΑΚΘ. Δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία αποτελούσαν μη δόσο-περιοριστική τοξικότητα και η ανταπόκριση. Η κατανομή των ασθενών ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο φαίνεται στην Εικόνα 1.5.3.1.1.3.1.

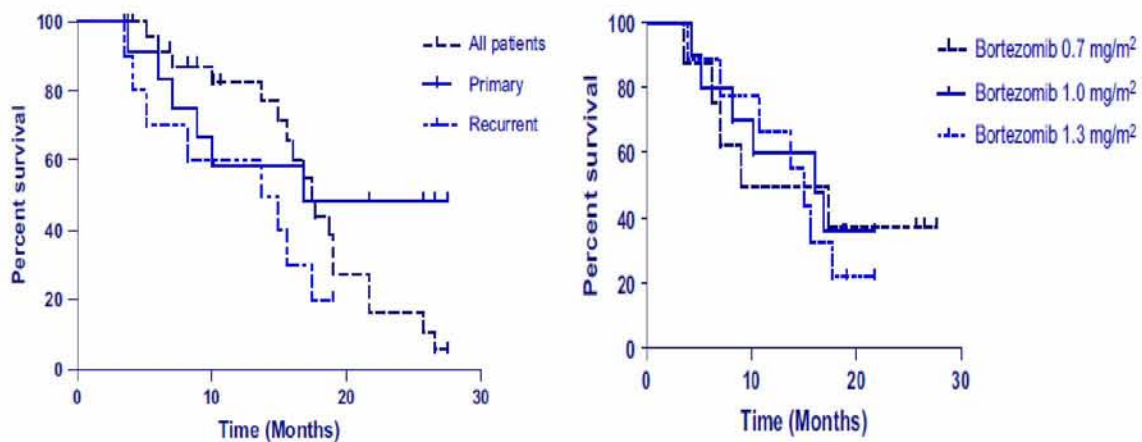


Εικόνα 1.5.3.1.1.3.1 Κατανομή των ασθενών ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο [165].

Δεν παρατηρήθηκε δόσο-περιοριστική τοξικότητα ακόμη και στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν τη μέγιστη δόση μπορτεζομίμπης ($1.3 \text{ mg/m}^2/\text{δόση}$). Τα συχνότερα είδη τοξικότητας ήταν Grade 1 και 2 στοματίτιδα, ερύθημα και αλωπεκία. Από τους 27 ασθενείς, μετά από ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 15 μηνών, 9 ασθενείς ήταν εν ζωή, με μια διάμεση επιβίωση 17.4 μηνών για όλους τους ασθενείς και 15 μηνών για ασθενείς με γλοιώματα υψηλής κακοήθειας.

Χρησιμοποιώντας τα κριτήρια RECIST για την εκτίμηση της ανταπόκρισης, 15 ασθενείς (55%) εμφάνιζαν σταθερότητα νόσου 6 μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν αντικειμενικές ανταποκρίσεις με την επιφύλαξη ότι η

εκτίμηση της ανταπόκρισης μπορεί να είναι προβληματική άμεσα μετά την ΑΚΘ λόγω της εμφάνισης φλεγμονής και σκιαγραφικής ενίσχυσης. Επιπλέον, οι περισσότεροι ασθενείς έλαβαν δόση μπορτεζομίμπης μικρότερη από τη μέγιστη ανεκτή και αυτό επιπλέον περιορίζει τη χρησιμότητα της μελέτης ως προ την εκτίμηση της ανταπόκρισης. Από τους 9 ασθενείς που έλαβαν μπορτεζομίμπη σε δόση 1.3 mg/m^2 , η διάμεση επιβίωση ήταν 15 μήνες και 8 ασθενείς είχαν σταθερότητα νόσου 6 μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Στους ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντα γλοιώματα υψηλής κακοήθειας, η διάμεση επιβίωση των 16.9 μηνών υπερέχει σε σύγκριση με τα υπάρχοντα δεδομένα από την καθιερωμένη θεραπεία καθώς και με τα ιστορικά δεδομένα (χωρίς θεραπεία), παρόλο που η μελέτη δεν ήταν σχεδιασμένη ώστε να συγκρίνει την προσθήκη μπορτεζομίμπης στην καθιερωμένη θεραπεία (TMZ και ΑΚΘ) (Εικόνα 1.5.3.1.1.3.2) [165].



Εικόνα 1.5.3.1.1.3.2 Καμπύλες Kaplan Meier ολικής επιβίωσης ασθενών [165].

Οι τρέχουσες μελέτες μπορτεζομίμπης στο γλοιοβλάστωμα περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.5.3.1.1.3 (www.clinicaltrials.gov).

Πίνακας 1.5.3.1.1.3 Τρέχουσες διεθνείς μελέτες μπορτεζομίμπης στο γλοιοβλάστωμα.

ClinicalTrials.gov number	Sponsor	Phase	Drug(s)	Study design	Endpoint
NCT00611325	Duke University/Millennium	II	Avastin/Bortezomib	Non-randomized	Safety/Efficacy
NCT00990652	Northwestern University/Millennium	II	Bortezomib/Temozolomide	Non-randomized	Safety/Efficacy
NCT00544284	City of Hope Medical Center/NCI	I	Bortezomib/Temozolomide	Non-randomized	Safety
NCT00998010	Jonsson Comprehensive Cancer Center/NCI	II	Bortezomib/Temozolomide/Radiation therapy	Non-randomized	Safety/Efficacy
NCT01435395	Emory University	I	Temozolomide/Bevacizumab/Bortezomib	Non-randomized	Safety

1.5.3.1.1.4 Μπορτεζομίμπη και αιματοεγκεφαλικός φραγμός στο γλοιοβλάστωμα

Ένας παράγοντας που περιορίζει τη δραστηριότητα του Velcade ως θεραπεία για το γλοιοβλάστωμα είναι η αδυναμία διείσδυσης διαμέσου ενός άθικτου ΑΕΦ [166]. Ωστόσο, πολλά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της διαπερατότητας ενός διαταραγμένου ΑΕΦ από το Velcade. Αφενός η μπορτεζομίμπη μειώνει το μέγεθος του εμφράκτου σε ζωικά μοντέλα εστιακής εγκεφαλικής ισχαιμίας και αφετέρου έχει παρόμοιο μοριακό βάρος και είναι υδρόφιλο όπως οι παραμαγνητικές ουσίες με βάση το γαδολίνιο (π.χ. γαδοδιαμίδιο) [167, 168]. Η ομοιότητα των χημικών δομών υποδηλώνει ότι το Velcade διαχέεται στις ίδιες περιοχές που κατανέμεται το σκιαγραφικό με γαδολίνιο. Τελικά, η έκταση της διείσδυσης του ΑΕΦ από το Velcade είναι συνάρτηση της τοπικής διαταραχής του ΑΕΦ μέσα στον όγκο και μπορεί να αξιολογηθεί με βάση την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με Velcade.

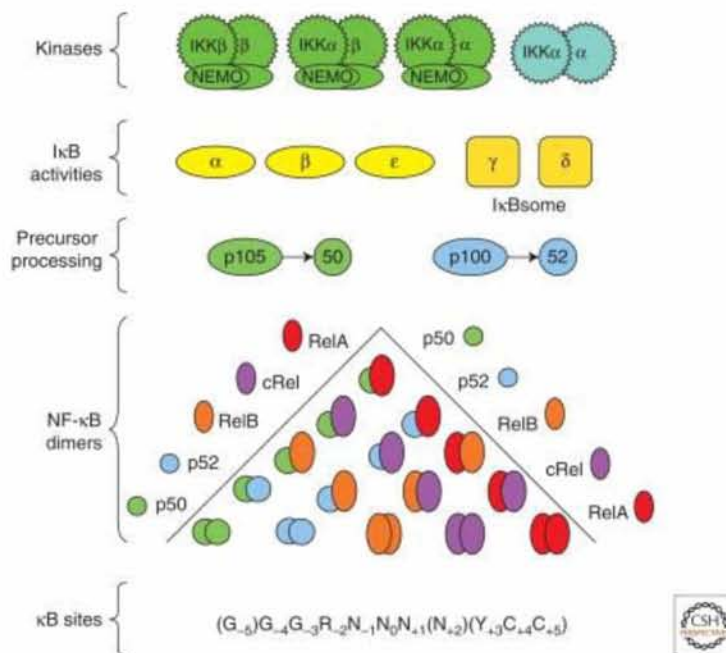
Με βάση τα παραπάνω, η ποσοτική εκτίμηση της αποδόμησης του ΑΕΦ με τη χρήση δυναμικής αξονικής τομογραφίας, ή μαγνητικής τομογραφίας θα μπορούσε να κατευθύνει την επιλογή ασθενών για θεραπεία με Velcade.

Εναλλακτικοί τρόποι αξιοποίησης της αναστολής του πρωτεασώματος στη θεραπευτική αντιμετώπιση των γλοιωμάτων είναι η χορήγηση του αναστολέα πρωτεασώματος τοπικά ή σε διάλυμα βραδείας αποδέσμευσης ή η επιλογή αναστολέων που διαπερνούν τον ΑΕΦ (π.χ. ML858) [169]. Ωστόσο, αυτές οι στρατηγικές απαιτούν προσεκτική αξιολόγηση των ενδεχόμενων επιπλοκών από το ΚΝΣ, δεδομένης της προαναφερθείσας νευροτοξικότητας του ΚΝΣ σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα που έλαβαν Velcade αλλά και της γνώσης ότι η απενεργοποίηση της λειτουργίας του πρωτεασώματος στο ΚΝΣ σχετίζεται αιτιολογικά με ανάπτυξη παρκινσονισμού [170].

1.5.4 Η σηματοδοτική οδός NF-κΒ

Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος ρυθμίζει πολλά βήματα στην οδό NF-κΒ: τη ουβικουιτίνωση και πρωτεολυτική αποδόμηση της ΙκΒ, την επεξεργασία των πρόδρομων μορφών NF-κΒ p100 και p105, και την ενεργοποίηση της κινάσης ΙκΒ (IKK), το τελευταίο τόσο σε εξάρτηση, όσο και ανεξάρτητα της διάσπασης [138]. Η οικογένεια πρωτεϊνών Rel ή NF-κappaB (NF-κΒ) αποτελείται από μια οικογένεια δομικά ομόλογων ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως οι ανοσιακές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις, αναπτυξιακές διαδικασίες, κυτταρική αύξηση, και απόπτωση. Επιπλέον, αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ενεργοί σε ένα μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, η χρόνια φλεγμονή, το άσθμα, τα νευροεκφυλιστικά

νοσήματα, και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι πρωτεΐνες Rel/NF-κB έχουν μια εξελικτικά διατηρημένη δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA/διμερισμού που ονομάζεται περιοχή ομολογίας Rel (Rel homology domain; RHD) (1.5.4.1) [171, 172].



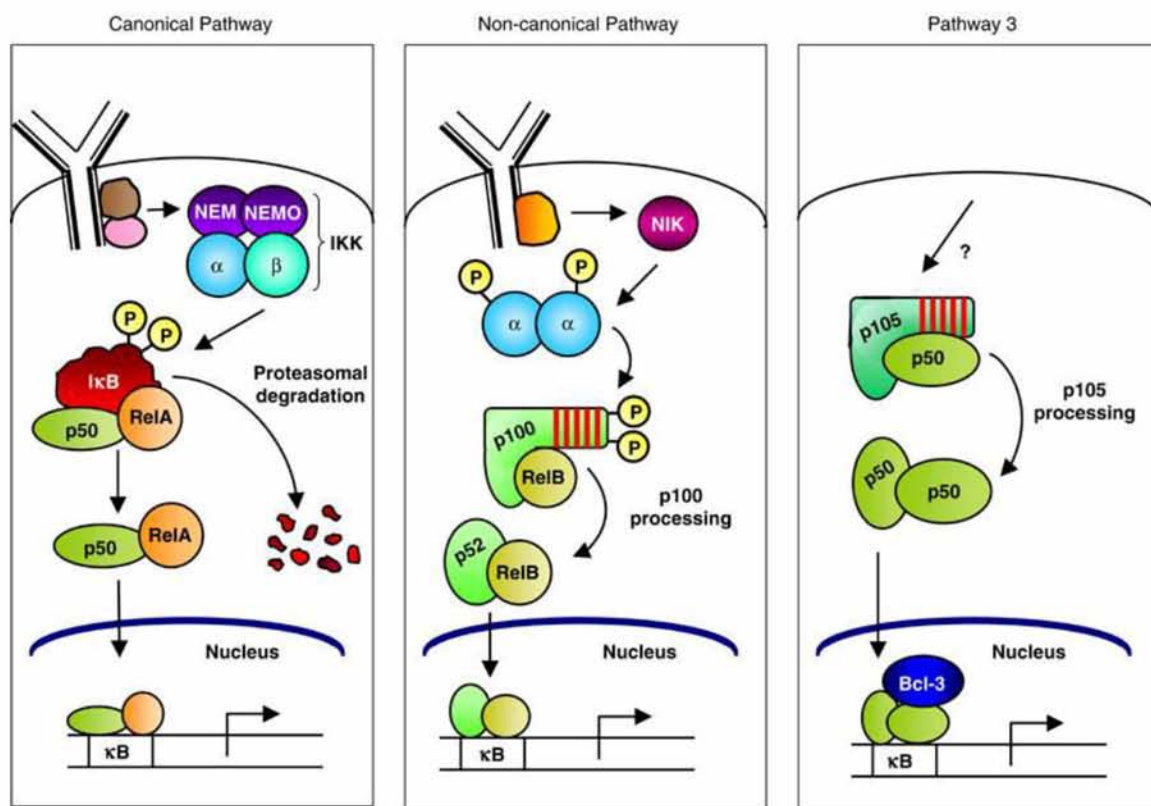
Εικόνα 1.5.4.1 Τα μέλη της οδού NF-κB [171, 172].

Όμως, οι πρωτεΐνες Rel/NF-κB ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες με βάση την αμέσως ακόλουθη αλληλουχία μετά την RHD προς της κατεύθυνση του καρβοξυλικού άκρου. Τα μέλη της πρώτης κατηγορίας, της κατηγορίας NF-κB πρωτεϊνών (p105, p100) έχουν εκτεταμένα καρβοξυλικά άκρα που περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα αλληλουχιών αγκυρίνης, τα οποία δρουν ανασταλτικά για τα ίδια τα πρωτεϊνικά μόρια. Τα μέλη της κατηγορίας NF-κB μετατρέπονται σε μικρότερες ενεργείς πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (το p105 σε p50, το p100 σε p52) μέσω είτε μερικής πρωτεόλυσης ή διακοπής μετάφρασης [172, 173]. Επομένως, τα μέλη της πρώτης κατηγορίας δεν λειτουργούν συνήθως σαν μεταγραφικοί ενεργοποιητές παρά μόνο όταν σχηματίζουν ετεροδιμερή με κάποιο μέρος της δεύτερης κατηγορίας των Rel/NF-κB πρωτεϊνών. Η

δεύτερη κατηγορία, οι πρωτεΐνες Rel, περιλαμβάνει το RelA (p65), RelB και το c-Rel. Αυτές περιέχουν στο καρβοξυλικό τους άκρο περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής, αυστηρά διατηρημένες εξελικτικά [172, 173]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Rel/NF-κB προσδένονται ως διμερή σε ένα μοτίβο αλληλουχίας DNA 9-10bp, που ονομάζονται μοτίβα κB. Όλες οι Rel πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή, εκτός από το RelB που μπορεί να σχηματίζει μόνο ομοδιμερή.

Η δραστηριότητα του NF-κB ελέγχεται κυρίως μέσω των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB. Υπάρχουν διάφορα μέλη της ομάδας των πρωτεϊνών IκB (Εικόνα 1.5.4.1), οι οποίες δείχνουν διαφορετικές συγγένειες για τα διάφορα συμπλέγματα Rel/NFκB, έχουν διαφορετικό έλεγχο λειτουργίας και εξειδικευμένη ιστική έκφραση [172, 173]. Η πλέον καλά μελετημένη αλληλεπίδραση είναι αυτή του IκBα με το διμερές p50/RelA. Η αλληλεπίδραση τους αποτρέπει την ικανότητα του NFκB να προσδέεται στο DNA και έχει ως αποτέλεσμα το σύμπλεγμα NFκB να βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα λόγω ενός ισχυρού σήματος εξόδου από τον πυρήνα στο IκBα. Στην πράξη, το σύμπλεγμα NFκB/IκB βρίσκεται σε μια συνεχή μετακίνηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, αλλά το σήμα εξόδου είναι ισχυρότερο από το σήμα εισόδου στον πυρήνα, διατηρώντας έτσι την δυναμική της σηματοδότησης [173]. Αντίθετα, όταν το NFκB δεν συνδέεται με το IκB, επέρχεται πυρηνική μετακίνηση του ελεύθερου NFκB. Όταν ένα κύτταρο διεγερθεί από μια ποικιλία εξωκυττάρων σημάτων, το NFκB μετακινείται ταχέως στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων-στόχων. Σχεδόν όλα τα σήματα που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NFκB ενέχουν ενεργοποίηση ενός συμπλόκου κινασών σερίνης-θρεονίνης ειδικών για το IκB, το σύμπλοκο αναστολέων του IκB (IκB kinase, IKK). Η IKK στα περισσότερα κύτταρα έχει τουλάχιστον 3 υπομονάδες: IKKα, IKKβ και IKKγ (NEMO). Τα IKKα και IKKβ είναι καταλυτικές υπομονάδες κίνησης, ενώ το IKKγ είναι ρυθμιστική υπομονάδα που λειτουργεί διαγνωστικά και ρυθμιστικά ως προς τη σηματοδότηση για την ενεργοποίηση των καταλυτικών

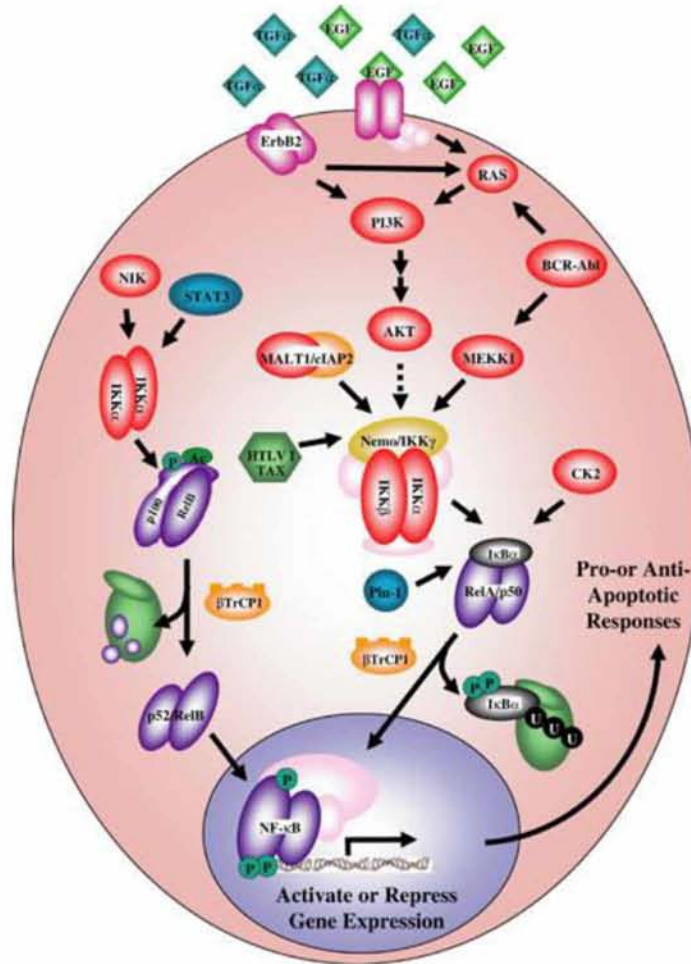
υπομονάδων. Στην κλασική ή κανονική οδό ενεργοποίησης του NF-κΒ, η ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK οδηγεί σε φωσφορυλίωση από το IKKβ δύο σερινικών θέσεων στο αμινοτελικό άκρο του ΙκΒα, το οποίο αποτελεί σήμα για ουβικουτίνωση και πρωτεασωματική αποδόμηση. Στην μη κανονική ή εναλλακτική οδό, το σύμπλεγμα p100/RelB ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση του p100 από ένα ομοδιμερές IKKα (χωρίς την υπομονάδα NEMO), οδηγώντας σε ουβικουτίνωση και μερική πρωτεόλυση του p100, μετατρέποντας το έτσι στο ενεργό p52/RelB κύτταρα. Η εναλλακτική οδός έχει βρεθεί ενεργή σε Β λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα [173-175]. Και στις δύο οδούς, το ελεύθερο σύμπλεγμα NFκΒ εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί μεταγραφικά γονίδια-στόχους (Παράρτημα II). Στην κλασική οδό, ένα από τα γονίδια-στόχοι είναι αυτό που κωδικοποιεί το ΙκΒα. Το νεοσυντιθέμενο ΙκΒα εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με το NFκΒ αποσυνδέοντας το έτσι από το DNA, και το σύμπλεγμα εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα επαναφέροντας έτσι την κατάσταση ισορροπίας (Εικόνα 1.5.4.2) [173].



Εικόνα 1.5.4.2 Σηματοδοτικές οδοί NFκΒ [173].

Πέρα από τα παραπάνω, υπάρχει πληθώρα ενδείξεων ότι ο έλεγχος της οδού NFκB είναι πιο σύνθετη διαδικασία. Για παράδειγμα, το RelA και το p50 ρυθμίζονται από ουβικουτίνωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμουλίωση, οξείδωση/αναγωγή, και προπυλ-ισομερίωση. Επιπλέον, σαν αποτέλεσμα της διέγερσης του NFκB (τουλάχιστον μέσω TNF), επάγεται ενεργοποίηση και του IKKα. Το τελευταίο εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με θέσεις κB γονιδιακών προαγωγών/ενισχυτών και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3, η οποία επάγει την μεταγραφή των κB γονιδίων-στόχων. Στην πράξη, σε αντιστοιχία με τους εξωκυττάριους διεγέρτες του NFκB, υπάρχει ένας αριθμός ενδοκυττάριων συν- ενεργοποιητών, όπως PKA, CPB ακετυλάσες, p300, p/CAF και p160 πρωτεΐνες. Αντίστοιχα, υπάρχουν ενδοκυττάριοι καταστολείς του NFκB, όπως είναι η οικογένεια αποακετυλασών ιστονών (histone deacetylase, HDAC) [176].

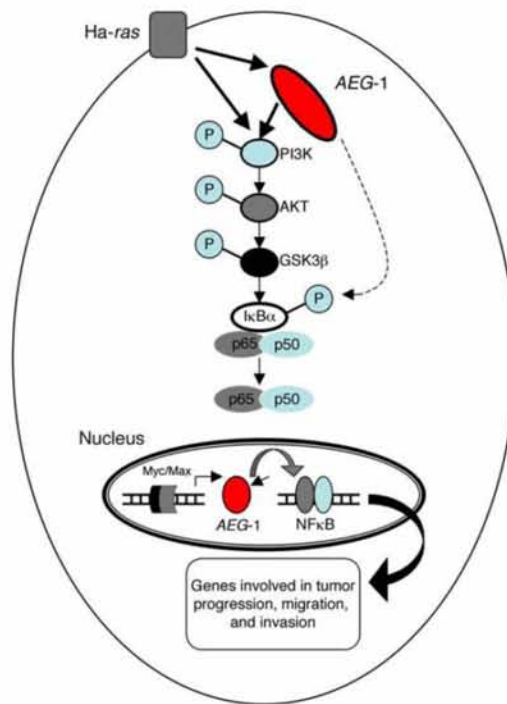
Ο παράγοντας μεταγραφής NFκB ελέγχει πολλές διαδικασίες που επηρεάζουν την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου, όπως την ανοσία, τη φλεγμονώδη αντίδραση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης σχετικών γονιδίων-στόχων. Η ενεργοποίηση του NFκB στην καρκινογένεση γίνεται μέσω ογκοπρωτεϊνών (π.χ. Her2/neu, H-Ras, Bcr-Abl) διαμεσολαβούμενη μέσω της κλασσικής οδού ενεργοποίησης και του συμπλέγματος IKK. Επίσης, μπορεί να γίνει και μέσω άλλων οδών σηματοδότησης, όπως του PI3K/AKT (μέσω IKKα), από τον PDGF ή μέσω κυτοκινών όπως η IL-6 (Εικόνα 1.5.4.3) [177].



Εικόνα 1.5.4.3 Η ενεργοποίηση της οδού NFκB από ογκογόνα σήματα [177].

1.5.4.4 NF-κB και πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

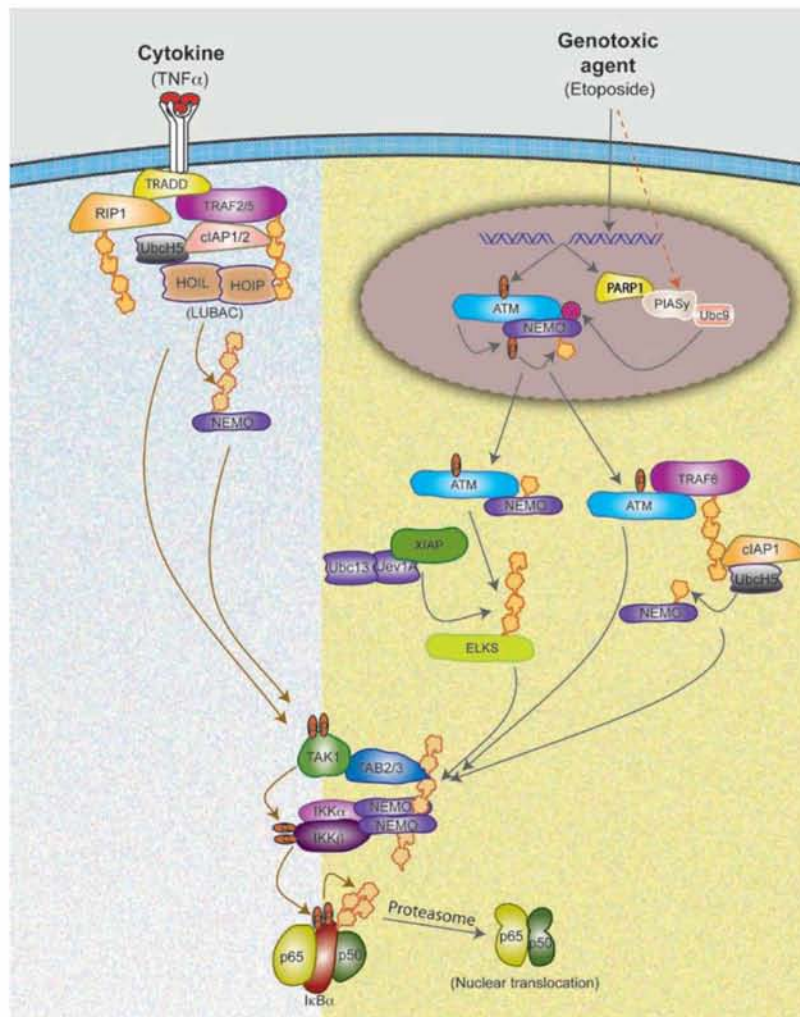
Η οδός του NF-κB είναι σταθερά ενεργοποιημένη στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, και συνδέεται με τη σηματοδότηση μέσω PI3K/AKT που ξεκινά από τη υπερέκφραση φυσιολογικού και μεταλλαγμένου EGFR. Επιπλέον, η απαλοιφή του IκB έχει παρόμοιο αποτέλεσμα στην παθογένεση του γλοιοβλαστώματος και σχετίζεται με βραχεία επιβίωση των ασθενών [178]. Επίσης ο παράγοντας Astrocyte elevated gene (AEG)-1 που υπερκφράζεται στην πλειοψηφία των γλοιοβλαστωμάτων χρησιμοποιεί την οδό NF-κB για την επαγωγή του διηθητικού φαινοτύπου της νόσου (Εικόνα 1.5.4.4.1) [179].



Εικόνα 1.5.4.4.1 Μοντέλο ενεργοποίησης του NF-κΒ από τον AEG-1 [179].

Η έκφραση πληθώρας γονιδίων που είναι μεταγραφικοί στόχοι του NFκΒ, όπως κυτοκίνες και χημειοκίνες (IL-8, IL-11, IL-6, IL-1β, IL-15, CCL2), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1), αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2, Bcl-xL) και προσκολλητικά μόρια (CD44) επηρεάζουν τη διηθητική ικανότητα και τη χημειοανθεκτικότητα στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος.

Ένας κύριος μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κΒ είναι η επαγόμενη από τη ΧΜΘ της βλάβης του DNA, η οποία κατευθύνεται από τις κινάσες ATM και NEMO (NF-κΒ essential modulator, IKK-γ) (Εικόνα 1.5.4.4.2) [180]. Ο ανταγωνισμός του NF-κΒ σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος αυξάνει τη χημειοευαισθησία σε διάφορα χημειοθεραπευτικά *in vitro* [181]. Σε κλινικό επίπεδο, η ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω Tumor necrosis factor-α–induced protein 3 (TNFAIP3) σχετίζεται με την αντίσταση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες και οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση [182].



Εικόνα 1.5.4.4.2 Διακριτά και κοινά βήματα στη διαδικασία ενεργοποίησης του NF-κΒ μέσω TNF-α και παραγόντων που επάγουν βλάβες στο DNA [180].

Η αναστολή της ενεργοποίησης του NFκΒ μέσω της μη αποδόμησης και σταθεροποίησης του ΙκΒ που επιτυγχάνεται με τους αναστολείς πρωτεασώματος όπως το bortezomib έχει κυτταροτοξικό αποτέλεσμα στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος με χαμηλή τοξικότητα για τα φυσιολογικά αστροκύτταρα και μπορεί να αναστρέψει τον κακοήθη φαινότυπο που προάγεται από την οδό NFκΒ [178].

2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

2.1 Το πειραματικό μοντέλο

Οι προσπάθειες για τη βελτίωση της κακής έκβασης των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, η οποία σε μεγάλο βαθμό προέρχεται από την μεσολαβούμενη από την MGMT αντίσταση στην TMZ έχουν επικεντρωθεί στην φαρμακευτική αναστολή της άμεσης επιδιόρθωσης του DNA [183]. Η O6-BG αποτελεί τον πιο συχνά μελετημένο, άμεσο αναστολέα της MGMT σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο. Ωστόσο, η αυξημένη μυελοτοξικότητα που προκαλεί η συγχορήγηση TMZ και O6-BG σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα επίπεδα και η ενεργότητα της MGMT ανακάμπτουν εντός 24ώρου από την διακοπή της χορήγησης O6-BG αποτελούν μέχρι στιγμής ανασταλτικούς παράγοντες για την περαιτέρω κλινική εφαρμογή αυτού του σχήματος [131, 184, 185].

Ο NF-κB είναι ένα μεταγραφικός παράγοντας κλειδί για τη χημειοανθεκτικότητα του γλοιοβλαστώματος δεδομένου ότι επάγει μεταγραφικά την έκφραση της MGMT [116]. Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος του p53 που καταστέλλει τη μεταγραφή της MGMT. Όχι μόνο η απώλεια της έκφρασης του φυσιολογικού p53, λόγω μεταλλάξεων που είναι συχνές στην εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος, αλλά και η δυνατότητα επαγωγής της MGMT από το μεταλλαγμένο p53 συνιστούν επιπλέον μηχανισμούς ελέγχου της χημειοαντοχής σε αλκυλιωτικούς παράγοντες [186, 187].

Η δράση κάθε μορίου MGMT ολοκληρώνεται με την πρωτεολυτική αποδόμηση του ενζύμου επομένως η αντίσταση του κυττάρου στη ΧΜΘ είναι άμεσα εξαρτώμενη από τη δυνατότητα επαγωγής της έκφρασης νέας MGMT κάθε φορά που προηγείται έκθεση σε παράγοντες που καταναλώνουν τα βασικά επίπεδά της όπως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες (TMZ) ή/και οι άμεσοι αναστολείς του ενζύμου (O6-BG) .

Από την άλλη πλευρά, το σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεασώματος, εκτός από την MGMT, είναι υπεύθυνο για την πρωτεολυτική αποδόμηση ή/και ενεργότητα πληθώρας άλλων πρωτεϊνών, αρκετές από τις οποίες συμβαίνει να είναι μεταγραφικοί ή σηματοδοτικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση της MGMT, όπως NF-κB, p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p53, AKT, STAT3 και HIF-1α [116, 117, 122, 188].

Το σκεπτικό της αναστολής του πρωτεασώματος ως στρατηγικής για την υπέρβαση της χημειοαντοχής του γλοιοβλαστώματος ήταν και παραμένει αντικείμενο κλινικής έρευνας, με ήδη ανακοινωμένα αποτελέσματα φάσης I μελέτης συγχορήγησης με TMZ και ΑΚΘ [165]. Ωστόσο, τα μοριακά γεγονότα που υπεισέρχονται σ' αυτό το συνδυασμό και ιδιαίτερα η επίδραση στη ρύθμιση της MGMT δεν έχουν μελετηθεί.

2.2 Στόχοι έρευνας

Η πειραματική αυτή εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη του ρόλου της οδού ουβικουτίνης πρωτεασώματος στην επαγόμενη από την MGMT αντίσταση στην TMZ, που αποτελεί την καθιερωμένη ΧΜΘ για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος.

Βασικό ζητούμενο είναι να διευκρινήσει συγκεκριμένα: α) τους MGMT-εξαρτώμενους μηχανισμούς που καθορίζουν τη δραστικότητα και την ανάπτυξη αντοχής στη συνδυασμένη χορήγηση TMZ και άμεσου αναστολέα της MGMT όπως η βενζυλγουανίνη, β) αν το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα που επιφέρει η αναστολή του πρωτεασώματος με τη χρήση μπορτεζομίμπης σχετίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, με μειορρύθμιση της MGMT, και γ) αν η συνδυασμένη χρήση TMZ και αναστολής του πρωτεασώματος με τη χρήση μπορτεζομίμπης έχει επιπρόσθετο όφελος στην αναστολή της κυτταρικής επιβίωσης και στην απόπτωση από

αυτό που προσφέρει η TMZ, καθώς και η διερεύνηση των μηχανισμών σε μοριακό επίπεδο με τους οποίους τα φάρμακα αυτά και η διαδοχική χορήγηση του συνδυασμού τους εμπλέκονται στους κυριότερους άξονες ρύθμισης της MGMT στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος.

2.3 Ερευνητική υπόθεση

A. Δεδομένου ότι πρώτον η χημειοαντοχή των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος στην TMZ οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ενεργοποίηση του NF-κB και στην ύπαρξη μεταλλαγμένου p53, και δεύτερον ότι αμφότεροι NF-κB και mt p53 επάγουν μεταγραφικά την MGMT, τότε η ανάκαμψη των επιπέδων MGMT μετά τη διακοπή της ταυτόχρονης χορήγησης BG και TMZ απαιτεί αύξηση των επιπέδων των μεταγραφικών ενεργοποιητών της (NF-κB και mt p53) πάνω από το βασικό επίπεδο έκφρασής τους ώστε να παραχθεί εξ' ολοκλήρου νέα MGMT μετά την πλήρη εξουδετέρωση και αποδόμησή της.

B. Η αναστολή του πρωτεασώματος με τη χρήση μμπορτεζομίμπης σε δόσεις που μειώνουν την επιβίωση και αυξάνουν την απόπτωση των κυττάρων θα πρέπει να οδηγεί σε μειωμένη έκφραση MGMT: α) μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του NF-κB, ο οποίος εκτός από κεντρικός στόχος του πρωτεασώματος είναι και βασικός μεταγραφικός ενεργοποιητής της MGMT β) μέσω γενικευμένης αναστολής της μετάφρασης από τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης eIF2α που είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μετάφρασης.

Γ. Δεδομένου ότι η αναστολή του πρωτεασώματος με τη χρήση μμπορτεζομίμπης επηρεάζει σηματοδοτικές οδούς που εξαρτώνται από τους παράγοντες: NF-κB, p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p53, AKT, STAT3 και HIF-1α, οι οποίοι αποτελούν ταυτόχρονα και ρυθμιστές της έκφρασης της MGMT, η αποτελεσματικότητα της διαδοχικής

συγχορήγησης με TMZ θα καθορίζεται από τα επίπεδα της MGMT και των ρυθμιστών της, η μείωση των οποίων κατευθύνει τη σειρά χορήγησης και μπορεί να διαφέρει από κυτταρική σειρά σε κυτταρική σειρά ανάλογα με το βασικό ή/και επαγωγίμο επίπεδο έκφρασής τους που συνιστά και διαφορετικό βαθμό χημειοαντοχής.

2.4 Κλινικό ενδιαφέρον και δυνατότητες κλινικής εφαρμογής

Το έναυσμα για τη μελέτη αυτή έδωσε αφενός η γενικότερη τάση στη σύγχρονη θεραπευτική της ογκολογίας για τη χρησιμοποίηση νέων φαρμάκων στοχευμένης δράσης, προϊόν της έρευνας στη μοριακή καρκινογένεση, και αφετέρου η συνειδητοποίηση ότι η μεμονωμένη στόχευση μίας γενετικής βλάβης στο καρκινικό κύτταρο, εκτός από τις σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες το καρκινικό κύτταρο εξαρτάται πλήρως από τη βλάβη αυτή, δίνει πενιχρά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια συνδυασμοί των θεραπειών μοριακής στόχευσης είτε με κλασσικά χημειοθεραπευτικά είτε με άλλες στοχευμένες θεραπείες είναι μία πιο ελπιδοφόρα στρατηγική.

Σ' αυτό το πλαίσιο, η διερεύνηση των MGMT-εξαρτώμενων μηχανισμών αντίστασης στη συγχορήγηση του συνδυασμού TMZ και O6-BG, ο οποίος έχει ήδη μελετηθεί εκτενώς κλινικά, μπορεί όχι μόνο να εξηγήσει σε μοριακό επίπεδο τη μειωμένη αποτελεσματικότητα αλλά και να αποκαλύψει νέους θεραπευτικούς στόχους, όπως το mt p53.

Αφετέρου, η μελέτη της επίδρασης του πρωτεασώματος στην ρύθμιση της MGMT και στην ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην τεμοζολομίδη μπορεί να προσφέρει νέα δεδομένα για το συνδυασμό TMZ-αναστολέα πρωτεασώματος που όχι μόνο να δικαιολογούν αλλά και να ερμηνεύουν τη χρήση του ως δυνητικά νέα θεραπευτική επιλογή για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, δεδομένου ότι έχει ήδη δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες

χωρίς να έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί δράσης καθώς και κατά πόσο αυτοί μεταβάλλονται σε διαφορετικές αλληλουχίες χορήγησης των φαρμάκων.

Τα συμπεράσματα από την έρευνα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πολύμορφου γλοιοβλαστώματος σχεδιάζεται να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω έρευνα *in vivo* με απώτερο στόχο την κλινική τους εφαρμογή. Η κατανόηση της ρύθμισης των μηχανισμών που εμπλέκονται στην MGMT-εξαρτώμενη χημειοαντοχή από διαφορετικούς συνδυασμούς TMZ και μπορτεζομίμπης μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερο σχεδιασμό κλινικών μελετών, ο οποίος να αντικατοπτρίζει τα γεγονότα που επισυμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο. Έτσι θα καταστεί δυνατή η ορθότερη ταξινόμηση των ασθενών σε διαφορετικές υποομάδες χημειοευαισθησίας ανάλογα με το βασικό επίπεδο όχι μόνο της MGMT αλλά και των οδών που ρυθμίζουν την έκφρασή της. Τελικά αυτό θα επιτρέψει την ορθότερη αλληλούχηση του φαρμακευτικού συνδυασμού με προσανατολισμό την αναστροφή της πρωτογενούς ή/και την πρόληψη της δευτερογενούς χημειοαντοχής στο γλοιοβλάστωμα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Καλλιέργεια κυττάρων και αντιδραστήρια

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος T98G (φέρουσα μεταλλαγμένο p53 και με υψηλή έκφραση MGMT) και U87 MG (με φυσιολογικό p53 και μικρή έκφραση MGMT λόγω μερικής μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου της) αγοράστηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιεργειών (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Health Protection Agency, Salisbury, UK). Όλα τα πειράματα έγιναν εντός 6 μηνών από την απόκτηση της κάθε κυτταρικής σειράς. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, UK), εμπλουτισμένο με 10% θερμικά

απενεργοποιημένο βόειο εμβρυϊκό όρό (FBS) (GIBCO, UK), 5% L-γλουταμίνη (GIBCO, UK) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Euroclone, UK) στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε ειδικό κυτταρικό επωαστήρα (Thermo Electron, UK). Για τα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που βρίσκονταν σε πυκνότητα 70% με 80% σε φλάσκες καλλιέργειας 25 ml. Καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας τους τα κύτταρα ελέγχονταν για μικροβιακές επιμολύνσεις με έλεγχο σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40CFL, Carl Zeiss, Germany).

Ο άμεσος αναστολέας-ψευδοϋπόστρωμα της MGMT, O6-βενζυλγουανίνη (O6-benzylguanine) αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich, UK, και διαλυόταν σε απιονισμένο H₂O και τελικά σε θρεπτικό υλικό πριν από κάθε χρήση. Η τεμοζολομίδη (Temozolomide, Temodal[®]) αγοράστηκε από τη Merck, UK και διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) σε συγκέντρωση 100mM, που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C ως stock διάλυμα και διαλυόταν σε θρεπτικό υλικό πριν από κάθε χρήση. Ο αναστολέας πρωτεασώματος μπορτεζομίμη (Bortezomib, VELCADE[®]) αγοράστηκε από τη Janssen-Cilag Pharmaceuticals, Ελλάδα και διαλυόταν σε απιονισμένο H₂O και τελικά σε θρεπτικό υλικό πριν από κάθε χρήση. Το κεκαθαρμένο ένζυμο 20S πρωτεασώματος προήλθε από την Chemicon International, USA. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση της μεθόδου ποσοτικοποίησης Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.) για τα προϊόντα ολικής κυτταρικής λύσης, και με το BCA Protein Kit (PIERCE Endogen, UK) για τα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα. Οι μετρήσεις ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών έγιναν σε ειδικό φασματοφωτόμετρο (SmartSpec Plus spectrophotometer, Bio-Rad).

3.2 Συνθήκες επώασης φαρμάκων

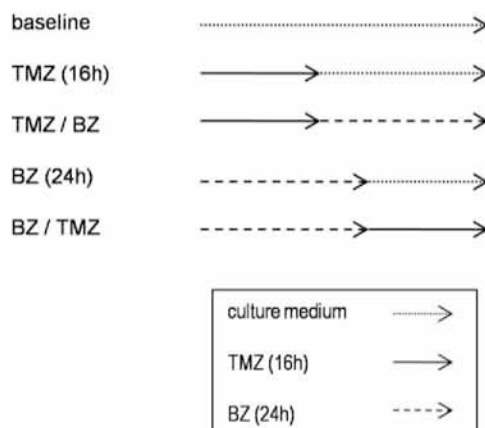
Στα αρχικά πειράματα, αξιολογήθηκε ο συνδυασμός TMZ και O6-BG. Τα T98G κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 16 ώρες με 100 μM TMZ παρουσία ή απουσία 100 μM BG που χορηγήθηκε 1 ώρα πριν και καθ'όλη τη διάρκεια της έκθεσης σε TMZ. Μετά την πάροδο των 16 ωρών, τα κύτταρα είτε υπέστησαν άμεση επεξεργασία είτε καλλιεργήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό για επιπλέον 24 ώρες.

Επίσης, αξιολογήθηκε η δράση της μπορτεζομίμπης ως μονοθεραπεία. Τα T98G κύτταρα καλλιεργήθηκαν με BZ για 24 ώρες σε λογαριθμικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεταξύ 10^{-9} and 10^{-6} M και για τα υπόλοιπα πειράματα μονοθεραπείας με BZ επιλέχθηκε η συγκέντρωση 0.1 μM για 24 ώρες.

Τέλος, αξιολογήθηκε ο συνδυασμός TMZ και BZ σε διαδοχική χορήγηση και σύγκριση με τη δράση κάθε φαρμάκου ξεχωριστά για την ίδια αντίστοιχη διάρκεια έκθεσης κάθε φαρμάκου. Για τα πειράματα πρώιμης χορήγησης BZ, τα T98G και U87 κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα PBS (Phosphate-buffered Saline). Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό με ή χωρίς την προσθήκη 100 μM TMZ για 16 ώρες. Για τα πειράματα καθυστερημένης χορήγησης BZ, τα T98G και U87 κύτταρα εκτέθηκαν σε 100 μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα PBS. Τελικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό με ή χωρίς την προσθήκη 0.1 μM BZ για 24 ώρες (Εικόνα 3.2).

Στις συνθήκες επώασης με TMZ, η τελική συγκέντρωση DMSO στο θρεπτικό καλλιεργητικό υλικό ήταν < 0.1%/v. Για όλες τις πειραματικές συνθήκες, T98G και U87 κύτταρα καλλιεργούμενα χωρίς φάρμακα για τους αντίστοιχους χρόνους χρησίμευσαν ως

μάρτυρες. Επιπλέον, κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με 0.1% DMSO για 16 ώρες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας για την TMZ.



Εικόνα 3.2 Σχήματα διαδοχικής χορήγησης TMZ και BZ.

3.3 Δοκιμασία μεθυλ-τριαζολυλ-τετραζολίου (MTT)

Κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών τέθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων (96 well plates) με πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα ανά θέση και αφέθηκαν να προσκολληθούν για 24 ώρες στους 37°C . Στη συνέχεια εκτέθηκαν στους διάφορους φαρμακευτικούς συνδυασμούς για τον κατάλληλο χρόνο, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Ακολούθως, 10 μl του αντιδραστηρίου MTT (R&D Systems, U.K.) προστέθηκαν σε κάθε θέση και τα τρυβλία επώαστηκαν για ακόμα 4 ώρες στους 37°C . Τελικά 100 μl του αντιδραστηρίου ανίχνευσης MTT (R&D Systems, UK) προστέθηκαν σε κάθε θέση και τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως (overnight). Οι μετρήσεις της απορρόφησης του φωτός έγιναν σε συσκευή πολλαπλών μετρήσεων 1420 Victor (Wallac, Finland) σε μήκος κύματος 570 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nm. Οι μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

3.4 Ανάλυση αλληλεπίδρασης φαρμάκων

Η αλληλεπίδραση μεταξύ TMZ και BZ στους διάφορους συνδυασμούς που χρησιμοποιήθηκαν στις δύο κυτταρικές σειρές αναλύθηκε με το λόγο R με βάση τα δεδομένα της δοκιμασίας MTT, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [189, 190]. Ο λόγος R υπολογίζεται ως εξής: $R = \text{Επιβίωση}[\text{συνδυασμός}] / \text{Επιβίωση}[\text{TMZ}] \times \text{Επιβίωση}[\text{Bortezomib}]$. Αν $R < 0.8$ η δράση του συνδυασμού είναι συνεργική, αν η τιμή του R βρίσκεται μεταξύ 0.8 και 1.2 θεωρείται προσθετική ενώ αν $R > 1.2$ είναι ανταγωνιστική.

3.5 Δοκιμασία κατακερματισμού του DNA

Ο κατακερματισμός του DNA προσδιορίστηκε με ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδο (Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) (Roche Diagnostics, Γερμανία). Μετά από έκθεση σε βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) για 18 ώρες τα T98G και U87 κύτταρα τέθηκαν σε τρυβλία με πυκνότητα 10^5 κύτταρα ανά θέση και εκτέθηκαν στους διάφορους φαρμακευτικούς συνδυασμούς για τον κατάλληλο χρόνο, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα λύθηκαν με το διάλυμα του kit (Roche Diagnostics, Γερμανία). Τα κυτταρικά λύματα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε μια προ-επικαλυμένη πλάκα μικροτιτλοποίησης και αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA. Μετά από επώαση για μία ώρα τέθηκε εξωνουκλεάση για 30 λεπτά. Μετά την προσθήκη διαλυμάτων anti-BrdU-peroxidase και υποστρώματος, ο κατακερματισμός του DNA μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά (σε μήκος κύματος at 450 nm, με τα 690 nm ως κύμα αναφοράς). Τα σημασμένα με BrdU θραύσματα που μετρήθηκαν στα κυτταρικά λύματα ήταν υποδηλωτικά του αποπτωτικού κατακερματισμού του DNA. Ένας θετικός μάρτυρας προετοιμάστηκε για κάθε κυτταρική σειρά μετά από διαλυτοποίηση του γενωμικού DNA από ενδογενείς νουκλεάσες, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Roche Diagnostics,

Γερμανία), και χρησιμοποιήθηκε για τη σχετική ποσοτικοποίηση του βαθμού της απόπτωσης σε κάθε πειραματική συνθήκη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από τρία ξεχωριστά πειράματα.

3.6 Παρασκευή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα

Για χρήση προς πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση (western blotting), έγινε συλλογή κυττάρων σε λογαριθμική φάση κυτταρικής ανάπτυξης. Πριν από κάθε κυτταρική λύση γινόταν μέτρηση κυττάρων με χρήση αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer haemocytometer, Fisher, UK). Τα προς λύση κύτταρα αποκολλήθηκαν προσεκτικά με χρήση οργάνου απόξεσης κυττάρων και θρυψίνη και ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBS. Τα κυτταρικά ιζήματα διαλύθηκαν σε διάλυμα λύσης με 10 mM τρις-υδροχλωρίου, 50 mM EDTA, 150 mM χλωριούχου νατρίου, 10% γλυκερίνης, 1% Triton X-100 και τους αναστολείς πρωτεασών λιουπεπτίνη, απροτινίνη και PMSF (φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλ-φθόριο).

Για τον έλεγχο δραστηριότητας 20S πρωτεασώματος ετοιμάσθηκαν ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα με διάλυμα 0.5% CHAPS (3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane sulfonate) που δεν επηρέασε την ενζυματική δραστηριότητα του πρωτεασώματος.

3.7 Παρασκευή κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα

10^6 κύτταρα αφαιρέθηκαν προσεκτικά με χρήση οργάνου απόξεσης κυττάρων και θρυψίνης, πλύθηκαν σε ψυχρό PBS και συγκεντρώθηκαν σε 400μl διαλύματος ψυχρής λύσης (διάλυμα A) που εμπλουτίσθηκαν με 10μg/ml μείγματος αναστολέων πρωτεασών και στη συνέχεια επώασθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά. Προστέθηκε Nonidet (NP-40) 10% για τη

λύση των κυττάρων που τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα και φυγοκεντρήθηκαν για 20 δευτερόλεπτα στους 4°C σε 13.000 rpm. Το επιπλέον υπόστρωμα που περιείχε τα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα φυλάχθηκε στους -80°C. Το ίζημα επανατοποθετήθηκε σε 100μl διαλύματος εκχύλισης (διάλυμα Β) για 20 λεπτά σε πάγο. Το πυρηνικό εναιώρημα στη συνέχεια υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 13.000 rpm, και τα επιπλέοντα πυρηνικά εκχυλίσματα αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Διάλυμα Α: 10 mM HEPES pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, NaV (βαναδικό νάτριο), κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών, 0.2 mM PMSF, 10% γλυκερόλη, H₂O

Διάλυμα Β: 10 mM HEPES pH 7.5, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, NaV (βαναδικό νάτριο), κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών, 0.2 mM PMSF, 25% γλυκερόλη, NP-40 10%, H₂O

3.8 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας 20S πρωτεασώματος

Η δραστηριότητα χυμοθρυψίνης του 20S πρωτεασώματος μετρήθηκε στα ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα με τη χρήση μιας εμπορικά διαθέσιμης φθοριομετρικής μεθόδου που βασίζεται στο φθορίζον υπόστρωμα 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) (Chemicon International, USA). Επιγραμματικά, η δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστηριότητας εκτελέστηκε σε τρυβλίο 96 θέσεων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Σε κάθε θέση δείγματος προς ανάλυση τέθηκαν 10μl συμπυκνωμένου (10x) ρυθμιστικού διαλύματος, 10 μl του πρωτεασωμικού υποστρώματος LLVY-AMC (Λευκίνη-λευκίνη-βαλίνη-τυροσίνη-7-αμινο-4-μεθυλ-κουμαρίνη), 30μl του προς ανάλυση δείγματος και 50 μl αποσταγμένου ύδατος. Ο συνολικός όγκος ήταν 100 μl. Στις θέσεις-μάρτυρες με υπόστρωμα αντί για δείγμα τέθηκαν 20 μl επιπλέον αποσταγμένου ύδατος ώστε να συμπληρώνεται και πάλι ο συνολικός όγκος των 100 μl ενώ στις θέσεις-μάρτυρες χωρίς

υπόστρωμα τέθηκαν 90μl αποσταγμένου ύδατος αντί για δείγμα και υπόστρωμα ώστε να συμπληρώνεται ο συνολικός όγκος των 100 μl. Τα τρυβλία επώαστηκαν για μία ώρα στους 37°C. Οι μετρήσεις έγιναν σε μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac™ με μήκος κύματος διέγερσης 380nm και μήκος κύματος εκπομπής 490nm. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση των τιμών των μαρτύρων με και χωρίς υπόστρωμα. Όλα τα πειράματα και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές. Η φθοριομετρική καταγραφή της ενζυματικής δραστηριότητας σταθερής κατάστασης (baseline) εκφράσθηκε σε RFU/μg της συνολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές συγκρίθηκαν έναντι μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε για το φθορίζον υπόστρωμα (LLVY-AMC) και μιας καμπύλης δραστηριότητας κεκαθαμένου πρωτεασώματος 20S που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι αλλαγές στην πρωτεασωμική δραστηριότητα μετά τις διάφορες επώσεις εκφράσθηκαν ως ποσοστιαία αύξηση ή μείωση σε σχέση με τη δραστηριότητα σταθερής κατάστασης κάθε κυτταρικής σειράς.

3.9 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden) και βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue G250 σε όξινο περιβάλλον. Κατά τη συμπλοκοποίηση το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Bio-Rad). Μετά την ανάμιξη του αντιδραστηρίου με H₂O σε αναλογία 1/4 έως τελικό όγκο 1 ml, προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετράται στα 595 nm. Με βάση την

απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

3.10 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της Hoeffer και της Bio-Rad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκε πρώτα 8-10% πηκτής διαχωρισμού (separating gel): 8-10% ακρυλαμίδιο, 0,375 M Tris-Cl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,04% υπερθειικό αμμώνιο και 0,02% TEMED σε H₂O αφήνοντας περίπου 2 cm από την κορυφή των πλακών για την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel): 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,08% υπερθειικό αμμώνιο, 0,04% TEMED σε H₂O. Πάνω από την πηκτή επιστοιβάξης τοποθετήθηκε χτενάκι και όταν η πηκτή έπηξε τοποθετήθηκαν οι πλάκες στη συσκευή, η συσκευή πληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 0,38 M glycine, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Αμέσως

μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προηγουμένως προστεθεί διάλυμα φόρτωσης (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0,05% κυανό βρωμοφαινόλης, 25 mM DTT) και είχαν θερμανθεί στους 95°C για 5 min, με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton και ηλεκτροφορήθηκαν στα 150V μέχρι η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης να φτάσει στο τέλος της πηκτής.

3.11 Πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση

30μg πρωτεϊνικών κυτταρολυμάτων από κάθε δείγμα (ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ή πυρηνικά/κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα) τοποθετήθηκαν σε γέλη πυκνότητας 4-12% Bis-Tris polyacrylamide (Invitrogen, UK) και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υπό αναγωγικές συνθήκες σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (X Cell Sure Lock Mini Cell & XCell II Blot Module, Invitrogen). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν (αποτυπώθηκαν) από την γέλη σε μεμβράνη PVDF (Immun-Blot PVDF membrane, Bio-Rad) με την βοήθεια συσκευής μεταφοράς (XCell Sure Lock Mini Cell & XCell II Blot Module, Invitrogen). Η επιτυχία της πρωτεϊνικής μεταφοράς ελέγχθηκε με χρώση με διάλυμα Ponceau S. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με 5% μη-λιπαρό γάλα στους 4°C για 3 ώρες. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS/Tween τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε φορά. Οι μεμβράνες στην συνέχεια επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα για ένα βράδυ στους 4°C με ελαφρά ανάδευση (Shaker VXR Vibrax, IKA-Janke and Kunhel, Germany). Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της υπομονάδας p65 του NFκB, του IκB-α, του p53, της κασπάσης-3, του STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, USA), ανθρώπινου HIF-1α (BD Biosciences, USA), φωσφορυλιωμένου p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr 202/Tyr 204), p44/42 MAPK (Erk1/2), φωσφορυλιωμένου AKT (Ser 473), ολικού AKT, φωσφορυλιωμένου STAT3 (Tyr705), φωσφορυλιωμένου eIF2α (Ser51) και ολικού eIF2α (Cell Signaling, USA).

Πρωτογενή μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της ακτίνης (Sigma Aldrich, UK) και ιστόνης 2B (Abcam, UK) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ισοφόρτωσης για τα ολικά και πυρηνικά λύματα. Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS/Tween.

Οι επωάσεις με τα κατάλληλα πρωτογενή αντισώματα έγιναν ολονύχτια (overnight) σε αραιώση 1:500 ενώ με τα δευτερογενή αντισώματα έγιναν σε διάλυση 1:2500 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS/Tween για άλλες τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκε ανίχνευση χημειοφωταύγειας (ECL detection reagent, Amersham Biosciences) με αυτοακτινογραφία σε ακτινογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT AR Film, Sigma Aldrich, UK). Η επιβεβαίωση της ειδικότητας της ανοσοαποτύπωσης έγινε με υπολογισμό του μοριακού βάρους της αποτυπωμένης πρωτεΐνης με χρήση πρότυπων πρωτεϊνικών δεικτών μοριακού βάρους (Precision Plus Kaleidoscope standards, Bio-Rad). Το κάθε πείραμα ανοσοαποτύπωσης επαναλήφθηκε 3 φορές.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα μεταφοράς: 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% Methanol, 1.3 mM SDS pH 9.2

Ponceau S 0,2%: 2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ, σε τελική αραιώση 1:10

PBS (Phosphate Buffer Saline): 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2,67 mM KCl pH 7,4

PBS-Tween 20: 0,1% Tween 20 σε διάλυμα PBS

3.12 Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού

Με τη χρήση τεχνικών όπως ο ανοσοφθορισμός είναι δυνατός ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Είναι δυνατή η παρατήρηση του υποκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι σε αυτές. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι συζευγμένα με μια φθορίζουσα ουσία (άμεσος ανοσοφθορισμός) είτε να αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει τη φθορίζουσα ομάδα (έμμεσος ανοσοφθορισμός). Και στις δύο περιπτώσεις το σήμα του φθορισμού υποδεικνύει το που εντοπίζεται η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος μας μέσα στα κύτταρα. Επιπλέον, ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος και η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ενδοκυτταρική ανίχνευση της υπομονάδας p65 του NF-κΒ. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm (την μέρα του πειράματος τα κύτταρα κάλυπταν το 60%-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας). Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με PBS/3% φορμαλδεύδη για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα πλύση με PBS και κατεργασία με μίγμα PBS /1% Triton X-100 για 15 λεπτά στους 4°C προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων. Στη συνέχεια έγινε κορεσμός των μη ειδικών θέσεων με PBS-0.1% Tween 20-3% BSA για 1 ώρα στους 40°C. Το πρώτο αντίσωμα προστέθηκε για μια ώρα σε PBS-0.1% Tween/1% BSA, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με 3 διαδοχικά πλυσίματα με PBS 0,1% Tween/1% BSA. Ακολούθησε επώαση με το 2ο αντίσωμα (έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με FITC σε αραιώση 1:1000) για 30 λεπτά στους 4°C. Το αντίσωμα απομακρύνθηκε με διαδικασία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το πρώτο αντίσωμα. Ακολούθησε μια τελευταία

πλύση με PBS και στιγμιαία εμβάπτιση σε H₂O. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες αφού είχαν προστεθεί 2 μl υλικού σταθεροποίησης του φθορισμού (Vectashield, Vector laboratories) το οποίο περιείχε και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδόλη) η οποία έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο DNA. Τέλος, ακολούθησε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axioscope 40 Zeiss, με κάμερα Leica DFC480).

3.13 Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση ενός εμπορικού kit (Bio-Rad, USA). Συνοπτικά, 10⁶ κύτταρα σε θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης 1.5 ml σε πάγο και φυγοκεντρήθηκαν στις 13,000–16,000 x g για 5 λεπτά. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο με πιπέτα, διατηρώντας 10–20 μl υπολειμματικού υγρού μαζί με το ίζημα τα οποία ανακινήθηκαν σε Vortex μέχρι την πλήρη διάλυση του ιζήματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl διαλύματος λύσης του RNA και η συνολική ποσότητα μεταφέρθηκε μετά από ανάδευση για 3 φορές σε σωλήνα φυγοκέντρησης 1.5 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν με ανάδευση 100 μl διαλύματος κατακρήμνισης των πρωτεϊνών και του DNA και ο σωλήνας φυγοκέντρησης αφού παρέμεινε για 5 λεπτά στον πάγο φυγοκεντρήθηκε στις 13,000–16,000 x g για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχον το RNA αναμίχθηκε σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης 1.5 ml μαζί με 300 μl 100% ισοπροπανόλης και φυγοκεντρήθηκε στις 13,000–16,000 x g για 3 λεπτά. Το ίζημα περιέχον το RNA ξεπλύθηκε με 300 μl 70% αιθανόλης, φυγοκεντρήθηκε στις 13,000–16,000 x g για 1 λεπτό και αφέθηκε να στεγνώσει αναποδογυρίζοντας το σωλήνα σε απορροφητικό χαρτί για 10-15 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 50 μl διαλύματος ενυδάτωσης του RNA και το RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση.

Για τη σύνθεση cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε για κάθε πειραματική συνθήκη 1 µg ολικό RNA και συντέθηκε μονόκλωνο DNA (cDNA) με τη βοήθεια ενός kit σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (Bio-Rad, USA). Συνοπτικά, το RNA μαζί με 5x iScript διάλυμα αντίδρασης, iScript αντίστροφη μεταγραφάση και H₂O ελεύθερο νουκλεασών τοποθετήθηκαν σε αυτόματο κυκλοποιητή για PCR στις ακόλουθες συνθήκες: 5 λεπτά στους 25°C, 30 λεπτά στους 42°C και 5 λεπτά στους 85°C. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση.

Για τη σύνθεση δίκλωνου DNA με βάση τη cDNA βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε για όλες τις πειραματικές συνθήκες ίση ποσότητα DNA, μαζί με διάλυμα PCR, MgCl₂, μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), στείρο αποσταγμένο H₂O και μίγμα εκκινητών για το γονίδιο της MGMT. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για το γονίδιο της MGMT προς τα εμπρός, AGAGTCGTTACCCAGACAGG και για MGMT αντίστροφα, GCCATTCCTTCACGGCCAG. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της GAPDH (Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase) με εκκινητές GAPDH προς τα εμπρός, GGAAGGTGA AGGTCGGAGTCA και GAPDH αντίστροφα, GTCATTGATGGCAACAATATCCAC, αντίστοιχα. Οι συνθήκες PCR για την MGMT ήταν 35 κύκλοι, με θερμοκρασία ανόπτωσης 55°C and για την GAPDH 35 κύκλοι, με θερμοκρασία ανόπτωσης 58°C. Ίσες ποσότητες DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma Aldrich, UK) και φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως. Η ποσοτικοποίηση του RNA, cDNA και DNA για όλες τις πειραματικές συνθήκες έγινε με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας, χρησιμοποιώντας H₂O ως διαλύτη σε ειδικές κυβέττες και υπολογίζοντας τη συγκέντρωση από την απορρόφηση στα 260 nm και με βάση πρότυπη καμπύλη, λαμβάνοντας υπόψη και το συντελεστή διάλυσης. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα απεικονίζονται.

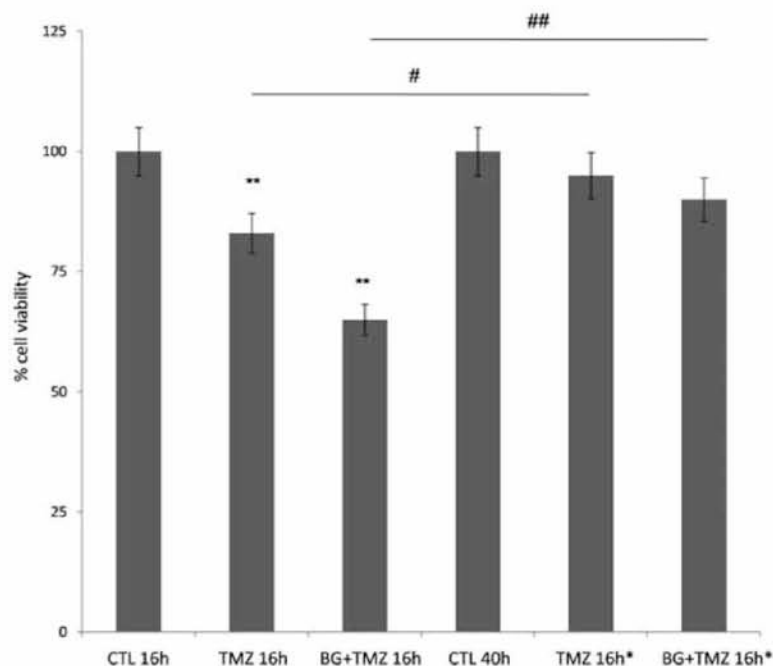
3.14 Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πρόγραμμα Graph Pad InStat Statistical για Windows (GraphPad Software, USA) χρησιμοποιήθηκε. Τα αριθμητικά δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (SD). Η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one-way analysis of variance) με το μετα-τεστ Bonferroni χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των δεδομένων και ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε $p < 0.05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Η χημειοευαισθητοποίηση της Ο6-βενζυλγουανίνης χάνεται μετά από 24 ώρες διακοπής του συνδυασμού τεμοζολομίδης-Ο6-βενζυλγουανίνης στα T98G κύτταρα

Στη δοκιμασία MTT η μονοθεραπεία με TMZ δεν είχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα η προσθήκη Ο6-BG 1 ώρα πριν και καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης σε TMZ οδήγησε σε σημαντική μείωση της επιβίωσης των κυττάρων μετά από 16 ώρες. Παρ' όλα αυτά, 24 ώρες μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων, η βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε και επανήλθε σχεδόν στο βασικό επίπεδο (Εικόνα 4.1).

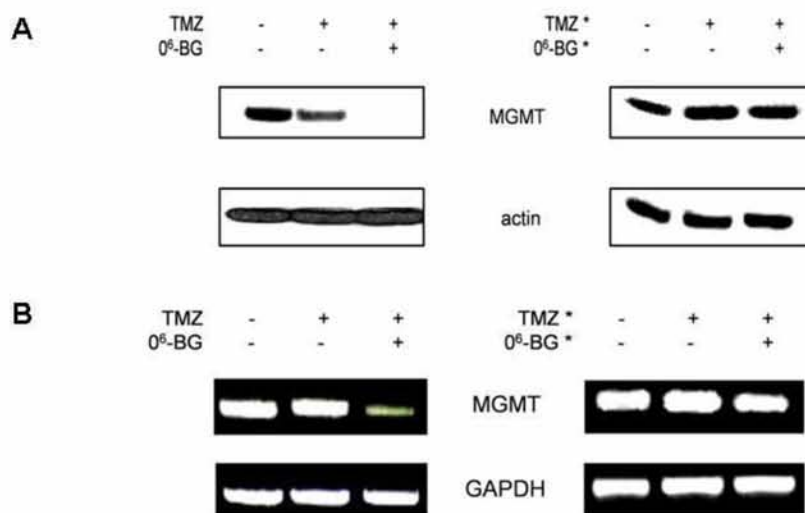


Εικόνα 4.1 Επίδραση TMZ και O6-BG στη βιωσιμότητα των κυττάρων T98G. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσο ποσοστό κυττάρων \pm σταθερή απόκλιση (SD) 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε σύγκριση με μάρτυρες για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης (CTL). Από αριστερά προς τα δεξιά: (i) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 16 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 16h), (ii) TMZ 100 μ M για 16 ώρες, (iii) BG 100 μ M (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μ M για 16 ώρες, (iv) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 40 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 40h), (v) TMZ 100 μ M για 16 ώρες και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*), (vi) BG 100 μ M (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μ M για 16 και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*) ([#]p < 0.01, ^{##}p < 0.01, ^{**}p < 0.01).

4.2 Η έκφραση της MGMT μειώνεται από το συνδυασμό τεμοζολομίδης–O6-βενζυλγουανίνης αλλά ανακάμπτει 24 ώρες μετά τη διακοπή του στα T98G κύτταρα

Η TMZ μείωσε τα επίπεδα της MGMT πρωτεΐνης (Εικόνα 4.2A) αλλά δεν επηρέασε τη μεταγραφή του γονιδίου της (Εικόνα 4.2B). Η προσθήκη BG στην TMZ οδήγησε σε πλήρη εξουδετέρωση των επιπέδων της πρωτεΐνης και επιπλέον σε σημαντική μείωση του μεταγράμματος της MGMT (Εικόνα 4.2B). Αντίθετα, 24 ώρες μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων, τόσο το mRNA όσο και η πρωτεΐνη MGMT αποκαταστάθηκαν στα προηγούμενα βασικά τους επίπεδα, αντίστοιχα (Εικόνα 4.2).

T98G

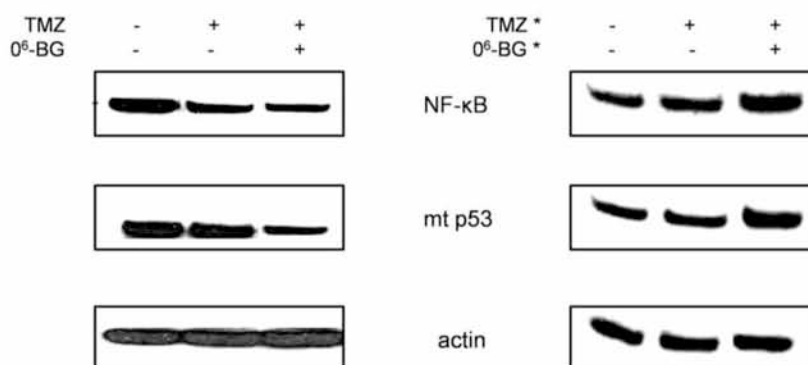


Εικόνα 4.2 Επίδραση TMZ και O⁶-BG στην έκφραση της MGMT στα T98G κύτταρα. (A) Ανοσοαποτύπωση MGMT πρωτεΐνης. Από αριστερά προς τα δεξιά: (i) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 16 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 16h), (ii) TMZ 100 μM για 16 ώρες, (iii) BG 100 μM (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μM για 16 ώρες, (iv) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 40 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 40h), (v) TMZ 100 μM για 16 ώρες και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*), (vi) BG 100 μM (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μM για 16 και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. (B) RT-PCR MGMT mRNA. Από αριστερά προς τα δεξιά: όπως στο A. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.3 Η διακοπή του συνδυασμού τεμοζολομίδης–O⁶-βενζυλγουανίνης σχετίζεται με υπερέκφραση NF-κB και mt p53 μετά από 24 ώρες στα T98G κύτταρα

Δεδομένου ότι μετά την μονόδρομη 1:1 αντίδραση της MGMT τόσο με την TMZ (απομάκρυνση O⁶-meG βλαβών) όσο και με την O⁶-BG (ψευδουπόστρωμα) το ένζυμο καταναλώνεται και οδηγείται προς μη αναστρέψιμη αποδόμηση από το πρωτεάσωμα, η αναγέννησή του 24 ώρες μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων οφείλεται εξ'ολοκλήρου σε επαγωγή νέας μεταγραφής. Με το σκεπτικό αυτό, εξετάστηκαν, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των NF-κB (p65) και mt p53 που αποτελούν δύο κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστές της έκφρασης MGMT μετά την έκθεση σε αλκυλιωτικούς

παράγοντες [116, 187]. Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες μειώθηκαν μετά τη συνδυασμένη χορήγηση TMZ και O6-BG, ωστόσο 24 ώρες μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων αμφότεροι επανήλθαν τουλάχιστον στα αρχικά επίπεδα έκφρασής τους παρουσιάζοντας τάση αυξορρύθμισης.

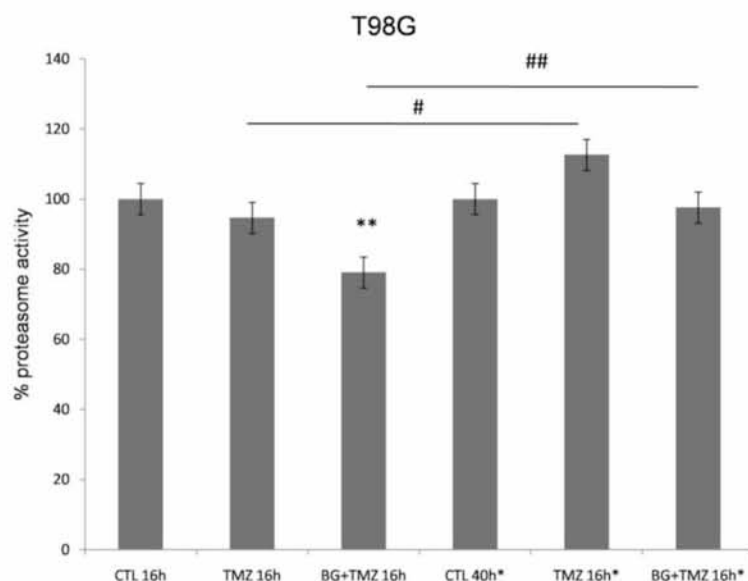


Εικόνα 4.3 Επίδραση TMZ και O6-BG στην έκφραση της NF-κB (p65) και mt p53 στα T98G κύτταρα. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών NF-κB (p65) και mt p53. Από αριστερά προς τα δεξιά: (i) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 16 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 16h), (ii) TMZ 100 μM για 16 ώρες, (iii) BG 100 μM (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μM για 16 ώρες, (iv) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 40 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 40h), (v) TMZ 100 μM για 16 ώρες και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*), (vi) BG 100 μM (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μM για 16 και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.4 Η προσθήκη O6-βενζυλγουανίνης στην τεμοζολομίδη οδηγεί σε μείωση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας η οποία επανακάμπτει 24 ώρες μετά την απομάκρυνσή τους στα T98G κύτταρα

Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες MGMT, NF-κB (p65) και mt p53 αποτελούν υποστρώματα του πρωτεασώματος, μελετήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας για να διαπιστωθεί εάν η μεταβολή των επιπέδων τους σχετίζεται με αλλαγή του ρυθμού πρωτεολυτικής αποδόμησής τους. Διαπιστώθηκε ότι η TMZ και κυρίως ο συνδυασμός TMZ και O6-BG οδήγησε σε 20% περίπου μείωση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος.

Ωστόσο, 24 ώρες μετά η πρωτεασωμική δραστηριότητα επανήλθε στο βασικό επίπεδο, με μια μικρή τάση rebound στη περίπτωση της TMZ (Εικόνα 4.4).

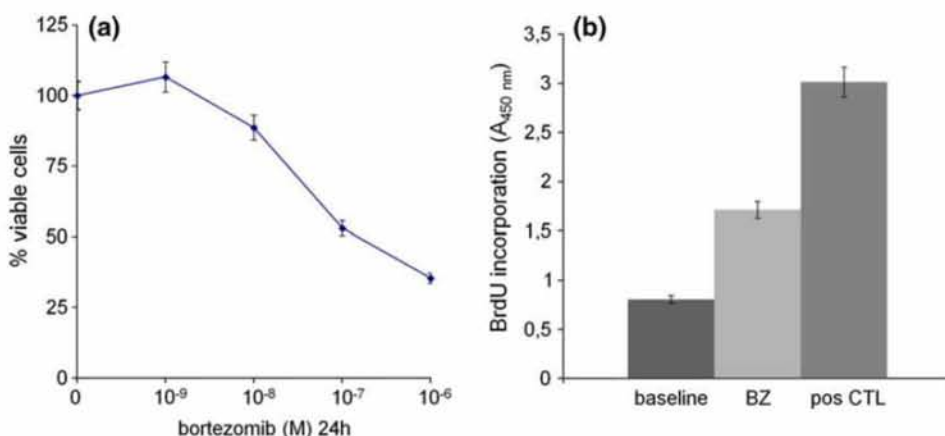


Εικόνα 4.4 Επίδραση TMZ και O6-BG στην πρωτεασωμική δραστηριότητα των κυττάρων T98G. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση ποσοστιαία (%) αναλογία \pm σταθερή απόκλιση (SD) 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε σύγκριση με μάρτυρες για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης (CTL). Από αριστερά προς τα δεξιά: (i) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 16 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 16h), (ii) TMZ 100 μ M για 16 ώρες, (iii) BG 100 μ M (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μ M για 16 ώρες, (iv) κύτταρα χωρίς φάρμακα (επώαση για 40 ώρες με θρεπτικό υλικό) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (CTL 40h), (v) TMZ 100 μ M για 16 ώρες και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*), (vi) BG 100 μ M (χορήγηση 1 ώρα πριν την TMZ) και TMZ 100 μ M για 16 και στη συνέχεια επώαση με φρέσκο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες (*) (# $p < 0.01$, ## $p < 0.01$, ** $p < 0.01$).

4.5 Η μπορτεζομίμη μειώνει τη βιωσιμότητα και αυξάνει την απόπτωση στα T98G κύτταρα

Δεδομένης της άμεσης ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων της MGMT από την οδό ουβικουιλίνης-πρωτεασώματος [120] καθώς και της αποδεδειγμένης κυτταροτοξικής δράσης της παρατεταμένης χορήγησης του αναστολέα πρωτεασώματος μπορτεζομίμη σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος που εκφράζουν MGMT [157] μελετήθηκε η δραστηριότητα του φαρμάκου σε βραχύτερη διάρκεια έκθεσης και συγκεκριμένα στις 24 ώρες, που είναι και το κρίσιμο διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την ανάκαμψη των επιπέδων του ενζύμου μετά τη

χορήγηση ΧΜΘ [184]. Διαπιστώθηκε ότι η μπορτεζομίμη χορηγούμενη για 24 ώρες έχει δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα T98G κύτταρα με την απαιτούμενη δόση για 50% μείωση της βιωσιμότητας (IC50) να είναι περίπου 0.1 μM (Εικόνα 4.5A). Σ' αυτή τη δόση και διάρκεια χορήγησης, η BZ οδήγησε επίσης σε σημαντική αύξηση του κατακερματισμού του DNA που μετρήθηκε με την αυξημένη ενσωμάτωση βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) και σχετίζεται με απόπτωση των T98G κυττάρων (Εικόνα 4.5B)

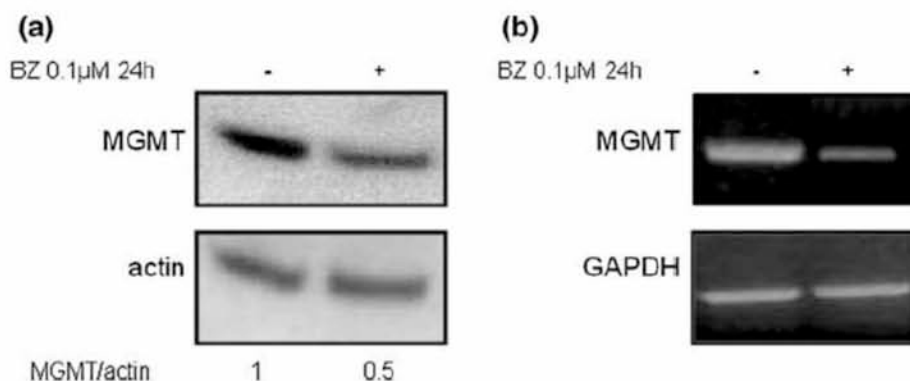


Εικόνα 4.5 Επίδραση μπορτεζομίμης (BZ) στη βιωσιμότητα και απόπτωση των T98G κυττάρων. (a) Δοκιμασία MTT με διαδοχικά αυξανόμενες δόσεις BZ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσο ποσοστό επιβίωσης ± σταθερή απόκλιση (SD) 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε σύγκριση με κύτταρα-μάρτυρες για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης. (b) Δοκιμασία κατακερματισμού του DNA με δοκιμασία ELISA, και μέτρηση της απορρόφησης (τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) σε μήκος κύματος 450nm) στις 24 ώρες. Από αριστερά προς τα δεξιά: κύτταρα-μάρτυρες χωρίς θεραπεία (επώαση για 24 ώρες με θεραπευτικό υλικό), BZ 0.1 μM για 24 h, θετικός μάρτυρας απόπτωσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή απορρόφησης (OD A₄₅₀) ± σταθερή απόκλιση (SD) 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε σύγκριση με αρνητικούς και θετικούς μάρτυρες για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης.

4.6 Η μπορτεζομίμη μειώνει την έκφραση της MGMT στα T98G κύτταρα

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν η κυτταροτοξική δράση της μπορτεζομίμης σχετίζεται με μεταβολή της έκφρασης της MGMT, δεδομένου ότι η τελευταία αποτελεί μείζονα παράγοντα αντοχής στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος [126]. Πράγματι, τόσο τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.6A) όσο και του mRNA (Εικόνα 4.6B) της MGMT μειώθηκαν

σημαντικά σε σύγκριση με τα βασικά τους επίπεδα μετά την 24ωρη έκθεση σε BZ. Σε πρώτη ανάγνωση, αυτό ήταν ένα μάλλον μη αναμενόμενο εύρημα δεδομένου ότι η αναστολή του πρωτεασώματος θα αναμενόταν να σταθεροποιεί τα επίπεδα των υποστρωμάτων της, συμπεριλαμβανομένης της MGMT.



Εικόνα 4.6. Επίδραση της μπορτεζομίμπης (BZ) στην έκφραση της MGMT. (a) Ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνης MGMT σε βασικό επίπεδο σε κύτταρα χωρίς θεραπεία (επώαση με θρεπτικό υλικό για 24 ώρες) και μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μ M για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. (b) RT-PCR MGMT mRNA σε βασικό επίπεδο σε κύτταρα χωρίς θεραπεία (επώαση με θρεπτικό υλικό για 24 ώρες) και μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μ M για 24 ώρες. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

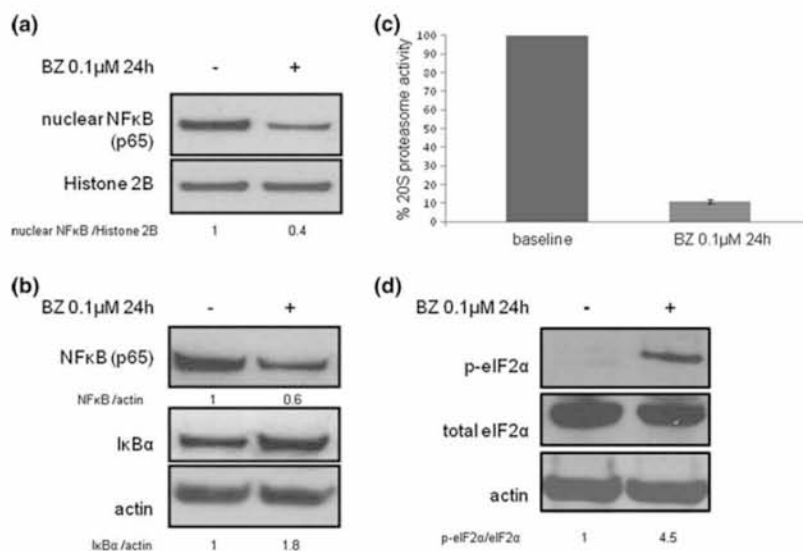
4.7 Η μπορτεζομίμπη αναστέλλει την κανονική οδό του NF- κ B και προάγει τη φωσφορυλίωση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 2 (eukaryotic translation initiation factor 2, eIF2) στα T98G κύτταρα

Για τη διερεύνηση των μηχανισμών της διπλής καταστολής των επιπέδων MGMT mRNA και πρωτεΐνης μετά την αναστολή του πρωτεασώματος έγινε η υπόθεση ότι η τελευταία πιθανότατα επηρεάζει μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της MGMT ή/και παράγοντες που εμπλέκονται στη μετάφραση του MGMT mRNA σε πρωτεΐνη. Ένας άριστος για μελέτη μεταγραφικός ρυθμιστής της MGMT, λόγω τόσο της άμεσης εξάρτησης της ενεργοποίησής του από την οδό ουβικουιτίνης-

πρωτεασώματος όσο και λόγω της υπερέκφρασής του στο γλοιοβλάστωμα, η οποία οδηγεί σε αυξημένη διηθητική ικανότητα και αντίσταση στη ΧΜΘ, ήταν ο NF-κB (p65) [182, 191].

Αφετέρου, δεδομένου ότι η πλειοτροπική δράση της αναστολής του πρωτεασώματος έχει συσχετιστεί με γενικευμένη ελάττωση του ρυθμού πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω φωσφορυλίωσης της άλφα υπομονάδας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 2 (eIF2α) σε άλλες κυτταρικές σειρές [192, 193], μελετήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλιωμένου και ολικού eIF2α στα T98G κύτταρα.

Πράγματι, η BZ οδήγησε σε ελάττωση της πυρηνικής συσώρευσης του NF-κB (Εικόνα 4.7a), αυξάνοντας τα επίπεδα του αναστολέα του, IκBα (Εικόνα 4.7b) και μειώνοντας και τα ολικά επίπεδα του NF-κB (Εικόνα 4.7b), μετά από σχεδόν πλήρη αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος (Εικόνα 4.7c) στα T98G κύτταρα. Επιπλέον, η BZ αύξησε σημαντικά, κατά 4.5 περίπου φορές, τη φωσφορυλίωση του eIF2α, εξηγώντας και στα T98G κύτταρα τη γενικευμένη αναστολή της μετάφρασης που είχε παρατηρηθεί σε άλλες κυτταρικές σειρές (Εικόνα 4.7d).



Εικόνα 4.7 Επίδραση της μπορτεζομίμπης (BZ) στην κανονική οδό NFκB και στα επίπεδα του eIF2α. (a) Ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνης του πυρηνικού NFκB σε βασικό επίπεδο σε κύτταρα χωρίς θεραπεία (επώαση με θεραπευτικό υλικό για 24 ώρες) και μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μM για 24 ώρες. Η ιστονίνη 2B χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. (b) Ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνης του ολικού IκBα και του ολικού NFκB σε κύτταρα χωρίς θεραπεία (επώαση με θεραπευτικό υλικό για 24 ώρες) και μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μM για 24 ώρες. Η

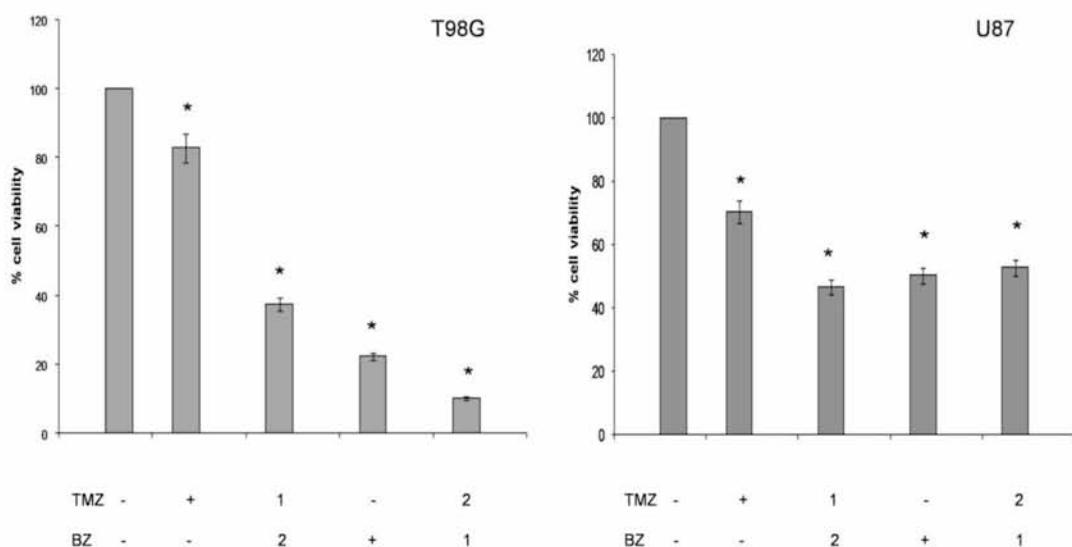
ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. (c) Ποσοστό 20S πρωτεασωματικής δραστηριότητας (σε RFU/mg) μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μ M για 24 ώρες σε σύγκριση με το βασικό επίπεδο (κύτταρα χωρίς θεραπεία, επώαση με θρεπτικό υλικό για 24 ώρες). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ($p < 0.01$). (d) Ανοσοαποτύπωση φωσφορυλιωμένης (p-eIF2 α) και ολικής πρωτεΐνης eIF2 α σε βασικό επίπεδο σε κύτταρα χωρίς θεραπεία (επώαση με θρεπτικό υλικό για 24 ώρες) και μετά από έκθεση σε BZ 0.1 μ M για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων p-eIF2 α σε σχέση με την ολική πρωτεΐνη eIF2 α έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική p-eIF2 α ως 1.

4.8 Η μπορτεζομίμη προάγει τη μεσολαβούμενη από την τεμοζολομίδη μείωση της επιβίωσης των T98G και U87 κυττάρων ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης του συνδυασμού

Η κυτταροτοξικότητα της TMZ μεσολαβείται από την έναρξη αποπτωτικής σηματοδότησης που έπεται της μη επιδιόρθωσης της αλκυλίωσης του DNA και κυρίως της παραμονής των O6-meG βλαβών. Ωστόσο, τα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος μπορούν να ξεφύγουν από τον κυτταρικό θάνατο μέσω παρατεταμένης διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M [98, 194]. Αφετέρου και η BZ αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου [157]. Με βάση αυτά τα δεδομένα, η διαδοχική χορήγηση θεωρητικά θα υπερτερούσε έναντι της ταυτόχρονης χορήγησης και πράγματι αυτό έχει αποδειχθεί για τα U87 κύτταρα [162]. Για τη μελέτη του συνδυασμού TMZ και BZ επιλέχθηκε επομένως η διαδοχική χορήγηση. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου του NF- κ B αφενός στον καθορισμό της MGMT-σχετιζόμενης ανταπόκρισης των γλοιωμάτων στους αλκυλιούντες παράγοντες και αφετέρου στην προώθηση των αντικαρκινικών δράσεων των αναστολέων πρωτεασώματος [116, 182, 195], επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν δόσεις με εξακριβωμένη ανασταλτική δράση στον NF- κ B αναμένοντας τη μεγαλύτερη δυνατή κυτταροτοξικότητα από το διαδοχικό συνδυασμό των δύο φαρμάκων. Επομένως η συγκέντρωση και διάρκεια χορήγησης της TMZ (100 μ M για 16 hours) επιλέχθηκε με βάση προηγούμενα δεδομένα συσχέτισης μεταξύ της κυτταροτοξικότητας της TMZ και της μέγιστης αναστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του NF- κ B στις ίδιες κυτταρικές σειρές

(T98G, U87) [196]. Αντίστοιχα η συγκέντρωση και διάρκεια χορήγησης της BZ (0.1μM για 24 ώρες) επιλέχθηκε διότι συνδέει την μείωση της πυρηνικής μετατόπισης και της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB με έναρξη της απόπτωσης στις ίδιες κυτταρικές σειρές (T98G, U87) με βάση τα δικά μας, παρουσιαζόμενα, αλλά και προηγούμενα δεδομένα [157].

Στη δοκιμασία MTT εξετάστηκαν όλες οι δυνατές αλληλουχίες χορήγησης των φαρμάκων σε συνολική διάρκεια έκθεσης 40 ωρών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2. Και τα δύο φάρμακα χορηγούμενα μεμονωμένα οδήγησαν σε μείωση της βιωσιμότητας των T98G και U87 κυττάρων, με τη BZ να έχει μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με την TMZ. Τα κύτταρα T98G εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην BZ σε σύγκριση με τα U87. Η σειρά χορήγησης στους συνδυασμούς οδήγησε σε διαφορετικές κυτταρικές απαντήσεις στις δύο σειρές. Στα κύτταρα T98G, η BZ πριν την TMZ ήταν πιο δραστική σε σύγκριση με την TMZ ακολουθούμενη από BZ. Αντίθετα, τα U87 κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα στην πρώιμη χορήγηση TMZ ακολουθούμενη από BZ σε σύγκριση με την όψιμη έκθεση σε TMZ μετά από BZ (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8 Επίδραση BZ και TMZ στην επιβίωση των T98G και U87 κυττάρων. Δοκιμασία MTT. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0.01$ μάρτυρας χωρίς θεραπεία έναντι χορήγησης φαρμάκων).

Από την ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ TMZ και BZ με βάση τα δεδομένα της δοκιμασίας MTT, όλοι οι συνδυασμοί και στις δύο κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν συνεργική δράση. Στα T98G κύτταρα, η συνέργεια ήταν μεγαλύτερη στην πρώιμη χορήγηση BZ πριν την TMZ σε σύγκριση με την καθυστερημένη, ενώ στα U87 κύτταρα παρατηρήθηκε το αντίθετο, αν και πρακτικά δεν υπήρχε εμφανής διαφορά (Πίνακας 4.8).

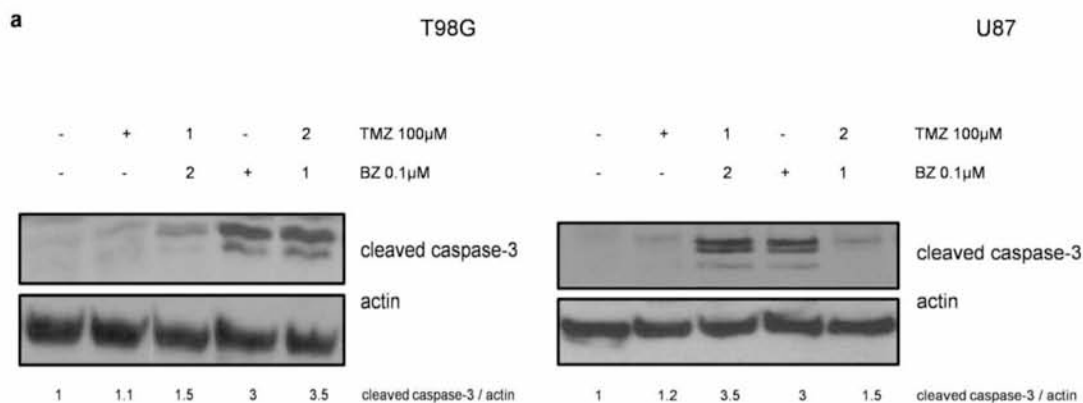
Πίνακας 4.8 Τιμή ηλικίου (R) για τους συνδυασμούς TMZ (100 μM 16 h) και BZ (0.1 μM 24 h).

Κυτταρική σειρά	R ± σταθερή απόκλιση	
	BZ(1)/TMZ(2)	TMZ(1)/BZ(2)
T98G	0.006 ± 0.001	0.023 ± 0.005
U87	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001

4.9 Η μπορτεζομίμη προάγει τη μεσολαβούμενη από την τεμοζολομίδη αύξηση της απόπτωσης των T98G και U87 κυττάρων ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης του συνδυασμού

Για να ελεγχθεί εάν η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων από τους συνδυασμούς TMZ και BZ συνοδεύεται από απόπτωση, εξετάστηκαν τα επίπεδα της ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Παρατηρήθηκε ότι η TMZ ως μονοθεραπεία δεν είχε σημαντική επίδραση σε καμία από τις 2 κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, η BZ αύξησε τα επίπεδα της ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Οι συνδυασμοί BZ με την TMZ, οδήγησαν σε διαφορετική έκβαση των δύο

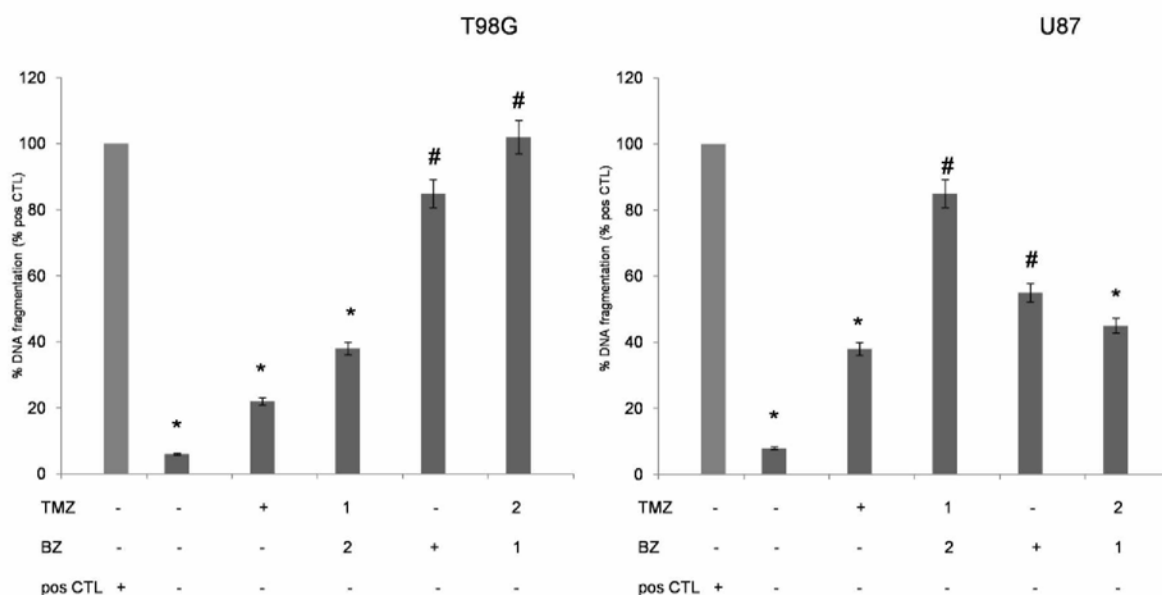
κυτταρικών σειρών. Τα κύτταρα T98G είχαν εκσεσημασμένη ενεργοποίηση της κασπάσης 3 μετά την πρώιμη χορήγηση BZ σε αντίθεση με την όψιμη χορήγηση BZ που δεν οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Αντίθετα, τα U87 κύτταρα παρουσίασαν ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα στις ίδιες συνθήκες επώασης των φαρμάκων (Εικόνα 4.9.1).



Εικόνα 4.9.1 Επίδραση BZ και TMZ στην απόπτωση των T98G και U87 κυττάρων. Ανοσοαποτύπωση κλασμάτων ενεργοποιημένης κασπάσης 3. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων ενεργοποιημένης κασπάσης 3 σε σχέση με την ακτίνη έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ξεχωριστών πειραμάτων.

Για την επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην απόπτωση, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κατακερματισμού του DNA με ELISA στις ίδιες συνθήκες. Παρατηρήθηκε εξάρτηση του μεγέθους του αποπτωτικού κατακερματισμού, σε σύγκριση με θετικούς μάρτυρες για κάθε κυτταρική σειρά, από την αλληλουχία του συνδυασμού TMZ και BZ. Στα T98G κύτταρα, η BZ ακολουθούμενη από TMZ οδήγησε σε απόπτωση συγκρίσιμη με το θετικό μάρτυρα και τη μονοθεραπεία με BZ. Αντίθετα η καθυστερημένη προσθήκη BZ μετά από TMZ οδήγησε σε μικρότερο βαθμό απόπτωσης που ωστόσο υπερέχει της μονοθεραπείας με TMZ. Στα U87 κύτταρα, η TMZ ακολουθούμενη από BZ ήταν

το πιο ισχυρό αποπτωτικό σχήμα, ενώ σε φθίνουσα σειρά με βάση το μέγεθος της απόπτωσης ήταν η μονοθεραπεία με BZ, η πρώιμη χορήγηση BZ πριν από TMZ, και η μονοθεραπεία με TMZ (Εικόνα 4.9.2)

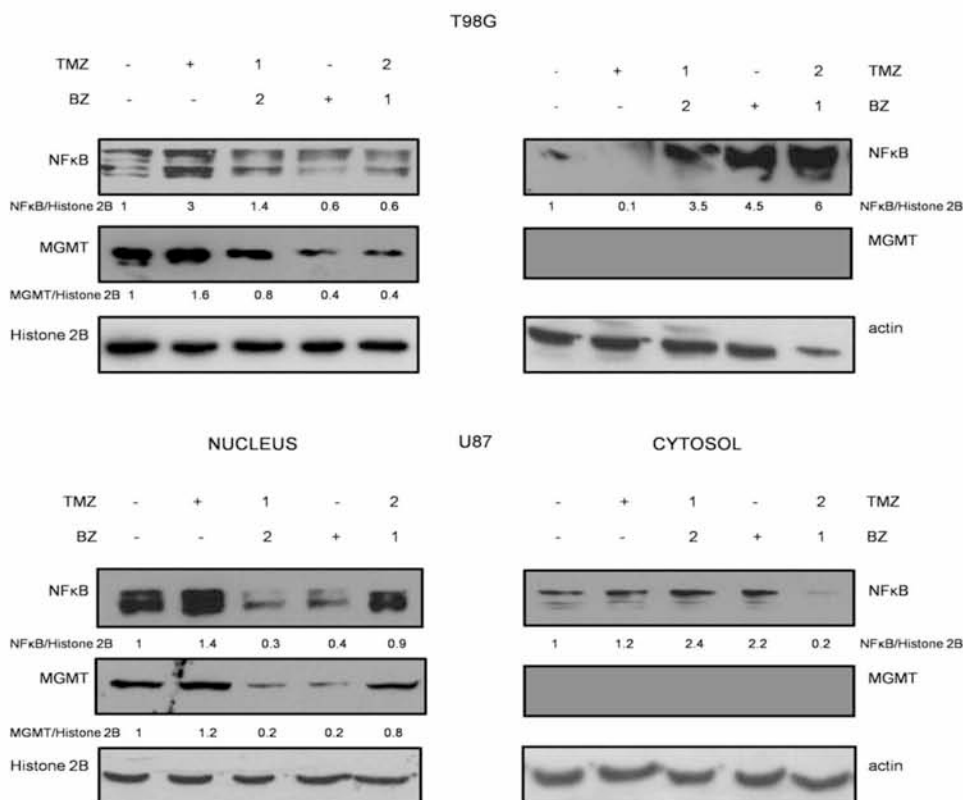


Εικόνα 4.9.2 Επίδραση BZ και TMZ στην απόπτωση των T98G και U87 κυττάρων. ELISA κατακερματισμού του DNA σε λύματα κυττάρων T98G και U87, μετρούμενα ως ποσοστιαία (%) αναλογία κλασμάτων BrdU DNA των κυττάρων που εκτέθηκαν στους συνδυασμούς BZ και TMZ σε σύγκριση με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες για κάθε κυτταρική σειρά. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (* $p < 0.01$ αρνητικός μάρτυρας έναντι θεραπείας, # $p < 0.01$ TMZ έναντι BZ και TMZ έναντι συνδυασμών).

4.10 Η μπορτεζομίμη μειώνει την επαγόμενη από την τεμοζολομίδη έκφραση της MGMT και καταστέλλει την ενεργοποίηση της κανονικής οδού NFκB ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης του συνδυασμού στα T98G και U87 κύτταρα

Για τον έλεγχο των μηχανισμών της χημειοευαισθητοποίησης στην TMZ από τη BZ, θεωρώντας ότι αυτή σχετίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, με την NFκB-εξαρτώμενη, MGMT-μεσολαβούμενη επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, εξετάστηκαν τα επίπεδα και η υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών NFκB και MGMT. Παρατηρήθηκε ότι η TMZ αύξησε

την πυρηνική συγκέντρωση τόσο του NFκB όσο και της MGMT στις δύο κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, η BZ είχε αντίθετα αποτελέσματα, προκαλώντας μείωση των πυρηνικών επιπέδων NFκB και MGMT και αύξηση του κυτταροπλασματικού NFκB. Η MGMT, ως πυρηνικά εντοπιζόμενο επιδιορθωτικό ένζυμο του DNA με εύκολη διαπερατότητα της πυρηνικής μεμβράνης λόγω του μικρού της μεγέθους, ήταν μη ανιχνεύσιμη στο κυτταρόπλασμα σε όλες τις πειραματικές συνθήκες [197]. Οι συνδυασμοί TMZ and BZ μείωσαν τα πυρηνικά επίπεδα NFκB και MGMT με αντίστροφο τρόπο στα T98G και U87 κύτταρα, με την πρώιμη χορήγηση BZ στα T98G και την καθυστερημένη χορήγηση BZ στα U87 κύτταρα να εμφανίζουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών NFκB και MGMT (Εικόνα 4.10.1).

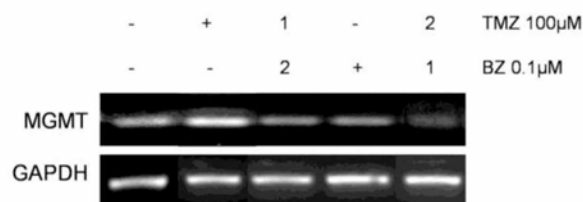


Εικόνα 4.10.1 Επίδραση BZ και TMZ στην πυρηνική συσσώρευση NFκB και MGMT. Ανοσοαποτύπωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για NFκB και MGMT. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό

αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ιστόνη 2B χρησιμοποιήθηκε ως πυρηνικός δείκτης ισοφόρτωσης και η ακτίνη ως κυταροπλασματικός. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων NFκB και MGMT σε σχέση με την ιστόνη 2B και την ακτίνη έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε κατά πόσο η αυξομείωση των επιπέδων της MGMT πρωτεΐνης συνοδεύεται από αντίστοιχες μεταβολές του MGMT mRNA, δεδομένης της κατανάλωσης του ενζύμου για την απομάκρυνση των O6-meG βλαβών του DNA που δημιουργεί η TMZ καθώς και της παρουσιαζόμενης δράσης της BZ ως αναστολέα της έκφρασης της MGMT μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Επιλέχθηκε ο έλεγχος των επιπέδων του MGMT mRNA να γίνει μόνο στα T98G κύτταρα, θεωρώντας ότι λόγω της απουσίας μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου, τα κύτταρα αυτά έχουν πιθανώς μεγαλύτερη δυνατότητα ανιχνεύσιμης μεταβολής της μεταγραφής στο βαθμό που αυτή εξαρτάται από τη μεταβολή ρυθμιστικών της MGMT μεταγραφικών παραγόντων. Αντίθετα, η μερική μεθυλίωση του εκκινητή της MGMT στα U87 κύτταρα συνεπάγεται μικρότερη βασική και επαγωγίμη έκφραση και είναι πιθανό μεταβολές στα επίπεδα ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων να μη μεταφράζονται στον ίδιο βαθμό σε αλλαγή της μεταγραφής του γονιδίου της MGMT.

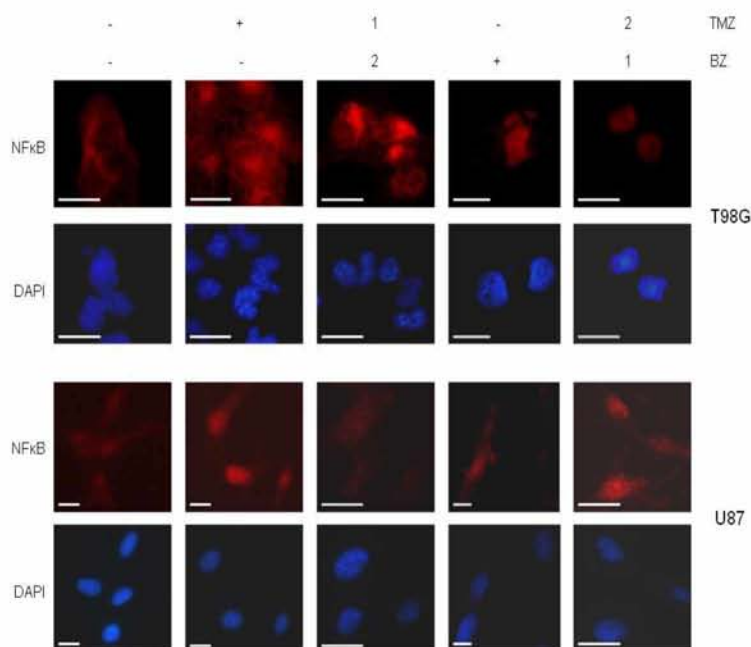
Πράγματι, τα επίπεδα του MGMT mRNA ακολούθησαν το πρότυπο των μεταβολών της πρωτεΐνης κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (Εικόνα 4.10.2).



Εικόνα 4.10.2 Επίδραση της BZ και TMZ στην έκφραση της MGMT. RT-PCR MGMT mRNA στα T98G κύτταρα. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16

ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώασθηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

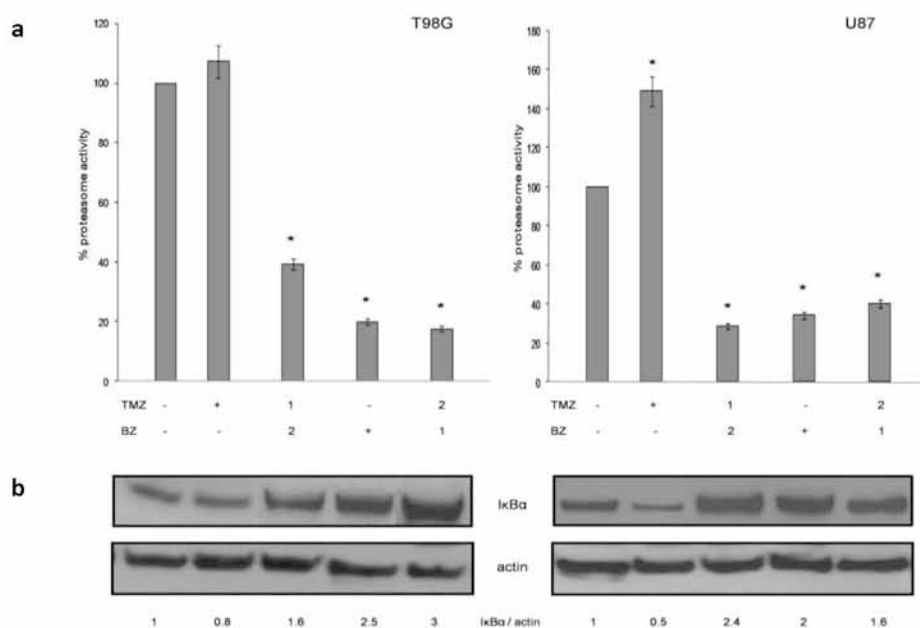
Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της πυρηνικής εντόπισης του NFκB, μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή του NFκB στις ίδιες συνθήκες με ανοσοφθορισμό. Και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε σε βασικό επίπεδο ένα μικτό πρότυπο πυρηνικής και κυτταροπλασματικής κατανομής του NFκB. Η TMZ οδήγησε σε αύξηση του πυρηνικού NFκB ενώ αντίθετα η BZ μείωσε την πυρηνική εντόπιση του NFκB τόσο στα T98G όσο και στα U87 κύτταρα. Οι συνδυασμοί BZ και TMZ είχαν και πάλι αντίστροφο αποτέλεσμα στις δύο κυτταρικές σειρές. Στα κύτταρα T98G, η όψιμη προσθήκη BZ μετά από TMZ οδήγησε σε αυξημένη πυρηνική συσσώρευση του NFκB, ενώ η πρώιμη χορήγηση BZ πριν την TMZ οδήγησε σε πρότυπο κυτταροπλασματικής εντόπισης. Αντίθετα, στα U87 κύτταρα η καθυστερημένη χορήγηση BZ μείωσε τον πυρηνικό NFκB ενώ η πρώιμη αύξησε τη συγκέντρωσή του στον πυρήνα (Εικόνα 4.10.3).



Εικόνα 4.10.3 Επίδραση BZ και TMZ στον υποκυτταρικό εντοπισμό του NFκB. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι του NFκB (p65) στα T98G και U87 κύτταρα. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε 4',6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) ώστε οι πυρήνες να φαίνονται με μπλε χρώμα. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και απεικονίζονται με γραμμές μεγέθυνσης 10μM.

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν τα αποτελέσματα της δράσης των φαρμάκων στην υποκυτταρική εντόπιση του NFκB σχετίζονται με εξαρτώμενη από την πρωτεασωμική δραστικότητα, ΙκΒα-μεσολαβούμενη μετακίνηση του NFκB από και προς τον πυρήνα, η οποία αποτελεί την κανονική οδό ενεργοποίησης του NFκB. Παρατηρήθηκε ότι η TMZ οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας του πρωτεασώματος η οποία ήταν εκσεσημασμένη στα U87 κύτταρα και λιγότερο σημαντική στα T98G κύτταρα, συνοδευόμενη από ελάττωση των επιπέδων του ΙκΒα. Η BZ είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με την TMZ μείωσε την πρωτεασωμική δραστικότητα και σταθεροποίησε τα επίπεδα του ΙκΒα και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 4.10.4a). Η μέγιστη αναστολή της δραστικότητας του πρωτεασώματος συνέπεσε με τη μέγιστη συσσώρευση του ΙκΒα και επιτεύχθηκε με τις ίδιες αλληλουχίες, TMZ(2)/BZ(1) για τα T98G και TMZ(1)/BZ(2) για τα U87 κύτταρα, αντίστοιχα, που οδήγησαν στη μέγιστη ελάττωση των πυρηνικών επιπέδων του NFκB (Εικόνα 4.10.4b).

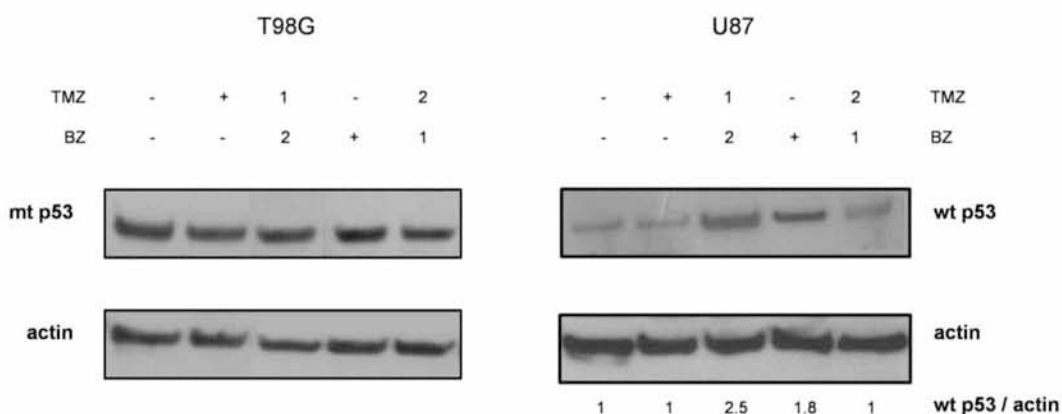


Εικόνα 4.10.4 Επίδραση BZ και TMZ στην δραστικότητα του πρωτεασώματος και στον IκBa. (a) Δοκιμασία 20S πρωτεασωμικής δραστικότητας ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η πρωτεασωμική δραστικότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και εκφράζεται ως μέση ποσοστιαία (%) αναλογία ± σταθερή απόκλιση (SD) 3 ανεξάρτητων πειραμάτων σε σύγκριση με μάρτυρες για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα έκθεσης (* $p < 0.01$; μάρτυρες έναντι θεραπείας). (b) Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για IκBa, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες όπως στο α. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων IκBa σε σχέση με την ακτίνη έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.11 Η μπορτεζομίμη σταθεροποιεί τον wt p53 στα U87 κύτταρα και αναστέλει την επαγόμενη από την τεμοζολομίδη p44/42 MAPK σηματοδοτική οδό στα T98G και U87 κύτταρα ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης του συνδυασμού

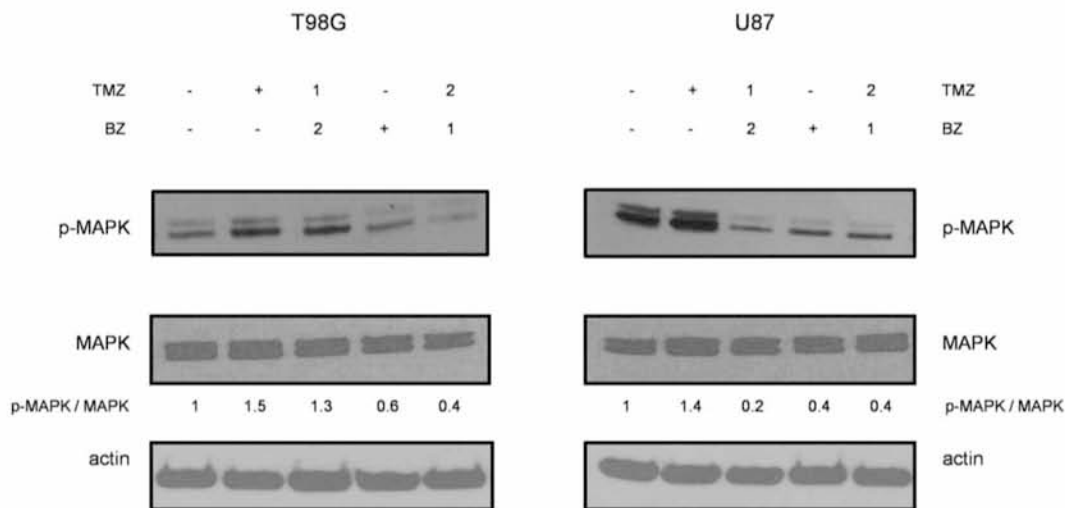
Εκτός από τον NFκB, ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση της MGMT και επηρεάζει τη χημειοευαισθησία του γλοιοβλαστώματος είναι ο p53. Ο wt p53 ασκεί κατασταλτική δράση στη μεταγραφή του γονιδίου αλληλεπιδρώντας με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1, ενώ ο mt p53 επάγει τη μεταγραφή της MGMT [186, 187, 198]. Επιπλέον, η σηματοδοτική οδός mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase (MEK)-extracellular signal-regulated kinase (ERK) εμπλέκεται άμεσα στον wt p53-εξαρτώμενο μηχανισμό ρύθμισης της MGMT μέσω ρύθμισης του αναστολέα του p53, Mdm2 [188]. Με βάση αυτά τα δεδομένα μελετήθηκαν τα επίπεδα του p53, καθώς και της φωσφορυλιωμένης (ενεργού) και ολικής p44/42 MAPK (ERK1/2) κινάσης. Στα T98G κύτταρα, ο έλεγχος των επιπέδων του mt p53 δεν ανέδειξε ουσιώδεις μεταβολές σε καμία από τις πειραματικές συνθήκες σε σύγκριση με τη βασική έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53. Στα U87 κύτταρα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του wt p53 μετά τη μεμονωμένη χορήγηση BZ αλλά κυρίως με το συνδυασμό της καθυστερημένης χορήγησης

BZ μετά από TMZ. Αντίθετα οι υπόλοιπες συνθήκες δεν άλλαξαν ουσιαστικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.11.1).



Εικόνα 4.11.1 Επίδραση BZ και TMZ στο wt p53 και mt p53. Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για wt p53 και mt p53. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων wt p53 σε σχέση με την ακτίνη έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ως προς την οδό MEK/ERK, και στις δύο κυτταρικές σειρές, η TMZ αύξησε ενώ η BZ μείωσε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p44/42 MAPK (ERK1/2) σε σχέση με τα συνολικά τα οποία δεν επηρεάστηκαν. Στα T98G κύτταρα η BZ χορηγούμενη πριν την TMZ οδήγησε σε μεγαλύτερη αναστολή της φωσφορυλίωσης (ενεργοποίησης) της MAPK σε σύγκριση με την καθυστερημένη προσθήκη μετά την TMZ. Αντίθετα, στα U87 κύτταρα, ο συνδυασμός TMZ(1)/BZ(2) κατέστειλε τη φωσφορυλίωση της MAPK σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με την αλληλουχία TMZ(2)/BZ(1) (Εικόνα 4.11.2).

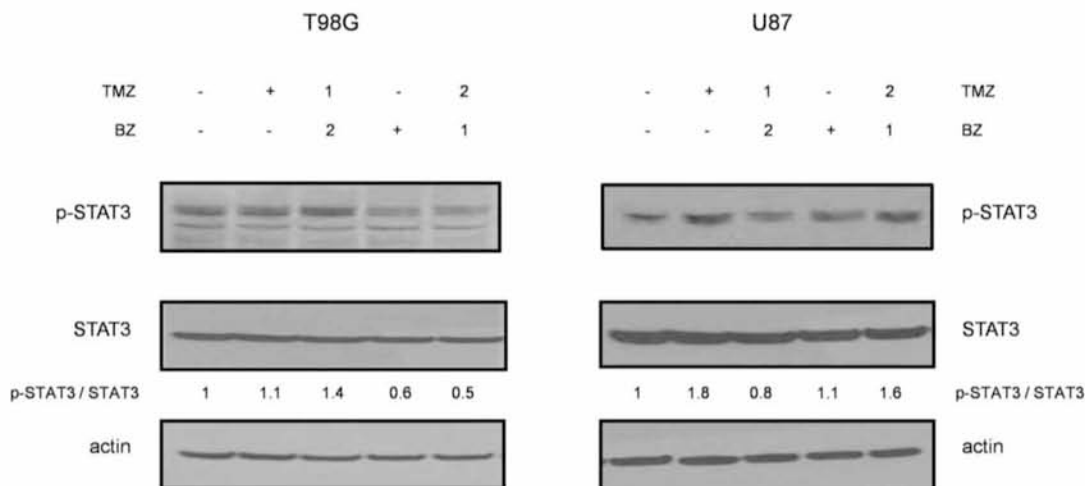


Εικόνα 4.11.2 Επίδραση BZ και TMZ στην φωσφορυλιωμένη (p-MAPK) και ολική p44/42 MAPK (ERK1/2). Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για p-MAPK και MAPK. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100 μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100 μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων p-MAPK σε σχέση με την ολική MAPK έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.12 Η μπορτεζομίμη αναστέλλει την επαγόμενη από την τεμοζολομίδη STAT3 σηματοδοτική οδό στα T98G και U87 κύτταρα ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης του συνδυασμού

Η εμπλοκή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης μέσω του signal transducer and activator of transcription (STAT3) στην *in vitro* και *in vivo* αντίσταση του γλοιοβλαστώματος στην TMZ με άμεση συσχέτιση της φωσφορυλιωμένης (ενεργοποιημένης) STAT3 και των επιπέδων της MGMT οδήγησε στη διερεύνηση αυτής της οδού κάτω από τις παρούσες πειραματικές συνθήκες. Αντίστοιχα με ότι συνέβη με την κατάσταση ενεργοποίησης της οδού MEK/ERK, η TMZ αύξησε στα U87 κύτταρα ενώ η BZ μείωσε και στις δύο κυτταρικές σειρές τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 σε σχέση με τα συνολικά τα οποία δεν επηρεάστηκαν. Στα T98G κύτταρα η BZ χορηγούμενη πριν την TMZ οδήγησε σε σημαντική αναστολή της

φωσφορυλίωσης (ενεργοποίησης) της STAT3 σε αντίθεση με την καθυστερημένη προσθήκη μετά την TMZ που αύξησε ελαφρά την ενεργοποιημένη STAT3. Στα U87 κύτταρα, ο συνδυασμός TMZ(1)/BZ(2) μείωσε τη φωσφορυλίωση της STAT3 σε αντίθεση με την αλληλουχία TMZ(2)/BZ(1) που οδήγησε σε ενεργοποίηση της οδού σε σύγκριση με το βασικό επίπεδο (Εικόνα 4.12).

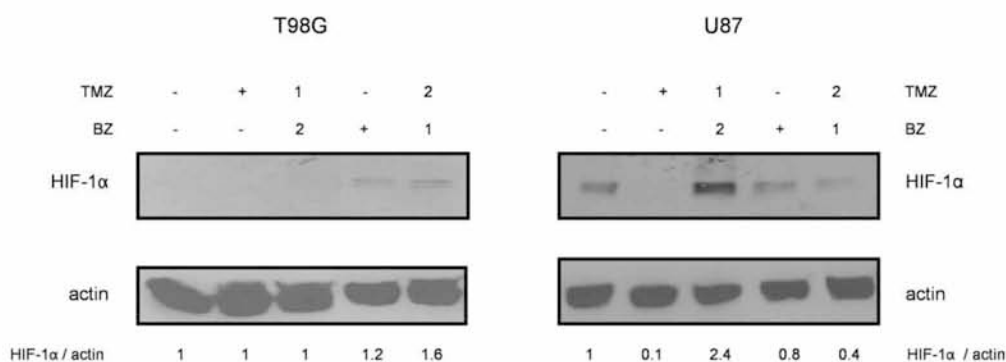


Εικόνα 4.12 Επίδραση BZ και TMZ στην φωσφορυλιωμένη (p-STAT3) και ολική STAT3. Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για p-STAT3 και STAT3. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επωάστηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επωάστηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων p-STAT3 σε σχέση με την ολική STAT3 έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.13 Οι συνδυασμοί μπορτεζομίμπης-τεμοζολομίδης προάγουν τη συσσώρευση του HIF-1α αλλά αναστέλλουν τη δράση του μέσω καταστολής της ενεργοποίησης των κινασών AKT και MAPK στα T98G και U87 κύτταρα ανάλογα με την αλληλουχία χορήγησης

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α είναι συχνά ενεργοποιημένος σε συνθήκες νρμοξίας στο γλοιοβλάστωμα και παίζει κεντρικό ρόλο στην διαμόρφωση της κακής πρόγνωσης αυτού του όγκου όχι μόνο μέσω προαγωγής της αγγειογένεσης και της διεισδυτικότητας

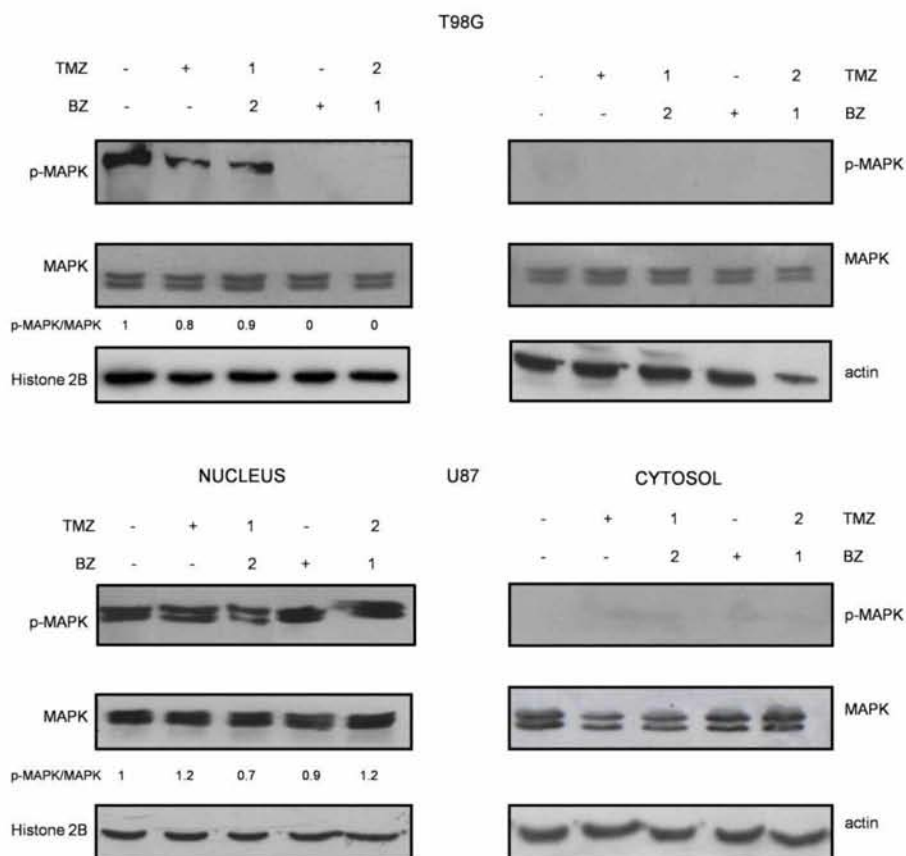
των κυττάρων αλλά και διαμέσου της χημειοαντοχής στην οποία οδηγεί η επαγωγή της MGMT [117]. Με βάση αυτά τα δεδομένα, εξετάστηκαν τυχόν μεταβολές των επιπέδων του HIF-1α κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Παρατηρήθηκε μια παράδοξη αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης HIF-1α στις ίδιες συνθήκες θεραπείας που προκάλεσαν μείωση των επιπέδων της MGMT, δηλαδή για τα T98G κύτταρα κατά τη χορήγηση BZ μόνο ή TMZ(2)/BZ(1) και για τα U87 κύτταρα κατά τη χορήγηση BZ ή TMZ(1)/BZ(2). Αυτή η σταθεροποίηση των επιπέδων του HIF-1α στη νορμοξία ήταν περισσότερο εκσεσημασμένη στα U87 κύτταρα αλλά παρατηρήθηκε σε μικρότερο βαθμό και στα T98G κύτταρα (Εικόνα 4.13.1).



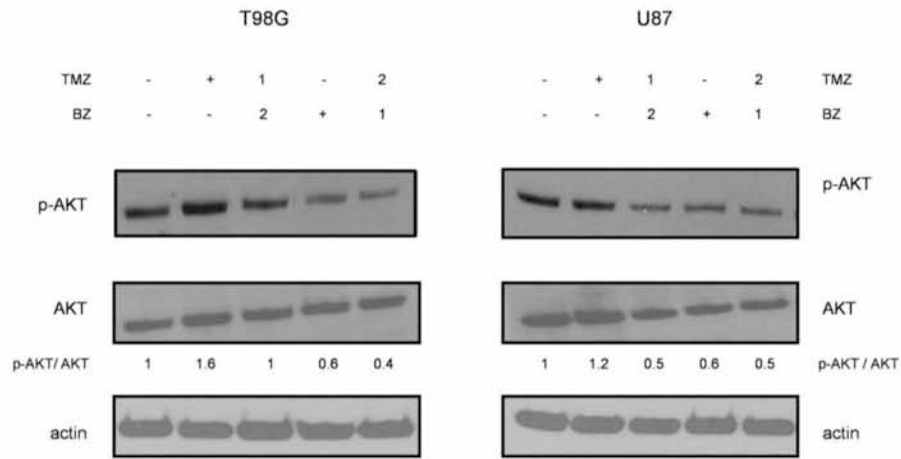
Εικόνα 4.13.1 Επίδραση BZ και TMZ στον HIF-1α σε νορμοξία. Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για HIF-1α. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων HIF-1α σε σχέση με την ακτίνη έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αυτά τα αποτελέσματα κατέστησαν αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση της κατάστασης ενεργοποίησης του HIF-1α, η οποία εξαρτάται κατά βάση: α) από τη δυνατότητα πυρηνικής μετατόπισης και ενεργοποίησης της μεταγραφικής του ενεργότητας, η οποία μεσολαβείται από την πυρηνική MAPK και β) από τη μετάφραση νεοσυντιθέμενου HIF-1α που

μεσολαβείται από την κινάση AKT [199-201]. Από τον έλεγχο τόσο της υποκυτταρικής εντόπισης και ενεργοποίησης της MAPK όσο και της κατάστασης ενεργοποίησης της AKT κινάσης στις ίδιες πειραματικές συνθήκες που οδήγησαν σε συσσώρευση του HIF-1α στη νορμοξία στα T98G και U87 κύτταρα, διαπιστώθηκε μειωμένη φωσφορυλίωση της πυρηνικής MAPK (Εικόνα 4.13.2) και της AKT κινάσης (Εικόνα 4.13.3), ευρήματα συμβατά με απουσία λειτουργικότητας του ανιχνεύσιμου HIF-1α και απουσία νεοσυντιθέμενου HIF-1α.



Εικόνα 4.13.2 Επίδραση BZ και TMZ στην υποκυτταρική εντόπιση και ενεργότητα της MAPK. Ανοσοαποτύπωση πυρηνικών και κυταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για p-MAPK και MAPK. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώτη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θρεπτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ιστόνη 2B χρησιμοποιήθηκε ως πυρηνικός δείκτης ισοφόρτωσης και η ακτίνη ως κυταροπλασματικός. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων p-MAPK σε σχέση με την ολική MAPK έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 4.13.3 Επίδραση BZ και TMZ στη φωσφορυλιωμένη (p-AKT) και ολική AKT. Ανοσοαποτύπωση ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων T98G και U87 για p-AKT και AKT. Οι αριθμοί 1, 2 αντιπροσωπεύουν τη σειρά προσθήκης κάθε φαρμάκου. Για την πρώιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0.1 μM BZ για 24 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 100μM TMZ για 16 ώρες. Για την όψιμη χορήγηση BZ, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 100μM TMZ για 16 ώρες και στη συνέχεια το θεραπευτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επώαστηκαν είτε με φρέσκο θεραπευτικό υλικό είτε με 0.1 μM BZ για 24 ώρες. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων p-AKT σε σχέση με την ολική AKT έγινε με πυκνομετρική ανάλυση, θεωρώντας αυθαίρετα την βασική έκφραση ως 1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτογενής ή δευτερογενής χημειοαντοχή, ιδιαίτερα η αντίσταση στην τεμοζολομίδη είναι κεντρικής σημασίας για την έκβαση των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και ο ρόλος της άμεσης επιδιόρθωσης των κυτταροτοξικών βλαβών μεθυλίωσης του DNA από την MGMT είναι κεφαλαιώδης για τη διαμόρφωση αυτής της αντίστασης, η οποία μεταφράζεται κλινικά σε μειωμένη ανταπόκριση και κακή πρόγνωση [68]. Πληθώρα νέων δεδομένων έρχεται συνεχώς να εμπλουτίσει τη γνώση πάνω στους μηχανισμούς αντίστασης του γλοιοβλαστώματος, προσφέροντας παράλληλα νέους θεραπευτικούς στόχους. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB αποτελεί ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα, όντας σταθερά ενεργοποιημένος με αποτέλεσμα προώθηση της χημειοαντοχής τόσο σε προκλινικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο και κακή πρόγνωση [181, 182]. Η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού p53 είναι ένας δεύτερος βασικός παράγοντας χημειοαντοχής με μεγάλη κλινική σημασία δεδομένου ότι στην υποομάδα των ασθενών με χαμηλή έκφραση MGMT, όσοι χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση mt p53 στους αντίστοιχους όγκους έχουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου και καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλή έκφραση mt p53 [202]. Σε μοριακό επίπεδο τόσο ο NFκB όσο και ο mt p53 επάγουν την έκφραση της MGMT στο επίπεδο της μεταγραφής [116, 187]. Δεδομένης της ιδιομορφίας του μηχανισμού δράσης της MGMT που περιλαμβάνει τη μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση και εξουδετέρωση ενός μορίου του ενζύμου για κάθε μεθυλιωμένη βάση του DNA που επιδιορθώνει [120], η αναγέννησή του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από νέα μεταγραφή. Υπό αυτό το πρίσμα θα πρέπει να ελέγχεται η αξία των διαφόρων στρατηγικών ευαισθητοποίησης στη χημειοθεραπεία, όπως π.χ. μέσω άμεσων αναστολέων που αποτελούν ψευδοϋπόστρωμα της MGMT, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την O6-BG. Πράγματι από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω αποδεικνύεται ότι ακόμη

και η παρατεταμένη συγχορήγηση BG και TMZ είναι αναποτελεσματική διότι δύο βασικοί μεταγραφικοί ρυθμιστές της MGMT, ο NFκB και ο mt p53 ενώ μειώνονται με τη συνδυασμένη θεραπεία, υπερεκφράζονται 24 ώρες μετά τη διακοπή της με αποτέλεσμα να αναπληρώνονται πλήρως τα επίπεδα τόσο του μεταγράμματος όσο και της πρωτεΐνης της MGMT. Ένας μηχανισμός δράσης που έχει περιγραφεί για το συνδυασμό BG και TMZ είναι η αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του NFκB λόγω μειωμένης πρόσδεσης του p65 στο γεμάτο O6-meG βλάβες DNA που καθιστά πιο πυκνή τη δομή της χρωματίνης [196].

Δεδομένης της άμεσης ρύθμισης της MGMT και του NFκB, καθώς και της έμμεσης ρύθμισης του mt p53 (μέσω Mdm2) σε επίπεδο πρωτεΐνης από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, η μικρή (20%) ελάττωση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας που παρατηρείται κατά το συνδυασμό BG και TMZ θα μπορούσε εν μέρει να οδηγήσει σε μειωμένη πυρηνική εντόπιση του NFκB και συνακόλουθη μείωση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του όπως η MGMT και πιθανώς και ο ίδιος ο NFκB π.χ μέσα από κυκλώματα ανατροφοδότησης. Παραδόξως, η υπολειπόμενη πρωτεασωμική δραστηριότητα θα μπορούσε να αποδομήσει το ανθιστάμενο στην πρωτεόλυση mt p53 λόγω προηγούμενης συσσώρευσης της αντίστοιχης E3 λιγκάσης, Mdm2 ή/και carboxy terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) [48, 203], ενώ η επάνοδος της πρωτεασωμικής δραστηριότητας μετά τη διακοπή της θεραπείας θα είχε αντίστροφα αποτελέσματα, επιτρέποντας την εκ νέου συσσώρευση του mt p53 και την αυξημένη ενεργοποίηση του NFκB. Επιπλέον, η ύπαρξη αλληλοσηματοδότησης και αλληλεπίδρασης μεταξύ mt p53 και NFκB αυξάνει την πολυπλοκότητα της υπάρχουσας ρύθμισης της MGMT από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες [204, 205]. Πάντως η αποδόμηση του απενεργοποιημένου ενζύμου από το πρωτεάσωμα με το συνδυασμό BG και TMZ φαίνεται να πυροδοτεί ένα αναδραστικό μηχανισμό αντισταθμιστικής αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου της στον οποίο συμμετέχουν, τουλάχιστον εν μέρει, οι μεταγραφικοί παράγοντες NFκB και mt p53 και η

σχετική αύξηση (σε σύγκριση με την αρχική μείωση) της δραστικότητας του πρωτεασώματος στα T98G κύτταρα. Η προσωρινή ελάττωση της δραστικότητας του πρωτεασώματος θα μπορούσε να οφείλεται σε κορεσμό του τελευταίου από την αύξηση του εξουδετερωμένου υποστρώματός του (MGMT) μετά τη βλάβη του DNA και η επάνοδός της να διευκολύνει την έκφραση νέας MGMT.

Από την άλλη πλευρά η στενή ρύθμιση τόσο της ίδιας της MGMT καθώς και του NFκΒ από την οδό ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος καθιστά εύλογο την έλεγχο αναστολέων του πρωτεασώματος, όπως η μπορτεζομίμη για τη διερεύνηση ύπαρξης μιας περισσότερο ειδικής δράσης, πέρα από την πλειοτροπική δράση που ασκούν σταθεροποιώντας πρωτεΐνες-υποστρώματα που αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και προάγουν την απόπτωση. Πράγματι, τα παρουσιαζόμενα αποτελέσματα από την χρήση της BZ σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος με υψηλή έκφραση MGMT υποστηρίζουν ένα νέο ρόλο της BZ ως αναστολέα της MGMT τόσο σε επίπεδο μεταγραφής, στο βαθμό που αυτή εξαρτάται από τον πυρηνικά εντοπιζόμενο NFκΒ, όσο και σε επίπεδο μετάφρασης, μέσω αυξημένης ενεργοποίησης του eIF2α. Η σημασία αυτής της αναστολής έγκειται στην παράλληλη δυνατότητα επαγωγής της απόπτωσης στα κύτταρα αυτά.

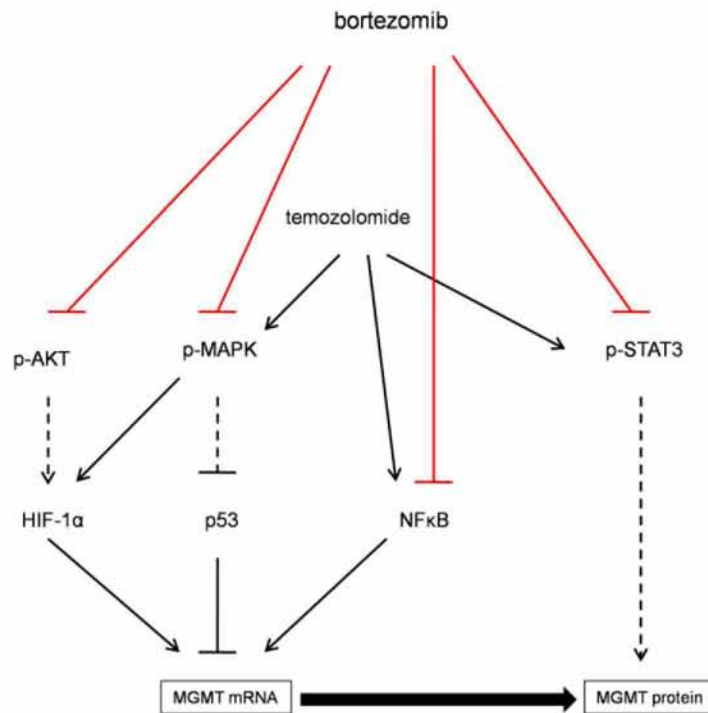
Αυτό το δεδομένο στοιχειοθετεί και τη δοκιμή του συνδυασμού BZ και TMZ ως στρατηγική πρόληψης ή αναστροφής της αντίστασης των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος στην TMZ, μέσω υπερέκφρασης της MGMT, ιδιαίτερα κατά το άμεσο χρονικό διάστημα μετά τη θεραπεία, όπως αποδείχθηκε με την O6-BG. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας αυτού του συνδυασμού σε μοριακό επίπεδο απαιτεί μια όσο το δυνατό πληρέστερη ανάλυση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την MGMT, γιατί όπως αποδείχθηκε με την O6-BG για την τεκμηρίωση της δραστικότητας δεν αρκεί μόνο η εξουδετέρωση της MGMT αλλά και των παραγόντων που εμπλέκονται στην επαγωγή της.

Μέχρι σήμερα, εκτός από το ρόλο του NFκB και του p53 (φυσιολογικού και μεταλλαγμένου), υπάρχουν δεδομένα που εμπλέκουν πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών στη μεταγραφική ρύθμιση της MGMT, όπως AP-1, Sp1, HIF1α, γλυκοκορτικοειδή, cAMP response element-binding protein (CEBP), p300 και MGMT enhancer binding protein (MEBP) [6, 117, 186, 188, 198, 206-209]. Επιπλέον, υπάρχει μετα-μεταγραφική ρύθμιση της MGMT από τη σηματοδότηση μέσω STAT3, καθώς και μέσω τροποποίησης του mRNA από microRNAs (miR), και ιδιαίτερα το miR-181d [118, 122]. Παρ' όλη αυτή τη γνώση για τους μηχανισμούς ρύθμισης της MGMT σε κυτταρικό επίπεδο, οι περισσότεροι από αυτούς δεν είναι γνωστό αν έχουν κλινική σημασία, με την μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου της MGMT να παραμένει ο μοναδικός ευρέως αποδεκτός και επιβεβαιωμένος μοριακός δείκτης ευαισθησίας του γλοιοβλαστώματος σε θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες [210]. Νεότερα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν τον ρόλο συγκεκριμένων οδών σηματοδότησης στον καθορισμό της έκβασης και της ανταπόκρισης τέτοιων ασθενών. Συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση και αυξημένη έκφραση των οδών MAPK, AKT και STAT3 είναι προβλεπτική χημειοανθεκτικότητας και κακής πρόγνωσης [211-213]. Επίσης η αυξημένη έκφραση του HIF-1α σχετίζεται με την απεικονιζόμενη νέκρωση σε MRI, εμπλουτίζοντας την προγνωστική πληροφορία που παρέχει το grade της νόσου [214, 215]. Επιπλέον έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι όλοι οι παραπάνω μοριακοί δείκτες δεν εμπλέκονται απλώς στη ρύθμιση της MGMT αλλά αποτελούν και δυνητικούς φαρμακευτικούς στόχους [116, 117, 186, 188]. Η υπόθεση ότι η αναστολή του πρωτεασώματος είναι μια λογική στρατηγική για την ευαισθητοποίηση των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος στην TMZ, βασιζόμενη σε προηγούμενα δεδομένα από τη χρήση αναστολέων πρωτεασώματος [157, 201, 216] επιβεβαιώνεται με κατηγορηματικό τρόπο

γιατί συσχετίζεται με τη ρύθμιση της ίδιας της MGMT και των σπουδαιότερων σε κλινικό επίπεδο ρυθμιστών της.

Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι αναδεικνύεται η σημασία της σειράς αλληλούχησης των δύο φαρμάκων στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, και η συσχέτιση του τελευταίου με τα κυριότερα μοριακά γεγονότα που εμπλέκονται στην ελάττωση της χημειοαντοχής που μεσολαβείται από την MGMT. Καταρχάς, επιβεβαιώνεται ότι η TMZ οδηγεί σε ενεργοποίηση της κανονικής οδού του NFκB με αύξηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας και της πρωτεολυτικής αποδόμησης του IκBα, καθώς και σε ενεργοποίηση των οδών MEK/ERK, STAT3 και AKT [116, 188, 201, 213] και οι αλλαγές αυτές συσχετίζονται με αύξηση της έκφρασης της MGMT.

Κατά δεύτερον αποδεικνύεται ότι η αναστολή του πρωτεασώματος με BZ ασκεί την κυτταροτοξική της δράση στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, πέρα από τους ήδη περιγραφέντες μηχανισμούς [157-159], και μέσω της αναστολής της έκφρασης MGMT. Σε επίπεδο μεταγραφής αυτή πραγματοποιείται από την BZ μέσω: α) ελάττωσης της πυρηνικής συσσώρευσης του NFκB β) ελάττωσης της ενεργοποίησης της p44/42 MAPK (ERK1/2) η οποία επηρεάζει τον άξονα Mdm2-p53 στα κύτταρα με wt p53 [188], αλλά και την ενεργοποίηση του ίδιου του NFκB μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης του IκB (IKK) [217], γ) ελάττωσης της ενεργοποίησης του AKT που επίσης εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NFκB με τον ίδιο τρόπο [217] και δ) ελάττωσης της πυρηνικής μετατόπισης-ενεργοποίησης του υπάρχοντος HIF-1α και της σύνθεσης νέου, που μεσολαβούνται από την ενεργοποιημένη πυρηνική MAPK και την AKT κινάση αντίστοιχα (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1 Σχηματικό μοντέλο των πιθανών μηχανισμών της BZ στην αναστολή της επαγόμενης από την TMZ έκφρασης της MGMT. Τα συνεχή βέλη αντιπροσωπεύουν μεταγραφική ρύθμιση ενώ τα διακεκομμένα βέλη παριστάνουν μετα-μεταγραφική ρύθμιση.

Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ρύθμισης της MGMT, η BZ μειώνει την ενεργοποίηση του STAT3. Ωστόσο, το προηγούμενο δεδομένο ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης STAT3 ανακάμπτουν σε ένα βαθμό μετά την προσθήκη ενός άλλου αναστολέα πρωτεασώματος, του MG132 σε αναστολέα STAT3 υποδηλώνει ότι η αναστολή που προκαλεί η BZ μπορεί να μη σχετίζεται με την αναστολή του πρωτεασώματος αυτή καθαυτή. Δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να προέρχεται η αναστολή των κινασών STAT3, MAPK και AKT από άμεση δράση της BZ ή έμμεσα επηρεάζοντας κάποια πρωτεΐνη-υπόστρωμα που εμπλέκεται στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσής τους. Σε άλλους τύπους κυττάρων έχει δειχθεί ότι ο cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A (CIP2A), που είναι αναστολέας της protein phosphatase 2A (PP2A), είναι ο κύριος μεσολαβητής της προ-αποπτωτικής δράσης της BZ μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της AKT κινάσης [218].

Η μεγιστοποίηση των παραπάνω δράσεων της BZ κατά το συνδυασμό της με την TMZ υπέδειξε μια μοναδική σειρά διαδοχικής χορήγησης στις συγκεκριμένες δόσεις και χρόνους έκθεσης που οδήγησε σε μεγιστοποίηση του κυτταροτοξικού συνεργικού αποτελέσματος από πλευράς κυτταρικής επιβίωσης και απόπτωσης η οποία ήταν διαφορετική ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές. Έτσι η πρώιμη χορήγηση BZ πρόλαβε την αντι-αποπτωτική απάντηση των T98G κυττάρων, που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη βασική έκφραση MGMT και πρωτογενή χημειοαντοχή. Αντίθετα η όψιμη χορήγηση BZ ενίσχυσε το προ-αποπτωτικό αποτέλεσμα της TMZ στα U87 κύτταρα cells. Αυτές οι παρατηρήσεις συνιστούν ένα πρότυπο χημειοευαισθητοποίησης στην TMZ από την BZ που είναι αντίστροφο μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών και εξαρτάται από τη σειρά χορήγησης των φαρμάκων.

Η μοναδική προηγούμενη ερευνητική αναφορά στο θέμα της διαδοχικής χορήγησης TMZ και BZ στο γλοιοβλάστωμα υποστηρίζει την καθυστερημένη χορήγηση BZ μετά από TMZ στα U87 κύτταρα παρουσιάζοντας δεδομένα αυξημένης κυτταροτοξικότητας σε σύγκριση με την πρώιμη ή την ταυτόχρονη χορήγηση [162]. Παρά τις διαφορές στη δοσολογία και τους χρόνους επώασης, τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας συμφωνούν με τα συμπεράσματά τους. Για την εξήγηση αυτών των διαφορών, οι Ng και συν. [162] πραγματοποίησαν έλεγχο της κατανομής των κυττάρων στον κύκλο, η οποία έδειξε να ευνοεί την καθυστερημένη χορήγηση BZ σε σχέση με την TMZ, γιατί οδήγησε σε ταχεία εμφάνιση (ημέρα 1) και γρήγορη λύση (ημέρα 3) της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M σε σύγκριση με την αντίθετη αλληλουχία ή την ταυτόχρονη χορήγηση, υπονοώντας ότι τα κύτταρα είτε οδηγήθηκαν σε θάνατο ή προχώρησαν στον επόμενο κύκλο χωρίς επιδιόρθωση των βλαβών του DNA που είχαν υποστεί [162]. Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας συμπληρώνουν και επεκτείνουν την παρατήρηση της διαδοχο-εξαρτώμενης αποτελεσματικότητας του

συνδυασμού TMZ και BZ καταδεικνύοντας ότι ο κεντρικός μηχανισμός αυτής της εξάρτησης είναι η MGMT, ως η βασική επιδιορθωτική οδός που εμπλέκεται στην βλάβη από αλκυλιωτικούς παράγοντες, σε προκλινικό και κλινικό επίπεδο.

Επιπλέον, όχι μόνο η μέγιστη μειορρύθμιση της MGMT αλλά και των κυριότερων ρυθμιστών της έκφρασης της NFκB, MAPK, AKT, STAT3 και HIF-1α είναι ουσιώδης για την εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής αναστολής της χημειοαντοχής στην TMZ.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα προτείνονται δύο πιθανά μοντέλα χημειοαντοχής στην TMZ και πρόβλεψης της ανταπόκρισης στο συνδυασμό TMZ και BZ στο γλοιοβλάστωμα. Το πρώτο μοντέλο προσομοιάζει τη συμπεριφορά των T98G κυττάρων, παρουσιάζοντας εγγενή ενεργοποίηση, σε βασικό επίπεδο, της έκφρασης MGMT και των σηματοδοτικών οδών που τη ρυθμίζουν (NFκB, MAPK, AKT, STAT3 και HIF-1α). Σ' αυτό το μοντέλο, η πρώιμη χορήγηση TMZ δεν προσφέρεται ως στρατηγική. Αντίθετα, η προ-θεραπεία με BZ μπορεί να αναστρέψει την πρωτογενή χημειοαντοχή επιτρέποντας μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στην TMZ που ακολουθεί. Το δεύτερο μοντέλο έχει τα χαρακτηριστικά των U87 κυττάρων, στα οποία η χαμηλή βασική έκφραση MGMT επιτρέπει την έναρξη με TMZ αλλά ωφελείται από την όψιμη προσθήκη BZ για την αντιστροφή της επαγόμενης χημειοαντοχής λόγω επαγωγής της MGMT μετά τη βλάβη του DNA.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι ο μηχανισμός χημειοευαισθητοποίησης μέσω αναστολής της σηματοδότησης των NFκB, MAPK, AKT, STAT3 και HIF-1α μπορεί να μην ολοκληρωτικά εξαρτώμενος από την MGMT. Επίσης, η αποτελεσματικότητα της TMZ έχει συσχετιστεί σε ευρεία κλίμακα με τη μεθυλίωση του εκκινητή της MGMT και όχι απαραίτητα με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης [219]. Ο λόγος γι' αυτή την αναντιστοιχία είναι κατά βάση τεχνικός και έγκειται στην ασυμφωνία της ιστοπαθολογικής εκτίμησης που εμπλέκει τις τεχνικές, την υποκειμενικότητα, το grade και τη ζώνη διήθησης. Παρ' όλα αυτά νεότερες

μελέτες αποδεικνύουν ότι η σωστή ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της MGMT μπορεί να αναδείξει την κλινική της σημασία ως προβλεπτικό παράγοντα βραδύτερης εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα [220, 221].

6. ΣΥΝΟΨΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε ο ρόλος της οδού ουβικουιτίνης πρωτεασώματος στην επαγόμενη από την MGMT αντοχή στην TMZ, παρατηρώντας την επίδραση της χρήσης της TMZ, του άμεσου αναστολέα της MGMT, O6-BG και του αναστολέα πρωτεασώματος μπορτεζομίμη σε κυτταρικά γεγονότα έκβασης (επιβίωση, απόπτωση) και σηματοδότησης (NFκB, MAPK, AKT, STAT3, HIF-1α) που σχετίζονται με την έκφραση της MGMT.

Αποδείχθηκε: α) ότι η ανάκαμψη της έκφρασης της MGMT μετά το συνδυασμό O6-BG και TMZ προέρχεται από νέα μεταγραφή σχετιζόμενη με τους μεταγραφικούς ρυθμιστές NFκB και mt p53 καθώς και με την επάνοδο της δραστηριότητας του πρωτεασώματος μετά από αρχική μείωση, β) η αναστολή του πρωτεασώματος από τη BZ καταστέλλει την έκφραση της MGMT σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης, ελαττώνοντας την ενεργοποίηση των οδών NFκB, MAPK, AKT, STAT3, HIF-1α και eIF2α και γ) η μεσολαβούμενη από τη BZ ελάττωση της επαγόμενης από την TMZ χημειοαντοχής εξαρτάται από τη σειρά προσθήκης της BZ, η οποία καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη διαφορετική βασική και επαγωγική έκφραση της MGMT και των ρυθμιστών της, NFκB, MAPK, AKT, STAT3 και HIF-1α. Επομένως, η εκτίμηση της βασικής έκφρασης στον όγκο, και όπου είναι δυνατό η επανεκτίμηση της MGMT και των κυριότερων παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμισή της ή ακόμη ο έλεγχος της πρωτεασωμικής δραστηριότητας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την επιλογή του συνδυασμού της θεραπείας με TMZ

και αναστολέα πρωτεασώματος στην κατεύθυνση της εξασφάλισης των μέγιστων δυνατών ανταποκρίσεων μέσα από την αναστροφή της πρωτογενούς ή/και την καθυστέρηση εμφάνισης δευτερογενούς χημειοαντοχής στους ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.

Βιβλιογραφία

- [1] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2012," *CA Cancer J Clin*, vol. 62, pp. 10-29.
- [2] J. L. Fisher, J. A. Schwartzbaum, M. Wrensch, and J. L. Wiemels, "Epidemiology of brain tumors," *Neurol Clin*, vol. 25, pp. 867-90, vii, 2007.
- [3] W. J. Curran, Jr., C. B. Scott, J. Horton, J. S. Nelson, A. S. Weinstein, A. J. Fischbach, C. H. Chang, M. Rotman, S. O. Asbell, R. E. Krisch, and et al., "Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials," *J Natl Cancer Inst*, vol. 85, pp. 704-10, 1993.
- [4] P. Y. Wen and S. Kesari, "Malignant gliomas in adults," *N Engl J Med*, vol. 359, pp. 492-507, 2008.
- [5] R. Stupp, J. C. Tonn, M. Brada, and G. Pentheroudakis, "High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann Oncol*, vol. 21 Suppl 5, pp. v190-3.
- [6] M. S. Huen and J. Chen, "The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications," *Cell Res*, vol. 18, pp. 8-16, 2008.
- [7] S. Shete, F. J. Hosking, L. B. Robertson, S. E. Dobbins, M. Sanson, B. Malmer, M. Simon, Y. Marie, B. Boisselier, J. Y. Delattre, K. Hoang-Xuan, S. El Hallani, A. Idbaih, D. Zelenika, U. Andersson, R. Henriksson, A. T. Bergenheim, M. Feychting, S. Lonn, A. Ahlbom, J. Schramm, M. Linnebank, K. Hemminki, R. Kumar, S. J. Hepworth, A. Price, G. Armstrong, Y. Liu, X. Gu, R. Yu, C. Lau, M. Schoemaker, K. Muir, A. Swerdlow, M. Lathrop, M. Bondy, and R. S. Houlston, "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma," *Nat Genet*, vol. 41, pp. 899-904, 2009.
- [8] M. Wrensch, R. B. Jenkins, J. S. Chang, R. F. Yeh, Y. Xiao, P. A. Decker, K. V. Ballman, M. Berger, J. C. Buckner, S. Chang, C. Giannini, C. Halder, T. M. Kollmeyer, M. L. Kosel, D. H. LaChance, L. McCoy, B. P. O'Neill, J. Patoka, A. R. Pico, M. Prados, C. Quesenberry, T. Rice, A. L. Rynearson, I. Smirnov, T. Tihan, J. Wiemels, P. Yang, and J. K. Wiencke, "Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility," *Nat Genet*, vol. 41, pp. 905-8, 2009.
- [9] K. Gousias, M. Markou, S. Voulgaris, A. Goussia, P. Voulgari, M. Bai, K. Polyzoidis, A. Kyritsis, and Y. Alamanos, "Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005-2007," *Neuroepidemiology*, vol. 33, pp. 89-95, 2009.
- [10] J. G. Cairncross, K. Ueki, M. C. Zlatescu, D. K. Lisle, D. M. Finkelstein, R. R. Hammond, J. S. Silver, P. C. Stark, D. R. Macdonald, Y. Ino, D. A. Ramsay, and D. N. Louis, "Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas," *J Natl Cancer Inst*, vol. 90, pp. 1473-9, 1998.
- [11] G. Cairncross, B. Berkey, E. Shaw, R. Jenkins, B. Scheithauer, D. Brachman, J. Buckner, K. Fink, L. Souhami, N. Laperriere, M. Mehta, and W. Curran, "Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402," *J Clin Oncol*, vol. 24, pp. 2707-14, 2006.

- [12] J. T. Huse and E. C. Holland, "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma," *Nat Rev Cancer*, vol. 10, pp. 319-31.
- [13] P. Kleihues and H. Ohgaki, "Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis," *Neuro Oncol*, vol. 1, pp. 44-51, 1999.
- [14] E. R. Laws, I. F. Parney, W. Huang, F. Anderson, A. M. Morris, A. Asher, K. O. Lillehei, M. Bernstein, H. Brem, A. Sloan, M. S. Berger, and S. Chang, "Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project," *J Neurosurg*, vol. 99, pp. 467-73, 2003.
- [15] M. Lacroix, D. Abi-Said, D. R. Fournay, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, and R. Sawaya, "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival," *J Neurosurg*, vol. 95, pp. 190-8, 2001.
- [16] J. R. Simpson, J. Horton, C. Scott, W. J. Curran, P. Rubin, J. Fischbach, S. Isaacson, M. Rotman, S. O. Asbell, J. S. Nelson, and et al., "Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 26, pp. 239-44, 1993.
- [17] J. R. Wood, S. B. Green, and W. R. Shapiro, "The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the Brain Tumor Cooperative Group," *J Clin Oncol*, vol. 6, pp. 338-43, 1988.
- [18] F. G. Barker, 2nd, S. M. Chang, P. H. Gutin, M. K. Malec, M. W. McDermott, M. D. Prados, and C. B. Wilson, "Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme," *Neurosurgery*, vol. 42, pp. 709-20; discussion 720-3, 1998.
- [19] J. K. Park, T. Hodges, L. Arko, M. Shen, D. Dello Iacono, A. McNabb, N. Olsen Bailey, T. N. Kreisl, F. M. Iwamoto, J. Sul, S. Auh, G. E. Park, H. A. Fine, and P. M. Black, "Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme," *J Clin Oncol*, vol. 28, pp. 3838-43.
- [20] R. Stupp and F. Roila, "Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann Oncol*, vol. 20 Suppl 4, pp. 126-8, 2009.
- [21] M. D. Walker, E. Alexander, Jr., W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, Jr., J. Mealey, Jr., H. A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C. B. Wilson, E. A. Gehan, and T. A. Strike, "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial," *J Neurosurg*, vol. 49, pp. 333-43, 1978.
- [22] K. Kristiansen, S. Hagen, T. Kollevold, A. Torvik, I. Holme, R. Nesbakken, R. Hatlevoll, M. Lindgren, A. Brun, S. Lindgren, G. Notter, A. P. Andersen, and K. Elgen, "Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group," *Cancer*, vol. 47, pp. 649-52, 1981.
- [23] W. Roa, P. M. Brasher, G. Bauman, M. Anthes, E. Bruera, A. Chan, B. Fisher, D. Fulton, S. Gulavita, C. Hao, S. Husain, A. Murtha, K. Petruk, D. Stewart, P. Tai, R. Urtasun, J. G. Cairncross, and P. Forsyth, "Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial," *J Clin Oncol*, vol. 22, pp. 1583-8, 2004.

- [24] L. Souhami, W. Seiferheld, D. Brachman, E. B. Podgorsak, M. Werner-Wasik, R. Lustig, C. J. Schultz, W. Sause, P. Okunieff, J. Buckner, L. Zamorano, M. P. Mehta, and W. J. Curran, Jr., "Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 60, pp. 853-60, 2004.
- [25] N. J. Laperriere, P. M. Leung, S. McKenzie, M. Milosevic, S. Wong, J. Glen, M. Pintilie, and M. Bernstein, "Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 41, pp. 1005-11, 1998.
- [26] K. P. Becker and J. Yu, "Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma," *Cancer J*, vol. 18, pp. 12-9.
- [27] I. Yang and M. K. Aghi, "New advances that enable identification of glioblastoma recurrence," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 6, pp. 648-57, 2009.
- [28] C. G. Hadjipanayis and E. G. Van Meir, "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies," *Trends Mol Med*, vol. 15, pp. 519-30, 2009.
- [29] C. G. Hadjipanayis and E. G. Van Meir, "Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy," *J Mol Med (Berl)*, vol. 87, pp. 363-74, 2009.
- [30] R. M. Bachoo, E. A. Maher, K. L. Ligon, N. E. Sharpless, S. S. Chan, M. J. You, Y. Tang, J. DeFrances, E. Stover, R. Weissleder, D. H. Rowitch, D. N. Louis, and R. A. DePinho, "Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis," *Cancer Cell*, vol. 1, pp. 269-77, 2002.
- [31] T. A. Libermann, H. R. Nusbaum, N. Razon, R. Kris, I. Lax, H. Soreq, N. Whittle, M. D. Waterfield, A. Ullrich, and J. Schlessinger, "Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin," *Nature*, vol. 313, pp. 144-7, 1985.
- [32] R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, and D. N. Hayes, "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1," *Cancer Cell*, vol. 17, pp. 98-110.
- [33] D. Koul, R. Shen, S. Shishodia, Y. Takada, K. P. Bhat, S. A. Reddy, B. B. Aggarwal, and W. K. Yung, "PTEN down regulates AP-1 and targets c-fos in human glioma cells via PI3-kinase/Akt pathway," *Mol Cell Biochem*, vol. 300, pp. 77-87, 2007.
- [34] D. W. Parsons, S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler, "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme," *Science*, vol. 321, pp. 1807-12, 2008.
- [35] S. Zhao, Y. Lin, W. Xu, W. Jiang, Z. Zha, P. Wang, W. Yu, Z. Li, L. Gong, Y. Peng, J. Ding, Q. Lei, K. L. Guan, and Y. Xiong, "Glioma-derived mutations in IDH1

- dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α ," *Science*, vol. 324, pp. 261-5, 2009.
- [36] V. E. Belozero and E. G. Van Meir, "Inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 signaling," *Curr Opin Investig Drugs*, vol. 7, pp. 1067-76, 2006.
- [37] L. Dang, D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, K. M. Marks, R. M. Prins, P. S. Ward, K. E. Yen, L. M. Liau, J. D. Rabinowitz, L. C. Cantley, C. B. Thompson, M. G. Vander Heiden, and S. M. Su, "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate," *Nature*, vol. 462, pp. 739-44, 2009.
- [38] G. P. Dunn, M. L. Rinne, J. Wykosky, G. Genovese, S. N. Quayle, I. F. Dunn, P. K. Agarwalla, M. G. Chheda, B. Campos, A. Wang, C. Brennan, K. L. Ligon, F. Furnari, W. K. Cavenee, R. A. Depinho, L. Chin, and W. C. Hahn, "Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma," *Genes Dev*, vol. 26, pp. 756-84.
- [39] "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," *Nature*, vol. 455, pp. 1061-8, 2008.
- [40] E. G. Van Meir, C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, H. K. Shu, P. Y. Wen, and J. J. Olson, "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma," *CA Cancer J Clin*, vol. 60, pp. 166-93.
- [41] Q. Cheng and J. Chen, "Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage," *Cell Cycle*, vol. 9, pp. 472-8.
- [42] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, pp. 646-74.
- [43] E. J. Fox, J. J. Salk, and L. A. Loeb, "Cancer genome sequencing--an interim analysis," *Cancer Res*, vol. 69, pp. 4948-50, 2009.
- [44] J. T. Huse, H. S. Phillips, and C. W. Brennan, "Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos," *Glia*, vol. 59, pp. 1190-9.
- [45] Y. Liang, M. Diehn, N. Watson, A. W. Bollen, K. D. Aldape, M. K. Nicholas, K. R. Lamborn, M. S. Berger, D. Botstein, P. O. Brown, and M. A. Israel, "Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, pp. 5814-9, 2005.
- [46] C. L. Nutt, D. R. Mani, R. A. Betensky, P. Tamayo, J. G. Cairncross, C. Ladd, U. Pohl, C. Hartmann, M. E. McLaughlin, T. T. Batchelor, P. M. Black, A. von Deimling, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, and D. N. Louis, "Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification," *Cancer Res*, vol. 63, pp. 1602-7, 2003.
- [47] H. S. Phillips, S. Kharbanda, R. Chen, W. F. Forrest, R. H. Soriano, T. D. Wu, A. Misra, J. M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P. M. Williams, Z. Modrusan, B. G. Feuerstein, and K. Aldape, "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis," *Cancer Cell*, vol. 9, pp. 157-73, 2006.
- [48] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich, "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response," *Nature*, vol. 444, pp. 756-60, 2006.

- [49] S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks, "Identification of human brain tumour initiating cells," *Nature*, vol. 432, pp. 396-401, 2004.
- [50] S. Alcantara Llaguno, J. Chen, C. H. Kwon, E. L. Jackson, Y. Li, D. K. Burns, A. Alvarez-Buylla, and L. F. Parada, "Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model," *Cancer Cell*, vol. 15, pp. 45-56, 2009.
- [51] C. Doil, N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D. H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas, and C. Lukas, "RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins," *Cell*, vol. 136, pp. 435-46, 2009.
- [52] H. S. Huang, M. Nagane, C. K. Klingbeil, H. Lin, R. Nishikawa, X. D. Ji, C. M. Huang, G. N. Gill, H. S. Wiley, and W. K. Cavenee, "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling," *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 2927-35, 1997.
- [53] A. B. Heimberger, R. Hlatky, D. Suki, D. Yang, J. Weinberg, M. Gilbert, R. Sawaya, and K. Aldape, "Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients," *Clin Cancer Res*, vol. 11, pp. 1462-6, 2005.
- [54] M. M. Inda, R. Bonavia, A. Mukasa, Y. Narita, D. W. Sah, S. Vandenberg, C. Brennan, T. G. Johns, R. Bachoo, P. Hadwiger, P. Tan, R. A. Depinho, W. Cavenee, and F. Furnari, "Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma," *Genes Dev*, vol. 24, pp. 1731-45.
- [55] D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, A. M. Roccaro, and A. Vacca, "The history of the angiogenic switch concept," *Leukemia*, vol. 21, pp. 44-52, 2007.
- [56] M. Kioi, H. Vogel, G. Schultz, R. M. Hoffman, G. R. Harsh, and J. M. Brown, "Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice," *J Clin Invest*, vol. 120, pp. 694-705.
- [57] Y. Soda, T. Marumoto, D. Friedmann-Morvinski, M. Soda, F. Liu, H. Michiue, S. Pastorino, M. Yang, R. M. Hoffman, S. Kesari, and I. M. Verma, "Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, pp. 4274-80.
- [58] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression," *Nature*, vol. 432, pp. 332-7, 2004.
- [59] M. Maxwell, T. Galanopoulos, J. Neville-Golden, and H. N. Antoniades, "Effect of the expression of transforming growth factor-beta 2 in primary human glioblastomas on immunosuppression and loss of immune surveillance," *J Neurosurg*, vol. 76, pp. 799-804, 1992.
- [60] A. M. Sonabend, C. E. Rolle, and M. S. Lesniak, "The role of regulatory T cells in malignant glioma," *Anticancer Res*, vol. 28, pp. 1143-50, 2008.
- [61] A. T. Parsa, J. S. Waldron, A. Panner, C. A. Crane, I. F. Parney, J. J. Barry, K. E. Cachola, J. C. Murray, T. Tihan, M. C. Jensen, P. S. Mischel, D. Stokoe, and R. O. Pieper, "Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma," *Nat Med*, vol. 13, pp. 84-8, 2007.
- [62] T. Roszman, L. Elliott, and W. Brooks, "Modulation of T-cell function by gliomas," *Immunol Today*, vol. 12, pp. 370-4, 1991.

- [63] Y. Gu, C. Wang, C. M. Roifman, and A. Cohen, "Role of MHC class I in immune surveillance of mitochondrial DNA integrity," *J Immunol*, vol. 170, pp. 3603-7, 2003.
- [64] T. F. Gajewski, Y. Meng, C. Blank, I. Brown, A. Kacha, J. Kline, and H. Harlin, "Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment," *Immunol Rev*, vol. 213, pp. 131-45, 2006.
- [65] R. P. Nagarajan and J. F. Costello, "Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme," *Semin Cancer Biol*, vol. 19, pp. 188-97, 2009.
- [66] H. Nouchmehr, D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara, B. P. Berman, F. Pan, C. E. Pelloski, E. P. Sulman, K. P. Bhat, R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, D. N. Hayes, C. M. Perou, H. K. Schmidt, L. Ding, R. K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L. M. Cope, J. Buckley, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. W. Laird, and K. Aldape, "Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma," *Cancer Cell*, vol. 17, pp. 510-22.
- [67] K. Tano, S. Shiota, J. Collier, R. S. Foote, and S. Mitra, "Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, pp. 686-90, 1990.
- [68] M. E. Hegi, L. Liu, J. G. Herman, R. Stupp, W. Wick, M. Weller, M. P. Mehta, and M. R. Gilbert, "Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity," *J Clin Oncol*, vol. 26, pp. 4189-99, 2008.
- [69] T. Mikeska, C. Bock, O. El-Maarri, A. Hubner, D. Ehrentraut, J. Schramm, J. Felsberg, P. Kahl, R. Buttner, T. Pietsch, and A. Waha, "Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis," *J Mol Diagn*, vol. 9, pp. 368-81, 2007.
- [70] G. S. Watts, R. O. Pieper, J. F. Costello, Y. M. Peng, W. S. Dalton, and B. W. Futscher, "Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene," *Mol Cell Biol*, vol. 17, pp. 5612-9, 1997.
- [71] M. E. Hegi, A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, and R. Stupp, "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma," *N Engl J Med*, vol. 352, pp. 997-1003, 2005.
- [72] A. L. Rivera, C. E. Pelloski, M. R. Gilbert, H. Colman, C. De La Cruz, E. P. Sulman, B. N. Bekele, and K. D. Aldape, "MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma," *Neuro Oncol*, vol. 12, pp. 116-21.
- [73] M. Nitta, D. Kozono, R. Kennedy, J. Stommel, K. Ng, P. O. Zinn, D. Kushwaha, S. Kesari, M. D. Inda, J. Wykosky, F. Furnari, K. A. Hoadley, L. Chin, R. A. DePinho, W. K. Cavenee, A. D'Andrea, and C. C. Chen, "Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy," *PLoS One*, vol. 5, pp. e10767.
- [74] J. H. Hoeijmakers, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer," *Nature*, vol. 411, pp. 366-74, 2001.
- [75] M. Stucki, J. A. Clapperton, D. Mohammad, M. B. Yaffe, S. J. Smerdon, and S. P. Jackson, "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks," *Cell*, vol. 123, pp. 1213-26, 2005.

- [76] J. W. Harper and S. J. Elledge, "The DNA damage response: ten years after," *Mol Cell*, vol. 28, pp. 739-45, 2007.
- [77] B. M. Alexander, N. Pinnell, P. Y. Wen, and A. D'Andrea, "Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma," *J Neurooncol*, vol. 107, pp. 463-77.
- [78] P. Bouwman and J. Jonkers, "The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance," *Nat Rev Cancer*, vol. 12, pp. 587-98.
- [79] H. van Attikum and S. M. Gasser, "The histone code at DNA breaks: a guide to repair?," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, pp. 757-65, 2005.
- [80] J. H. Lee and T. T. Paull, "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex," *Science*, vol. 308, pp. 551-4, 2005.
- [81] C. J. Bakkenist and M. B. Kastan, "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation," *Nature*, vol. 421, pp. 499-506, 2003.
- [82] T. T. Paull, E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner, "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage," *Curr Biol*, vol. 10, pp. 886-95, 2000.
- [83] H. Kim, J. Chen, and X. Yu, "Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response," *Science*, vol. 316, pp. 1202-5, 2007.
- [84] S. Kesari, S. J. Advani, J. D. Lawson, K. T. Kahle, K. Ng, B. Carter, and C. C. Chen, "DNA damage response and repair: insights into strategies for radiation sensitization of gliomas," *Future Oncol*, vol. 7, pp. 1335-46.
- [85] R. T. Abraham, "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases," *Genes Dev*, vol. 15, pp. 2177-96, 2001.
- [86] T. Waldman, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 5187-90, 1995.
- [87] F. Bunz, A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage," *Science*, vol. 282, pp. 1497-501, 1998.
- [88] T. A. Chan, H. Hermeking, C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage," *Nature*, vol. 401, pp. 616-20, 1999.
- [89] K. A. Cimprich and D. Cortez, "ATR: an essential regulator of genome integrity," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, pp. 616-27, 2008.
- [90] J. Campisi and F. d'Adda di Fagagna, "Cellular senescence: when bad things happen to good cells," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, pp. 729-40, 2007.
- [91] M. R. Stratton, P. J. Campbell, and P. A. Futreal, "The cancer genome," *Nature*, vol. 458, pp. 719-24, 2009.
- [92] R. G. Bristow and R. P. Hill, "Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability," *Nat Rev Cancer*, vol. 8, pp. 180-92, 2008.
- [93] M. Squatrito, C. W. Brennan, K. Helmy, J. T. Huse, J. H. Petrini, and E. C. Holland, "Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas," *Cancer Cell*, vol. 18, pp. 619-29.

- [94] M. Squatrito and E. C. Holland, "DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance," *Cancer Res*, vol. 71, pp. 5945-9.
- [95] S. E. Golding, E. Rosenberg, A. Khalil, A. McEwen, M. Holmes, S. Neill, L. F. Povirk, and K. Valerie, "Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 15402-10, 2004.
- [96] S. E. Golding, E. Rosenberg, N. Valerie, I. Hussaini, M. Frigerio, X. F. Cockcroft, W. Y. Chong, M. Hummersone, L. Rigoreau, K. A. Menear, M. J. O'Connor, L. F. Povirk, T. van Meter, and K. Valerie, "Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion," *Mol Cancer Ther*, vol. 8, pp. 2894-902, 2009.
- [97] H. Jiang, H. C. Reinhardt, J. Bartkova, J. Tommiska, C. Blomqvist, H. Nevanlinna, J. Bartek, M. B. Yaffe, and M. T. Hemann, "The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response," *Genes Dev*, vol. 23, pp. 1895-909, 2009.
- [98] Y. Hirose, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 5843-9, 2001.
- [99] Y. Hirose, M. Katayama, O. K. Mirzoeva, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence," *Cancer Res*, vol. 65, pp. 4861-9, 2005.
- [100] S. E. Mir, P. C. De Witt Hamer, P. M. Krawczyk, L. Balaj, A. Claes, J. M. Niers, A. A. Van Tilborg, A. H. Zwiderman, D. Geerts, G. J. Kaspers, W. Peter Vandertop, J. Cloos, B. A. Tannous, P. Wesseling, J. A. Aten, D. P. Noske, C. J. Van Noorden, and T. Wurdinger, "In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma," *Cancer Cell*, vol. 18, pp. 244-57.
- [101] S. E. Golding, R. N. Morgan, B. R. Adams, A. J. Hawkins, L. F. Povirk, and K. Valerie, "Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells," *Cancer Biol Ther*, vol. 8, pp. 730-8, 2009.
- [102] B. McEllin, C. V. Camacho, B. Mukherjee, B. Hahm, N. Tomimatsu, R. M. Bachoo, and S. Burma, "PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors," *Cancer Res*, vol. 70, pp. 5457-64.
- [103] G. D. Kao, Z. Jiang, A. M. Fernandes, A. K. Gupta, and A. Maity, "Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation," *J Biol Chem*, vol. 282, pp. 21206-12, 2007.
- [104] L. Geng, E. T. Shinohara, D. Kim, J. Tan, K. Osusky, Y. Shyr, and D. E. Hallahan, "STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 64, pp. 263-71, 2006.
- [105] F. B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho, and W. K. Cavenee, "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment," *Genes Dev*, vol. 21, pp. 2683-710, 2007.

- [106] J. Bartkova, P. Hamerlik, M. T. Stockhausen, J. Ehrmann, A. Hlobilkova, H. Laursen, O. Kalita, Z. Kolar, H. S. Poulsen, H. Broholm, J. Lukas, and J. Bartek, "Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas," *Oncogene*, vol. 29, pp. 5095-102.
- [107] R. D. Kennedy and A. D. D'Andrea, "DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes," *J Clin Oncol*, vol. 24, pp. 3799-808, 2006.
- [108] A. E. Pegg, "Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools," *Chem Res Toxicol*, vol. 24, pp. 618-39.
- [109] H. S. Friedman, T. Kerby, and H. Calvert, "Temozolomide and treatment of malignant glioma," *Clin Cancer Res*, vol. 6, pp. 2585-97, 2000.
- [110] J. Zhang, M. F. Stevens, and T. D. Bradshaw, "Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance," *Curr Mol Pharmacol*, vol. 5, pp. 102-14.
- [111] B. Kaina, M. Christmann, S. Naumann, and W. P. Roos, "MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents," *DNA Repair (Amst)*, vol. 6, pp. 1079-99, 2007.
- [112] G. V. Koukourakis, V. Kouloulis, G. Zacharias, C. Papadimitriou, P. Pantelakos, G. Maravelis, A. Fotineas, I. Beli, D. Chaldepoulos, and J. Kouvaris, "Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article," *Molecules*, vol. 14, pp. 1561-77, 2009.
- [113] G. Frosina, "DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy," *Mol Cancer Res*, vol. 7, pp. 989-99, 2009.
- [114] G. P. Margison, A. C. Povey, B. Kaina, and M. F. Santibanez Koref, "Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase," *Carcinogenesis*, vol. 24, pp. 625-35, 2003.
- [115] M. Christmann, B. Verbeek, W. P. Roos, and B. Kaina, "O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1816, pp. 179-90.
- [116] I. Lavon, D. Fuchs, D. Zrihan, G. Efroni, B. Zelikovitch, Y. Fellig, and T. Siegal, "Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase," *Cancer Res*, vol. 67, pp. 8952-9, 2007.
- [117] L. Persano, F. Pistollato, E. Rampazzo, A. Della Puppa, S. Abbadi, C. Frasson, F. Volpin, S. Indraccolo, R. Scienza, and G. Basso, "BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1alpha stability and MGMT expression," *Cell Death Dis*, vol. 3, pp. e412.
- [118] W. Zhang, J. Zhang, K. Hoadley, D. Kushwaha, V. Ramakrishnan, S. Li, C. Kang, Y. You, C. Jiang, S. W. Song, T. Jiang, and C. C. Chen, "miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression," *Neuro Oncol*, vol. 14, pp. 712-9.
- [119] K. S. Srivenugopal, X. H. Yuan, H. S. Friedman, and F. Ali-Osman, "Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 1328-34, 1996.

- [120] M. Xu-Welliver and A. E. Pegg, "Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase," *Carcinogenesis*, vol. 23, pp. 823-30, 2002.
- [121] A. E. Pegg, M. E. Dolan, and R. C. Moschel, "Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase," *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, vol. 51, pp. 167-223, 1995.
- [122] S. Kohsaka, L. Wang, K. Yachi, R. Mahabir, T. Narita, T. Itoh, M. Tanino, T. Kimura, H. Nishihara, and S. Tanaka, "STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression," *Mol Cancer Ther*, vol. 11, pp. 1289-99.
- [123] S. Mason and K. McDonald, "MGMT testing for glioma in clinical laboratories: discordance with methylation analyses prevents the implementation of routine immunohistochemistry," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 138, pp. 1789-97.
- [124] G. Tabatabai, M. Hegi, R. Stupp, and M. Weller, "Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers for malignant glioma," *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 12, pp. 302-7.
- [125] J. N. Sarkaria, G. J. Kitange, C. D. James, R. Plummer, H. Calvert, M. Weller, and W. Wick, "Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma," *Clin Cancer Res*, vol. 14, pp. 2900-8, 2008.
- [126] C. P. Haar, P. Hebbbar, G. C. t. Wallace, A. Das, W. A. Vandergrift, 3rd, J. A. Smith, P. Giglio, S. J. Patel, S. K. Ray, and N. L. Banik, "Drug resistance in glioblastoma: a mini review," *Neurochem Res*, vol. 37, pp. 1192-200.
- [127] A. Murat, E. Migliavacca, T. Gorlia, W. L. Lambiv, T. Shay, M. F. Hamou, N. de Tribolet, L. Regli, W. Wick, M. C. Kouwenhoven, J. A. Hainfellner, F. L. Heppner, P. Y. Dietrich, Y. Zimmer, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, E. Domany, M. Delorenzi, R. Stupp, and M. E. Hegi, "Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma," *J Clin Oncol*, vol. 26, pp. 3015-24, 2008.
- [128] J. L. Villano, T. E. Seery, and L. R. Bressler, "Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 64, pp. 647-55, 2009.
- [129] C. A. Rabik, M. C. Njoku, and M. E. Dolan, "Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy," *Cancer Treat Rev*, vol. 32, pp. 261-76, 2006.
- [130] B. Kaina, G. P. Margison, and M. Christmann, "Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy," *Cell Mol Life Sci*, vol. 67, pp. 3663-81.
- [131] J. A. Quinn, S. X. Jiang, D. A. Reardon, A. Desjardins, J. J. Vredenburgh, J. N. Rich, S. Gururangan, A. H. Friedman, D. D. Bigner, J. H. Sampson, R. E. McLendon, J. E. Herndon, 2nd, A. Walker, and H. S. Friedman, "Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma," *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 1262-7, 2009.
- [132] G. Jiang, L. T. Li, Y. Xin, L. Zhang, Y. Q. Liu, and J. N. Zheng, "Strategies to improve the killing of tumors using temozolomide: targeting the DNA repair protein MGMT," *Curr Med Chem*, vol. 19, pp. 3886-92.
- [133] N. H. Rekers, P. Sminia, and G. J. Peters, "Towards tailored therapy of glioblastoma multiforme," *J Chemother*, vol. 23, pp. 187-99.

- [134] S. Quiros, W. P. Roos, and B. Kaina, "Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs," *PLoS One*, vol. 6, pp. e27183.
- [135] T. C. Johannessen and R. Bjerkvig, "Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme," *Expert Rev Anticancer Ther*, vol. 12, pp. 635-42.
- [136] G. N. Demartino and T. G. Gillette, "Proteasomes: machines for all reasons," *Cell*, vol. 129, pp. 659-62, 2007.
- [137] C. M. Pickart and R. E. Cohen, "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 5, pp. 177-87, 2004.
- [138] C. N. Papandreou and C. J. Logothetis, "Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 5036-43, 2004.
- [139] D. M. Cyr, J. Hohfeld, and C. Patterson, "Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold," *Trends Biochem Sci*, vol. 27, pp. 368-75, 2002.
- [140] J. Miller and C. Gordon, "The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins," *FEBS Lett*, vol. 579, pp. 3224-30, 2005.
- [141] J. Adams, V. J. Palombella, E. A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D. D. Lazarus, J. Maas, C. S. Pien, S. Prakash, and P. J. Elliott, "Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents," *Cancer Res*, vol. 59, pp. 2615-22, 1999.
- [142] C. Naujokat, D. Fuchs, and C. Berges, "Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, pp. 1389-97, 2007.
- [143] F. M. Boisvert, Y. W. Lam, D. Lamont, and A. I. Lamond, "A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage," *Mol Cell Proteomics*, vol. 9, pp. 457-70.
- [144] P. J. Vlachostergios, I. A. Voutsadakis, and C. N. Papandreou, "The ubiquitin-proteasome system in glioma cell cycle control," *Cell Div*, vol. 7, pp. 18.
- [145] P. J. Vlachostergios and C. N. Papandreou, "The Bmi-1/NF-kappaB/VEGF story: another hint for proteasome involvement in glioma angiogenesis?," *J Cell Commun Signal*.
- [146] B. Kaur, F. W. Khwaja, E. A. Severson, S. L. Matheny, D. J. Brat, and E. G. Van Meir, "Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis," *Neuro Oncol*, vol. 7, pp. 134-53, 2005.
- [147] Q. Zhang and H. Yang, "The Roles of VHL-Dependent Ubiquitination in Signaling and Cancer," *Front Oncol*, vol. 2, pp. 35.
- [148] P. J. Vlachostergios, A. Patrikidou, D. D. Daliani, and C. N. Papandreou, "The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 1: post-translational regulation," *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 3006-18, 2009.
- [149] P. J. Vlachostergios, A. Patrikidou, D. D. Daliani, and C. N. Papandreou, "The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: transcriptional regulation," *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 3019-31, 2009.
- [150] K. Ramadan and M. Meerang, "Degradation-linked ubiquitin signal and proteasome are integral components of DNA double strand break repair: New perspectives for anti-cancer therapy," *FEBS Lett*, vol. 585, pp. 2868-75.

- [151] A. Al-Hakim, C. Escribano-Diaz, M. C. Landry, L. O'Donnell, S. Panier, R. K. Szilard, and D. Durocher, "The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response," *DNA Repair (Amst)*, vol. 9, pp. 1229-40.
- [152] D. Hoeller and I. Dikic, "Targeting the ubiquitin system in cancer therapy," *Nature*, vol. 458, pp. 438-44, 2009.
- [153] S. Frankland-Searby and S. R. Bhaumik, "The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1825, pp. 64-76.
- [154] A. M. Ruschak, M. Slassi, L. E. Kay, and A. D. Schimmer, "Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance," *J Natl Cancer Inst*, vol. 103, pp. 1007-17.
- [155] L. R. Dick and P. E. Fleming, "Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy," *Drug Discov Today*, vol. 15, pp. 243-9.
- [156] T. Mujtaba and Q. P. Dou, "Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib," *Discov Med*, vol. 12, pp. 471-80.
- [157] D. Yin, H. Zhou, T. Kumagai, G. Liu, J. M. Ong, K. L. Black, and H. P. Koeffler, "Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM)," *Oncogene*, vol. 24, pp. 344-54, 2005.
- [158] Z. Tianhu, Z. Shiguang, and L. Xinghan, "Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation," *Mol Biol Rep*, vol. 37, pp. 1211-9.
- [159] T. Unterkircher, S. Cristofanon, S. H. Vellanki, L. Nonnenmacher, G. Karpel-Massler, C. R. Wirtz, K. M. Debatin, and S. Fulda, "Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis," *Clin Cancer Res*, vol. 17, pp. 4019-30.
- [160] D. W. Seol, "p53-Independent up-regulation of a TRAIL receptor DR5 by proteasome inhibitors: a mechanism for proteasome inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 416, pp. 222-5.
- [161] M. Labussiere, S. Pinel, S. Delfortrie, F. Plenat, and P. Chastagner, "Proteasome inhibition by bortezomib does not translate into efficacy on two malignant glioma xenografts," *Oncol Rep*, vol. 20, pp. 1283-7, 2008.
- [162] K. Ng, M. Nitta, L. Hu, S. Kesari, A. Kung, A. D'Andrea, and C. C. Chen, "A small interference RNA screen revealed proteasome inhibition as strategy for glioblastoma therapy," *Clin Neurosurg*, vol. 56, pp. 107-18, 2009.
- [163] S. Phuphanich, J. G. Supko, K. A. Carson, S. A. Grossman, L. Burt Nabors, T. Mikkelsen, G. Lesser, S. Rosenfeld, S. Desideri, and J. J. Olson, "Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma," *J Neurooncol*, vol. 100, pp. 95-103.
- [164] K. A. Carson, S. A. Grossman, J. D. Fisher, and E. G. Shaw, "Prognostic factors for survival in adult patients with recurrent glioma enrolled onto the new approaches to brain tumor therapy CNS consortium phase I and II clinical trials," *J Clin Oncol*, vol. 25, pp. 2601-6, 2007.
- [165] G. J. Kubicek, M. Werner-Wasik, M. Machtay, G. Mallon, T. Myers, M. Ramirez, D. Andrews, W. J. Curran, Jr., and A. P. Dicker, "Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 74, pp. 433-9, 2009.

- [166] S. V. Rajkumar, P. G. Richardson, T. Hideshima, and K. C. Anderson, "Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer," *J Clin Oncol*, vol. 23, pp. 630-9, 2005.
- [167] N. Henninger, K. M. Sicard, J. Bouley, M. Fisher, and N. E. Stagliano, "The proteasome inhibitor VELCADE reduces infarction in rat models of focal cerebral ischemia," *Neurosci Lett*, vol. 398, pp. 300-5, 2006.
- [168] V. M. Runge, "Safety of approved MR contrast media for intravenous injection," *J Magn Reson Imaging*, vol. 12, pp. 205-13, 2000.
- [169] M. J. Williamson, J. L. Blank, F. J. Bruzzese, Y. Cao, J. S. Daniels, L. R. Dick, J. Labutti, A. M. Mazzola, A. D. Patil, C. L. Reimer, M. S. Solomon, M. Stirling, Y. Tian, C. A. Tsu, G. S. Weatherhead, J. X. Zhang, and M. Rolfe, "Comparison of biochemical and biological effects of ML858 (salinosporamide A) and bortezomib," *Mol Cancer Ther*, vol. 5, pp. 3052-61, 2006.
- [170] L. Bedford, D. Hay, A. Devoy, S. Paine, D. G. Powe, R. Seth, T. Gray, I. Topham, K. Fone, N. Rezvani, M. Mee, T. Soane, R. Layfield, P. W. Sheppard, T. Ebendal, D. Usoskin, J. Lowe, and R. J. Mayer, "Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies," *J Neurosci*, vol. 28, pp. 8189-98, 2008.
- [171] T. Gilmore, M. E. Gapuzan, D. Kalaitzidis, and D. Starczynowski, "Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer," *Cancer Lett*, vol. 181, pp. 1-9, 2002.
- [172] E. O'Dea and A. Hoffmann, "The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, pp. a000216.
- [173] T. D. Gilmore, "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives," *Oncogene*, vol. 25, pp. 6680-4, 2006.
- [174] V. F. Shih, R. Tsui, A. Caldwell, and A. Hoffmann, "A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling," *Cell Res*, vol. 21, pp. 86-102.
- [175] G. Xiao, A. B. Rabson, W. Young, G. Qing, and Z. Qu, "Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease," *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 17, pp. 281-93, 2006.
- [176] M. S. Hayden and S. Ghosh, "Signaling to NF-kappaB," *Genes Dev*, vol. 18, pp. 2195-224, 2004.
- [177] D. S. Basseres and A. S. Baldwin, "Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression," *Oncogene*, vol. 25, pp. 6817-30, 2006.
- [178] L. Nogueira, P. Ruiz-Ontanon, A. Vazquez-Barquero, F. Moris, and J. L. Fernandez-Luna, "The NFkappaB pathway: a therapeutic target in glioblastoma," *Oncotarget*, vol. 2, pp. 646-53.
- [179] L. Emdad, D. Sarkar, Z. Z. Su, S. G. Lee, D. C. Kang, J. N. Bruce, D. J. Volsky, and P. B. Fisher, "Astrocyte elevated gene-1: recent insights into a novel gene involved in tumor progression, metastasis and neurodegeneration," *Pharmacol Ther*, vol. 114, pp. 155-70, 2007.
- [180] S. Miyamoto, "Nuclear initiated NF-kappaB signaling: NEMO and ATM take center stage," *Cell Res*, vol. 21, pp. 116-30.

- [181] K. D. Weaver, S. Yeyeodu, J. C. Cusack, Jr., A. S. Baldwin, Jr., and M. G. Ewend, "Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas," *J Neurooncol*, vol. 61, pp. 187-96, 2003.
- [182] M. Bredel, C. Bredel, D. Juric, G. E. Duran, R. X. Yu, G. R. Harsh, H. Vogel, L. D. Recht, A. C. Scheck, and B. I. Sikic, "Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3 as a putative regulator of nuclear factor-kappaB-mediated resistance to O6-alkylating agents in human glioblastomas," *J Clin Oncol*, vol. 24, pp. 274-87, 2006.
- [183] M. Hermisson, A. Klumpp, W. Wick, J. Wischhusen, G. Nagel, W. Roos, B. Kaina, and M. Weller, "O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells," *J Neurochem*, vol. 96, pp. 766-76, 2006.
- [184] Y. Hirose, E. L. Kreklau, L. C. Erickson, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "Delayed repletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase resulting in failure to protect the human glioblastoma cell line SF767 from temozolomide-induced cytotoxicity," *J Neurosurg*, vol. 98, pp. 591-8, 2003.
- [185] M. S. Bobola, J. R. Silber, R. G. Ellenbogen, J. R. Geyer, A. Blank, and R. D. Goff, "O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines," *Clin Cancer Res*, vol. 11, pp. 2747-55, 2005.
- [186] L. C. Harris, J. S. Remack, P. J. Houghton, and T. P. Brent, "Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 2029-32, 1996.
- [187] X. Wang, J. X. Chen, Y. H. Liu, C. You, and Q. Mao, "Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase," *Neurol Sci*.
- [188] A. Sato, J. Sunayama, K. Matsuda, S. Seino, K. Suzuki, E. Watanabe, K. Tachibana, A. Tomiyama, T. Kayama, and C. Kitanaka, "MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis," *Stem Cells*, vol. 29, pp. 1942-51.
- [189] J. L. Fischel, P. Formento, and G. Milano, "Epidermal growth factor receptor double targeting by a tyrosine kinase inhibitor (Iressa) and a monoclonal antibody (Cetuximab). Impact on cell growth and molecular factors," *Br J Cancer*, vol. 92, pp. 1063-8, 2005.
- [190] I. A. Voutsadakis, A. Patrikidou, K. Tsapakidis, A. Karagiannaki, E. Hatzidaki, N. E. Stathakis, and C. N. Papandreou, "Additive inhibition of colorectal cancer cell lines by aspirin and bortezomib," *Int J Colorectal Dis*, vol. 25, pp. 795-804.
- [191] B. Raychaudhuri, Y. Han, T. Lu, and M. A. Vogelbaum, "Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype," *J Neurooncol*, vol. 85, pp. 39-47, 2007.
- [192] K. Zhu, W. Chan, J. Heymach, M. Wilkinson, and D. J. McConkey, "Control of HIF-1alpha expression by eIF2 alpha phosphorylation-mediated translational repression," *Cancer Res*, vol. 69, pp. 1836-43, 2009.
- [193] A. Yerlikaya and H. DoKudur, "Investigation of the eIF2alpha phosphorylation mechanism in response to proteasome inhibition in melanoma and breast cancer cells," *Mol Biol (Mosk)*, vol. 44, pp. 859-66.

- [194] Y. Hirose, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 1957-63, 2001.
- [195] A. M. Roccaro, A. Vacca, and D. Ribatti, "Bortezomib in the treatment of cancer," *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, vol. 1, pp. 397-403, 2006.
- [196] B. Yamini, X. Yu, M. E. Dolan, M. H. Wu, T. E. Darga, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum, "Inhibition of nuclear factor-kappaB activity by temozolomide involves O6-methylguanine induced inhibition of p53 DNA binding," *Cancer Res*, vol. 67, pp. 6889-98, 2007.
- [197] M. Belanich, T. Randall, M. A. Pastor, J. T. Kibitel, L. G. Alas, M. E. Dolan, S. C. Schold, Jr., M. Gander, F. J. Lejeune, B. F. Li, A. B. White, P. Wasserman, M. L. Citron, and D. B. Yarosh, "Intracellular Localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair protein O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 37, pp. 547-55, 1996.
- [198] D. Bocangel, S. Sengupta, S. Mitra, and K. K. Bhakat, "p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor," *Anticancer Res*, vol. 29, pp. 3741-50, 2009.
- [199] N. Pore, Z. Jiang, H. K. Shu, E. Bernhard, G. D. Kao, and A. Maity, "Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway," *Mol Cancer Res*, vol. 4, pp. 471-9, 2006.
- [200] I. Mylonis, G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou, and G. Simos, "Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 33095-106, 2006.
- [201] C. D. Befani, P. J. Vlachostergios, E. Hatzidaki, A. Patrikidou, S. Bonanou, G. Simos, C. N. Papandreou, and P. Liakos, "Bortezomib represses HIF-1alpha protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells," *J Mol Med (Berl)*, vol. 90, pp. 45-54.
- [202] S. Li, T. Jiang, G. Li, and Z. Wang, "Impact of p53 status to response of temozolomide in low MGMT expression glioblastomas: preliminary results," *Neurol Res*, vol. 30, pp. 567-70, 2008.
- [203] J. Wang, Q. Zhao, Q. Qi, H. Y. Gu, J. J. Rong, R. Mu, M. J. Zou, L. Tao, Q. D. You, and Q. L. Guo, "Gambogic acid-induced degradation of mutant p53 is mediated by proteasome and related to CHIP," *J Cell Biochem*, vol. 112, pp. 509-19.
- [204] L. Weisz, A. Damalas, M. Lontos, P. Karakaidos, G. Fontemaggi, R. Maor-Aloni, M. Kalis, M. Levrero, S. Strano, V. G. Gorgoulis, V. Rotter, G. Blandino, and M. Oren, "Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells," *Cancer Res*, vol. 67, pp. 2396-401, 2007.
- [205] G. Schneider, A. Henrich, G. Greiner, V. Wolf, A. Lovas, M. Wiczorek, T. Wagner, S. Reichardt, A. von Werder, R. M. Schmid, F. Weih, T. Heinzl, D. Saur, and O. H. Kramer, "Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53," *Oncogene*, vol. 29, pp. 2795-806.
- [206] K. K. Bhakat and S. Mitra, "Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-

- binding protein-binding protein and p300," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 34197-204, 2000.
- [207] T. Biswas, C. V. Ramana, G. Srinivasan, I. Boldogh, T. K. Hazra, Z. Chen, K. Tano, E. B. Thompson, and S. Mitra, "Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone," *Oncogene*, vol. 18, pp. 525-32, 1999.
- [208] I. Boldogh, C. V. Ramana, Z. Chen, T. Biswas, T. K. Hazra, S. Grosch, T. Grombacher, S. Mitra, and B. Kaina, "Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling," *Cancer Res*, vol. 58, pp. 3950-6, 1998.
- [209] R. O. Pieper, "Understanding and manipulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression," *Pharmacol Ther*, vol. 74, pp. 285-97, 1997.
- [210] M. Weller, R. Stupp, M. E. Hegi, M. van den Bent, J. C. Tonn, M. Sanson, W. Wick, and G. Reifenberger, "Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice," *Neuro Oncol*, vol. 14 Suppl 4, pp. iv100-8.
- [211] M. Abou-Ghazal, D. S. Yang, W. Qiao, C. Reina-Ortiz, J. Wei, L. Y. Kong, G. N. Fuller, N. Hiraoka, W. Priebe, R. Sawaya, and A. B. Heimberger, "The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas," *Clin Cancer Res*, vol. 14, pp. 8228-35, 2008.
- [212] A. A. Saetta, G. Levidou, E. A. El-Habr, I. Panayotidis, V. Samaras, I. Thymara, S. Sakellariou, E. Boviatsis, E. Patsouris, and P. Korkolopoulou, "Expression of pERK and pAKT in human astrocytomas: correlation with IDH1-R132H presence, vascular endothelial growth factor, microvascular characteristics and clinical outcome," *Virchows Arch*, vol. 458, pp. 749-59.
- [213] Y. Wang, L. Chen, Z. Bao, S. Li, G. You, W. Yan, Z. Shi, Y. Liu, P. Yang, W. Zhang, L. Han, C. Kang, and T. Jiang, "Inhibition of STAT3 reverses alkylator resistance through modulation of the AKT and beta-catenin signaling pathways," *Oncol Rep*, vol. 26, pp. 1173-80.
- [214] R. Mashiko, S. Takano, E. Ishikawa, T. Yamamoto, K. Nakai, and A. Matsumura, "Hypoxia-inducible factor 1alpha expression is a prognostic biomarker in patients with astrocytic tumors associated with necrosis on MR image," *J Neurooncol*, vol. 102, pp. 43-50.
- [215] P. Korkolopoulou, E. Patsouris, A. E. Konstantinidou, P. M. Pavlopoulos, N. Kavantzias, E. Boviatsis, I. Thymara, M. Perdiki, E. Thomas-Tsagli, D. Angelidakis, D. Rologis, and D. Sakkas, "Hypoxia-inducible factor 1alpha/vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis," *Neuropathol Appl Neurobiol*, vol. 30, pp. 267-78, 2004.
- [216] T. Hideshima, D. Chauhan, T. Hayashi, M. Akiyama, N. Mitsiades, C. Mitsiades, K. Podar, N. C. Munshi, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, "Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma," *Oncogene*, vol. 22, pp. 8386-93, 2003.
- [217] A. Dey, E. Wong, N. Kua, H. L. Teo, V. Tergaonkar, and D. Lane, "Hexamethylene bisacetamide (HMBA) simultaneously targets AKT and MAPK pathway and represses NF kappaB activity: implications for cancer therapy," *Cell Cycle*, vol. 7, pp. 3759-67, 2008.

- [218] H. C. Yu, D. R. Hou, C. Y. Liu, C. S. Lin, C. W. Shiau, A. L. Cheng, and K. F. Chen, "Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A mediates bortezomib-induced autophagy in hepatocellular carcinoma independent of proteasome," *PLoS One*, vol. 8, pp. e55705.
- [219] M. Brell, J. Ibanez, and A. Tortosa, "O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction," *BMC Cancer*, vol. 11, pp. 35.
- [220] Y. Sonoda, M. Yokosawa, R. Saito, M. Kanamori, Y. Yamashita, T. Kumabe, M. Watanabe, and T. Tominaga, "O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma," *Int J Clin Oncol*, vol. 15, pp. 352-8.
- [221] D. Capper, M. Mittelbronn, R. Meyermann, and J. Schittenhelm, "Pitfalls in the assessment of MGMT expression and in its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of a feasible immunohistochemical approach," *Acta Neuropathol*, vol. 115, pp. 249-59, 2008.

Bortezomib Downregulates MGMT Expression in T98G Glioblastoma Cells

**Panagiotis J. Vlachostergios, Eleana
Hatzidaki, Nikolaos E. Stathakis, George
K. Koukoulis & Christos N. Papandreou**

Cellular and Molecular Neurobiology

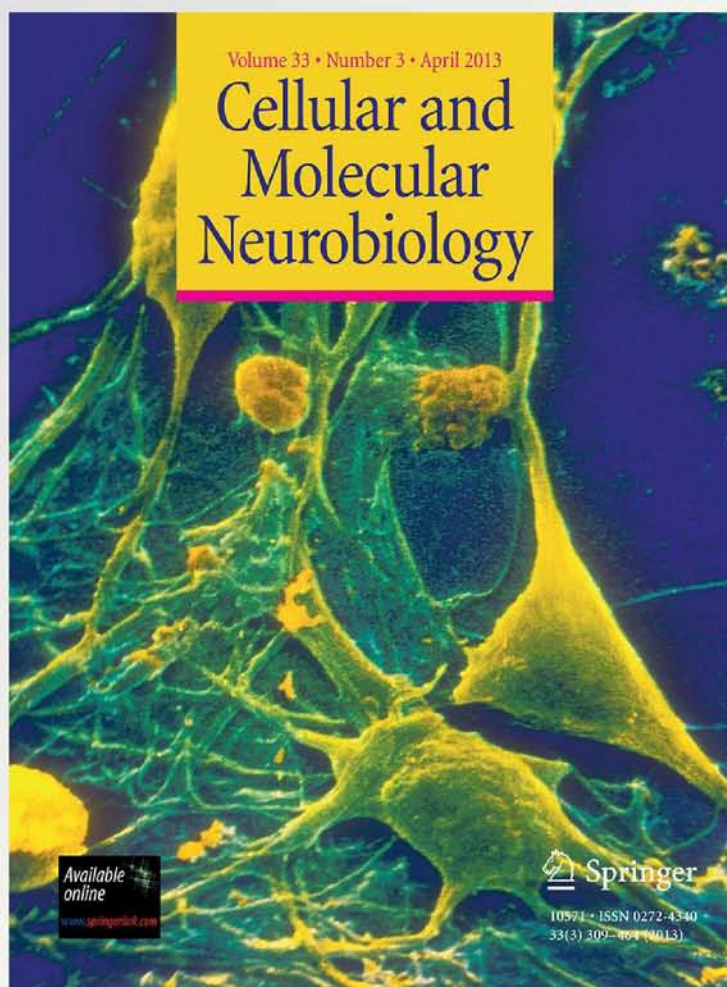
ISSN 0272-4340

Volume 33

Number 3

Cell Mol Neurobiol (2013) 33:313-318

DOI 10.1007/s10571-013-9910-2



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Bortezomib Downregulates MGMT Expression in T98G Glioblastoma Cells

Panagiotis J. Vlachostergios · Eleana Hatzidaki · Nikolaos E. Stathakis · George K. Koukoulis · Christos N. Papandreou

Received: 4 November 2012 / Accepted: 9 January 2013 / Published online: 20 January 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The efficacy of treatment for glioblastoma multiforme is currently limited by the development of resistance, particularly, but not exclusively, due to the expression of the DNA repair enzyme O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) in a significant proportion of astrocytic tumors. MGMT is post-translationally regulated by the 26S proteasome, a multi-subunit organelle responsible for degradation of misfolded cellular proteins. The boronic acid dipeptide bortezomib is the first and only proteasome inhibitor in clinical use so far, and has been reported as a strategy to restrict growth and promote apoptosis of glioblastoma cells. In this study we investigated the effect of bortezomib on MGMT expression in T98G cells, looking for an effect on the nuclear factor kappa B (NFκB) pathway, which is a major player in MGMT regulation and is also under tight control by the ubiquitin–proteasome system. Administration of bortezomib led to a significant reduction of T98G cell viability and induction of DNA fragmentation. These effects coincided with reduced expression of MGMT transcript levels, and a decrease in cellular amount and IκBα-mediated, proteasomal activity-dependent nuclear translocation of NFκB. In addition, bortezomib-induced phosphorylation of the translation initiation factor 2alpha (eIF2α) was in parallel

with translational repression of MGMT. Taken together, these results suggest a novel role for bortezomib as a potent MGMT inhibitor and support its ongoing testing as a chemosensitizer in glioblastoma.

Keywords MGMT · Bortezomib · NFκB · eIF2α · Glioblastoma · T98G

Introduction

Glioblastoma multiform represents the most common malignant primary brain tumor, with aggressive biological behavior and adverse prognosis (Preusser et al. 2011). Progress in understanding of the molecular pathogenesis of the disease and mechanisms of resistance to DNA alkylation damage induced by treatment with temozolomide has revealed a central role for the DNA repair protein O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) (Christmann et al. 2011). The mechanism of action of MGMT involves the removal of alkyl groups from DNA by transferring them to an internal Cys-145 residue. As the S-alkylcysteine is not converted back to cysteine, the protein can only act once (suicide enzyme) and the resulting alkylated MGMT molecule is rapidly recognized by a ubiquitin ligase targeting the protein for proteolysis (Xu-Welliver and Pegg 2002).

In addition to MGMT, the ubiquitin–proteasome system is responsible for degradation of a plethora of cellular proteins involved in regulation of divergent processes such as proliferation, cell cycle, and apoptosis (Adams 2003). A key transcription factor whose nuclear translocation is orchestrated by the proteasome is nuclear factor kappa B (NFκB) (Lin et al. 2010). Notably, NFκB is also involved in transcriptional regulation of MGMT through direct interaction with two putative NFκB binding sites within the MGMT

P. J. Vlachostergios (✉) · E. Hatzidaki · N. E. Stathakis · C. N. Papandreou
Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece
e-mail: pvlacho@med.uth.gr

G. K. Koukoulis
Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Thessaly School of Health Sciences, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

promoter region (Lavon et al. 2007). Bortezomib is currently the only proteasome inhibitor in clinical use, and it has been shown to cause cell growth arrest and apoptosis in glioblastoma through various mechanisms, including upregulation of cell cycle arrest and proapoptotic proteins (cyclin B1, p21, p27, Bmf, TRAIL DR5), enhancement of TRAIL-mediated apoptosis, downregulation of cell cycle progression and antiapoptotic proteins (CDK2, CDK4, E2F4, Bcl-2, Bcl-x1), and activated JNK signaling (Yin et al. 2005; Tianhu et al. 2010; Unterkircher et al. 2011; Seol 2011). In detail, bortezomib was found to cause accumulation of cyclin B1, p21 and p27 proteins which was associated with G2/M arrest. In addition, bortezomib induces attenuation of CDK2, CDK4, and E2F4 protein levels consistent with cells exiting the cell cycle. Furthermore, both mRNA and protein levels of Bcl-2 and Bcl-x1 are significantly reduced after treatment with bortezomib, while the latter also markedly stimulates phosphorylation of JNK and c-Jun, which was partially reversed by a JNK inhibitor blocking bortezomib-induced cell death (Yin et al. 2005). A role of the JNK-Bmf pathway in mediating the apoptotic effects of bortezomib was suggested, based on evidence of Bmf protein and transcript levels upregulation by bortezomib which was blunted after inhibition of JNK phosphorylation (Tianhu et al. 2010). Also, bortezomib displays a synergistic apoptotic action when combined with TRAIL, which emanates from bortezomib-mediated tBid accumulation linking the extrinsic to the intrinsic apoptosis pathway and leading to enhanced Bax activation and mitochondria-driven cell death in glioma cells. At the TRAIL DISC, bortezomib concomitantly increases TRAIL receptor R2 (DR5) surface expression and cFLIPs, resulting in a slight increase in caspase-8 recruitment to the DISC (Unterkircher et al. 2011). Bortezomib increases DR5 protein levels in a p53-independent manner in glioma cells (Seol 2011). In this study, we sought to determine whether bortezomib at a dose capable of reducing cell viability and inducing apoptosis in T98G cells might have a specific effect on MGMT. Our results indicate that both protein and transcript levels of MGMT were attenuated after treatment and these effects coincided with a reduced total and nuclear amount of NF κ B and with phosphorylation of the translation initiation factor 2 α (eIF2 α), thus revealing a role for bortezomib as an inhibitor of direct DNA repair both at the transcriptional and translational level in T98G glioblastoma cells.

Materials and Methods

Cell Culture and Reagents

The human glioblastoma cell line T98G was purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures

(ECACC, UK) and all experiments were performed within 6 months from purchase. The cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, UK) supplemented with 10 % heat-inactivated FBS (GIBCO, UK), 5 % L-glutamine (GIBCO, UK), and 1 % penicillin–streptomycin (Euroclone, UK) at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Proteasome inhibitor (Bortezomib, VELCADE) was purchased from Janssen-Cilag Pharmaceuticals, Greece.

MTT Assay

Cells were plated in 96-well plates at a density of 2×10^5 . Cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C and were then either left untreated for another 24 h or were treated with bortezomib for 24 h at ten-fold serial dilution concentrations between 10^{-9} and 10^{-6} M. After incubations, 10 μ L of MTT reagent (R&D Systems, UK) were added in each well, and plates were further incubated for 4 h at 37 °C. Then, 100 μ L of MTT detection reagent (R&D Systems, UK) was added in each well, and plates were left at room temperature overnight, protected from light. Samples were analyzed at a wavelength of 570 nm with a reference at 650 nm in a 1420 Victor device (Wallac Victor, Finland). Experimental wells were carried out in triplicate ($p < 0.01$).

DNA Fragmentation

DNA fragmentation was determined using the cellular DNA fragmentation ELISA kit (Roche Diagnostics, Germany). After exposure to bromodeoxyuridine (BrdU) for 18 h, cells were reseeded onto a microplate (10^5 cells/well) and were then either left untreated for 24 h or were treated for 24 h with 0.1 μ M bortezomib. Supernatant was removed and the remaining cells were lysed with the kit buffer. Cell lysate was transferred into an anti-DNA pre-coated microtiter plate and analyzed using the ELISA procedure. After 1 h of incubation, exonuclease treatment was carried out during 30 min. DNA fragmentation was measured spectrophotometrically (at 450 and 690 nm as the reference wavelengths) after the anti-BrdU-peroxidase conjugate and the substrate solutions had been added. BrdU-labeled fragments measured in cell lysate denoted apoptotic fragmentation. The results presented are the average value of three independent experiments ($p < 0.01$).

Western Blot Analysis

Fractionation of cells, analysis of nuclear and cytoplasmic fractions, or total cellular proteins, electrophoresis and immunoblotting were carried out as previously described (Patrikidou et al. 2011). Primary antibodies against the p65

subunit of NF κ B and I κ B α (Santa Cruz Biotechnology, USA), phospho-eIF2 α (Ser51) and total eIF2 α (Cell Signaling Technology, USA), Histone 2B (Abcam, UK), and actin (Sigma Aldrich, UK) were used. Treatment conditions were as described above. Densitometric analysis of the bands in blots was carried out with the public domain software for image analysis “ImageJ” (National Institute of Health, USA). All experiments were carried out in triplicate ($p < 0.01$) and representative results are shown.

20S Proteasome Activity Assay

Total protein cell lysates were prepared using a 0.5 % CHAPS buffer which did not affect proteasomal enzymatic activity. Chymotryptic activity of the 20S proteasome was measured in total cell lysates as previously described (Patrikidou et al. 2011). Treatment conditions were as described above. All measurements were performed in triplicate ($p < 0.01$).

RT-PCR

Total RNA was isolated using a commercial RNA isolation kit (Bio-Rad, USA). Using 1 mg total RNA, single-stranded DNA (cDNA) was synthesized by the use of a cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). The primers used were, for MGMT forward, AGAGTCGTTACCCAGACAGG and MGMT reverse, GCCATTCCTTACGGCCAG and for GAPDH forward, GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA and GAPDH reverse, GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC, respectively. Conditions for MGMT were 35 cycles, Tanneal 55 °C and for GAPDH were 35 cycles,

Tanneal 58 °C. PCR products were subjected to electrophoretic analysis on 2 % agarose gels containing ethidium bromide (Sigma Aldrich, UK), and were visualized and photographed under UV light. Treatment conditions were as described above. All experiments were carried out in triplicate ($p < 0.01$) and representative results are shown.

Statistical Analysis

The Graph Pad InStat Statistical package for Windows (GraphPad Software, USA) was used. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The one-way analysis of variance with the Bonferroni post-test was used for the comparison of data, and the statistical significance limit was set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Proteasome inhibition by bortezomib has been previously shown to be active in MGMT-expressing glioblastoma cells (Yin et al. 2005; Tianhu et al. 2010; Unterkircher et al. 2011). In addition, some evidence of clinical activity was noted in phase I studies in patients with malignant gliomas (Kubicek et al. 2009; Phuphanich et al. 2010). The aim of this study was to investigate for a specific effect of the drug on MGMT expression in T98G cells, given that MGMT is the one of the major causes of glioblastoma resistance to treatment (Haar et al. 2012).

First, we performed an MTT assay and observed that bortezomib is capable of reducing cell viability as early as 24 h with the 50 % inhibiting concentration (IC₅₀) of the

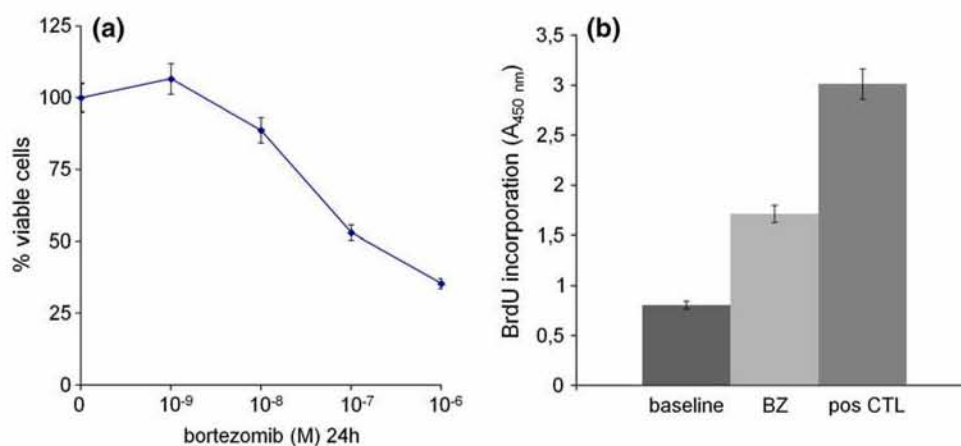
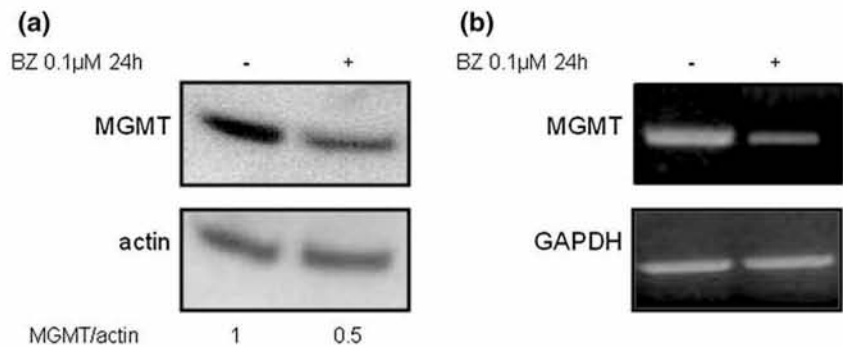


Fig. 1 Effect of bortezomib on cell viability and apoptosis of T98G cells. **a** MTT assay of T98G cells treated with dose-series incubations with bortezomib (BZ) for 24 h. Results are expressed as mean percentage of cell counts in control wells. Each point represents a mean \pm SD of three independent experiments carried out in triplicate ($p < 0.01$).

b DNA fragmentation by ELISA assay, as measured by absorbance (OD 450 values) at 24 h. Lanes from left to right: baseline untreated cells (incubated for 24 h with culture medium), bortezomib 0.1 μ M for 24 h, positive apoptosis control. Each point represents a mean \pm SD of three independent experiments carried out in triplicate ($p < 0.01$)

Fig. 2 Effect of bortezomib on MGMT expression. **a** Western blot analysis of MGMT protein levels at baseline, in untreated cells (incubated for 24 h with culture medium) (*left lane*) and after treatment with bortezomib (BZ) 0.1 μ M for 24 h (*right lane*). **b** RT-PCR of MGMT mRNA levels at baseline (*left lane*) and after treatment with BZ 0.1 μ M for 24 h (*right lane*)



drug at 24 h being approximately 0.1 μ M (Fig. 1a). At this dose and time of administration, bortezomib was also found to induce DNA fragmentation and subsequent apoptosis in BrdU-based DNA fragmentation ELISA (Fig. 1b). We then investigated whether these effects might be, at least partially, related with abrogation of MGMT. Indeed, both protein (Fig. 2a) and transcript (Fig. 2b) levels of MGMT were found to be markedly reduced compared to untreated cells (Fig. 2). This was quite an unexpected and previously unreported finding, given that bortezomib, as a proteasome inhibitor, would be supposed to stabilize protein levels of proteasome substrates, including MGMT.

We hypothesized that this dual inhibition of MGMT mRNA and protein levels might involve an effect on transcription factors responsible for induction of MGMT gene with or without a secondary effect on the translational machinery. With regard to the former, our attention was drawn toward studying NF κ B which not only is a key transcriptional inducer of MGMT gene expression (Lavan et al. 2007) but also has an established relationship with the ubiquitin–proteasome system and is constitutively activated in glioblastoma, promoting cancer cell migration, invasion and resistance to chemotherapy (Raychaudhuri et al. 2007). We show that bortezomib attenuates NF κ B

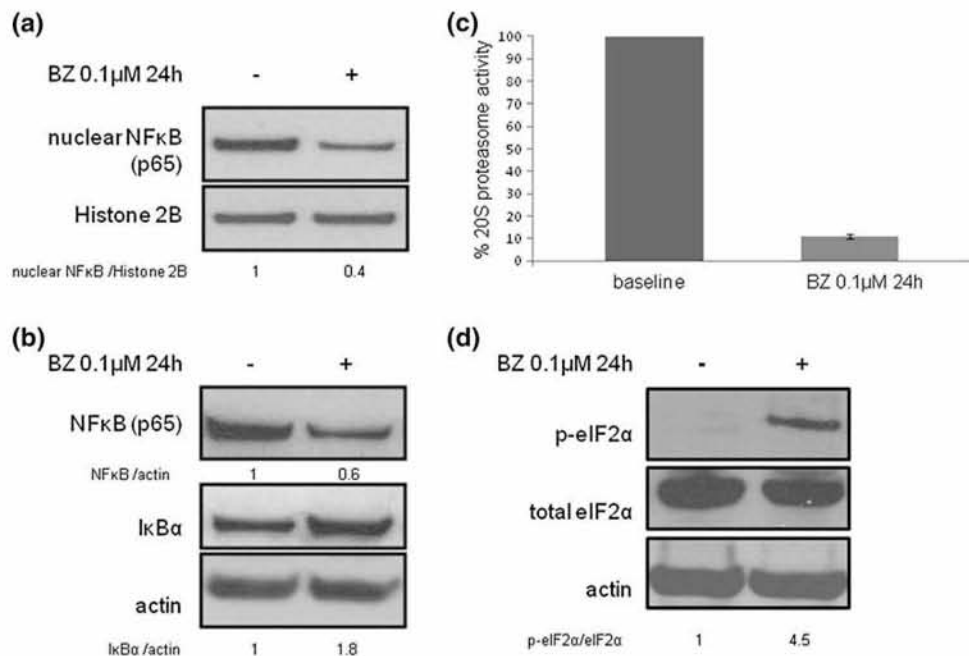


Fig. 3 Effect of bortezomib on the canonical NF κ B pathway and eIF2 α levels. **a** Western blot analysis of nuclear NF κ B levels at baseline, in untreated cells (incubated for 24 h with culture medium) (*left lane*) and after treatment with bortezomib (BZ) 0.1 μ M for 24 h (*right lane*). **b** Western blot analysis of total I κ B α levels at baseline (*left lane*) and after treatment with bortezomib (BZ) 0.1 μ M for 24 h (*right lane*). **c** Percentage of 20S proteasomal activity (calculated in RFU/mg) after treatment with bortezomib (BZ) 0.1 μ M for 24 h (*right lane*) compared to baseline level (*left lane*). Each point

represents a mean \pm SD of three independent experiments carried out in triplicate ($p < 0.01$). **d** Western blot analysis of phosphorylated and total eIF2 α levels at baseline (*left lane*) and after treatment with bortezomib (BZ) 0.1 μ M for 24 h (*right lane*). The numbers located below each lane correspond to the quantification of the phosphorylated eIF2 α signals by densitometry adjusted to the total eIF2 α protein levels. The phosphorylation of eIF2 α in the untreated group was arbitrarily set at the value of 1

nuclear accumulation (Fig. 3a) through increasing cellular I κ B α protein levels (Fig. 3b) after inducing almost complete inhibition of 20S proteasome activity (Fig. 3c) in T98G cells. In addition, we have further observed a downregulation of total NF κ B protein levels in response to bortezomib treatment (Fig. 3b). With regard to the decrease in MGMT protein levels, this might be another example of the pleiotropic effects of proteasome inhibition in cells. As such, proteasome inhibitors, including bortezomib, have been shown to cause a rapid decrease in the total protein synthesis rate due to phosphorylation of the alfa subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) in several cancer cell types (Zhu et al. 2009; Yerlikaya and DoKudur 2010). We replicated and extended these findings in T98G cells, demonstrating a significant 4.5 fold-increase in the ratio of phosphorylated to total eIF2 α levels after bortezomib treatment, compared to untreated cells (Fig. 3d).

To date, several other transcription factors and coactivators have been suggested to be involved in transcriptional regulation of MGMT, including p53, AP-1, Sp1, HIF1 α , glucocorticoids, cAMP response element-binding protein, p 300 and MGMT enhancer binding protein (Bhakat and Mitra 2000; Biswas et al. 1999; Bocangel et al. 2009; Boldogh et al. 1998; Chen et al. 1997; Harris et al. 1996; Persano et al. 2012; Pieper 1997; Sato et al. 2011). In addition, post-transcriptional regulation of MGMT has also been reported through STAT3 signaling (Kohsaka et al. 2012) as well as through mRNA processing by microRNAs (miR), in particular miR-181d (Zhang et al. 2012). Their potential contribution in determining the final response of T98G cells to bortezomib treatment in terms of MGMT regulation is underscored here. Another limitation of our study is the use of only one cell line, which was however chosen on the basis of its high level of MGMT expression at baseline, compared to other human-derived glioblastoma cell lines (Hermisson et al. 2006). Finally, our data show an association between the decrease in the amount of nuclear and total NF κ B and the decrease in the MGMT mRNA expression. Similarly, phosphorylation of eIF2 α was also associated with reduced protein synthesis of MGMT. However, further work may be needed to fundamentally demonstrate the direct role of these phenomena in the decreased expression of MGMT.

In conclusion, our data suggest that bortezomib is an inhibitor of direct DNA repair, exerting a dual effect on MGMT, via attenuation of NF κ B-inducible MGMT transcription and through eIF2 α phosphorylation-dependent MGMT translational repression, respectively. This novel mechanism of bortezomib action regarding MGMT remains to be further elucidated and verified in studies with combination treatments including temozolomide or/and

radiotherapy or/and antiangiogenic therapy, with the aim of reducing chemoresistance of glioblastoma and achieving better responses and outcomes for such patients.

References

- Adams J (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29(Suppl 1):3–9
- Bhakat KK, Mitra S (2000) Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300. *J Biol Chem* 275:34197–34204
- Biswas T, Ramana CV, Srinivasan G, Boldogh I, Hazra TK, Chen Z, Tano K, Thompson EB, Mitra S (1999) Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* 18:525–532
- Bocangel D, Sengupta S, Mitra S, Bhakat KK (2009) p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res* 29:3741–3750
- Boldogh I, Ramana CV, Chen Z, Biswas T, Hazra TK, Grösch S, Grombacher T, Mitra S, Kaina B (1998) Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res* 58:3950–3956
- Chen FY, Harris LC, Remack JS, Brent TP (1997) Cytoplasmic sequestration of an O6-methylguanine-DNA methyltransferase enhancer binding protein in DNA repair-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4348–4353
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B (2011) O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 1816:179–190
- Haar CP, Hebbar P, Wallace GC 4th, Das A, Vandergrift WA 3rd, Smith JA, Giglio P, Patel SJ, Ray SK, Banik NL (2012) Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem Res* 37:1192–1200
- Harris LC, Remack JS, Houghton PJ, Brent TP (1996) Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 56:2029–2032
- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* 96:766–776
- Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S (2012) STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by down-regulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther* 11:1289–1299
- Kubicek GJ, Werner-Wasik M, Machtay M, Mallon G, Myers T, Ramirez M, Andrews D, Curran WJ Jr, Dicker AP (2009) Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74:433–439
- Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, Efroni G, Zelikovitch B, Fellig Y, Siegal T (2007) Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res* 67:8952–8959
- Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S (2010) The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 14:45–55

- Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri RM, Destouni C, Apostolou E, Daliani D, Papandreou CN (2011) Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NF κ B/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 11:13
- Persano L, Pistollato F, Rampazzo E, Della Puppa A, Abbadi S, Frasson C, Volpin F, Indraccolo S, Scienza R, Basso G (2012) BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1 α stability and MGMT expression. *Cell Death Dis* 3:e412. doi:10.1038/cddis.2012.153
- Phuphanich S, Supko JG, Carson KA, Grossman SA, Burt Nabors L, Mikkelsen T, Lesser G, Rosenfeld S, Desideri S, Olson JJ (2010) Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 100:95–103
- Pieper RO (1997) Understanding and manipulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression. *Pharmacol Ther* 74: 285–297
- Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R (2011) Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol* 70:9–21
- Raychaudhuri B, Han Y, Lu T (2007) Vogelbaum MA (2007) Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J Neurooncol* 85:39–47
- Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C (2011) MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 29:1942–1951
- Seol DW (2011) p53-Independent up-regulation of a TRAIL receptor DR5 by proteasome inhibitors: a mechanism for proteasome inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 416:222–225
- Tianhu Z, Shiguang Z, Xinghan L (2010) Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation. *Mol Biol Rep* 37:1211–1219
- Unterkircher T, Cristofanon S, Vellanki SH, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G, Wirtz CR, Debatin KM, Fulda S (2011) Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. *Clin Cancer Res* 17:4019–4030
- Xu-Welliver M, Pegg AE (2002) Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23:823–830
- Yerlikaya A, DoKudur H (2010) Investigation of the eIF2 α phosphorylation mechanism in response to proteasome inhibition in melanoma and breast cancer cells. *Mol Biol (Mosk)* 44:859–866
- Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, Koeffler HP (2005) Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 24:344–354
- Zhang W, Zhang J, Hoadley K, Kushwaha D, Ramakrishnan V, Li S, Kang C, You Y, Jiang C, Song SW, Jiang T, Chen CC (2012) miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol* 14:712–719
- Zhu K, Chan W, Heymach J, Wilkinson M (2009) McConkey DJ (2009) Control of HIF-1 α expression by eIF2 α phosphorylation-mediated translational repression. *Cancer Res* 69: 1836–1843

MGMT repletion after treatment of glioblastoma cells with temozolomide and O6-benzylguanine implicates NF κ B and mutant p53

Panagiotis J. Vlachostergios, Eleana Hatzidaki, Christos N. Papandreou

Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, Larissa, Greece

The DNA repair enzyme O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) is a major determinant of glioma resistance to alkylating agents. Several strategies have been used to induce sensitization to alkylator-based treatments, including the direct MGMT inhibitor O6-benzylguanine (BG). However, replenishment of MGMT is often observed after the withdrawal of combined schedules of temozolomide (TMZ) and BG, thus preventing further treatment efficacy. In this study we investigated the potential mechanisms of resistance to combination treatment with TMZ and BG in the MGMT-proficient, p53-mutated (mt p53) T98G glioblastoma (GBM) cells, looking for an effect on nuclear factor kappa B (NF κ B) and mt p53, which are both transcriptional regulators of MGMT. The administration of TMZ alone led to minimal inhibition of T98G cell viability which was, however, enhanced with the addition of BG. This effect coincided with reduced expression of MGMT protein and transcript levels, and a decrease in cellular amount of NF κ B and mutant p53. However, withdrawal of the drugs led to an increase in cell viability, which was in parallel with repletion of MGMT protein and transcript levels and was also accompanied by elevated protein levels of NF κ B and mt p53. Overall, these results suggest that NF κ B and mt p53 induction may be responsible for the failure of BG to induce prolonged inhibition of direct repair in TMZ co-treated GBM cells with mt p53 status.

Keywords: MGMT, Temozolomide, O6-benzylguanine, NF κ B, Mutant p53, Glioblastoma, T98G

Introduction

Numerous efforts to improve the poor outcome of patients with malignant glial tumors, which partially emanates from increased repair of alkylator-induced DNA damage by O6-methylguanine methyltransferase (MGMT), have centered upon the development and testing of direct MGMT inhibitors. O6-benzylguanine (BG) represents the most commonly tested agent combined with temozolomide (TMZ) in several *in vitro* and *in vivo* studies as well as in previous and ongoing clinical trials.¹⁻³ However, the increased myelotoxicity induced by the drug² combined with a recovery of MGMT levels and activity within 24 hours after removal of BG have so far hampered its clinical use.^{4,5}

Nuclear factor kappa B (NF κ B) is a key transcription factor associated with glioma chemoresistance, at least partially through the transcriptional upregulation

of MGMT.⁶ In contrast with wild type p53, which is an established repressor of MGMT gene expression,⁷ the gain of the function of mt p53 was recently shown to increase MGMT transcription and subsequent resistance to TMZ in glioblastoma (GBM) cells.⁸ In this study, we sought to elucidate whether the same mechanisms are implicated in the short duration of the sensitizing effect of BG addition to TMZ treatment in p53 mt GBM cells. Indeed, our results indicate that the combined schedule reduces protein and transcript levels of MGMT to a greater extent compared to TMZ alone and this might at least partially be explained by the attenuation of both NF κ B and mt p53 levels. However, this effect is rapidly eliminated after treatment discontinuation, resulting in the replenishment of MGMT expression through a reinstatement of NF κ B and mt p53 levels.

Methods

Cell culture and reagents

The human GBM cell line T98G was purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) and all experiments were performed

Correspondence to: Panagiotis J. Vlachostergios, Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Biopolis 41110, Greece. Email: pvlacho@med.uth.gr; vlachostergios.panos@yahoo.gr

1

within 6 months from purchase. The cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, UK) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (GIBCO, UK), 5% L-glutamine (GIBCO, UK), and 1% penicillin–streptomycin (Euroclone, UK) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

MTT assay

Cells were plated in 96-well plates at a density of 2×10^5 . Cells were allowed to attach for 24 hours at 37°C and were then either left untreated for another 16 hours, or were treated with 100 μ M TMZ in the presence or absence of 100 μ M BG administered 1 hour before TMZ. After incubations, treated and untreated cells were either processed immediately or after culture in fresh medium for another 24 hours. Finally, 10 ml of MTT reagent (R&D Systems, UK) was added in each well, and plates were further incubated for 4 hours at 37°C. Then, 100 ml of MTT detection reagent (R&D Systems, UK) was added to each well, and plates were left at room temperature overnight, protected from light. Samples were analyzed at a wavelength of 570 nm with a reference at 650 nm in a 1420 Victor device (Wallac Victor, Finland). Experimental wells were carried out in triplicate ($P < 0.01$).

Western blot analysis

Fractionation of cells, analysis of total cellular proteins, electrophoresis, and immunoblotting were carried out as previously described.⁹ Primary antibodies against the p65 subunits of NF κ B, p53 (Santa Cruz Biotechnology, USA), and actin (Sigma Aldrich, UK) were used. Treatment conditions were as described above. All experiments were carried out in triplicate ($P < 0.01$) and representative results are shown.

RT-PCR

Total RNA was isolated using a commercial RNA isolation kit (Bio-Rad, USA). Using 1 mg total RNA, single-stranded DNA (cDNA) was synthesized by the use of a cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). The primers used were, for MGMT forward, AGAGTCGTT CACCAGACAGG and MGMT reverse, GCCATT CCTTCACGGCCAG and for GAPDH forward, GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA and GAPDH reverse, GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC, respectively. Conditions for MGMT were 35 cycles, Tanneal 55°C and for GAPDH were 35 cycles, Tanneal 58°C. PCR products were subjected to electrophoretic analysis on 2% agarose gels containing ethidium bromide (Sigma Aldrich, UK), and were visualized and photographed under UV light. All experiments were carried out in triplicate ($P < 0.01$) and representative results are shown.

Statistical analysis

The Graph Pad Instat Statistical package for Windows (GraphPad Software, USA) was used. Data are expressed as mean \pm standard deviation

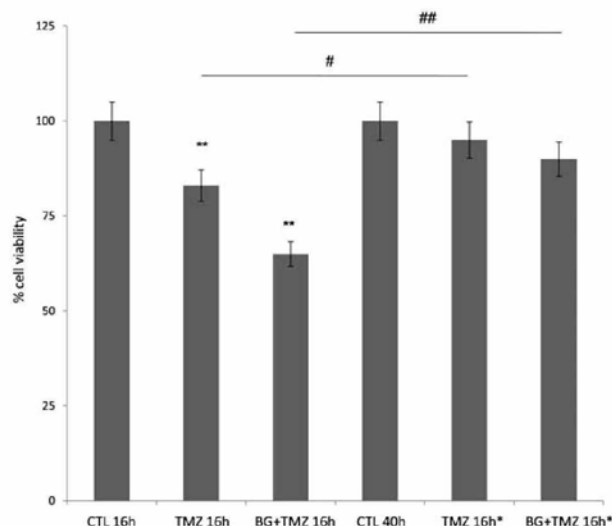


Figure 1 Effect of O6-benzylguanine (BG) and temozolomide (TMZ) on cell viability of T98G cells. Results are expressed as mean percentage of cell counts in control wells. Each point represents a mean standard deviation (SD) of three independent experiments carried out in triplicate ($P < 0.01$). Lanes from left to right: (i) baseline untreated cells (incubated for 16 hours with culture medium) used as control (CTL), (ii) TMZ 100 μ M for 16 hours, (iii) BG 100 μ M for 16 hours (1 hour before TMZ) and TMZ 100 μ M for 16 hours, (iv) baseline untreated cells (incubated for 40 hours with culture medium) used as CTL, (v) TMZ 100 μ M for 16 hours followed by fresh medium for 24 hours (*), (vi) BG 100 μ M for 16 hours (1 hour before TMZ) and TMZ 100 μ M for 16 hours followed by fresh medium for 24 hours (*) (# $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, ** $P < 0.01$).

(SD). The one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-test was used for the comparison of data, and the statistical significance limit was set at $P < 0.05$.

Results

First, we performed an MTT assay and observed that TMZ has only a minimal effect on cell viability of T98G cells, which was enhanced after pre- and co-treatment with BG, resulting in a significant reduction of cell viability. However, at 24 hours after removal of drugs cell viability began to increase again, more evidently after TMZ monotherapy but this effect was also discernible even after combination treatment (Fig. 1).

Second, we tested the expression of MGMT at gene and protein level under the same treatment conditions. We found that TMZ alone reduced MGMT protein levels (Fig. 2A) but had no significant effect on MGMT transcription (Fig. 2C). In contrast, when BG was added, MGMT protein was completely eliminated (Fig. 2A) while MGMT mRNA was also significantly decreased (Fig. 2C). In contrast, at 24 hours after removal of drugs, MGMT mRNA and protein were replete at least to their baseline levels, respectively (Fig. 2B, Fig. 2D).

At the same time, we also examined the protein levels of NF κ B and mt p53 under the same

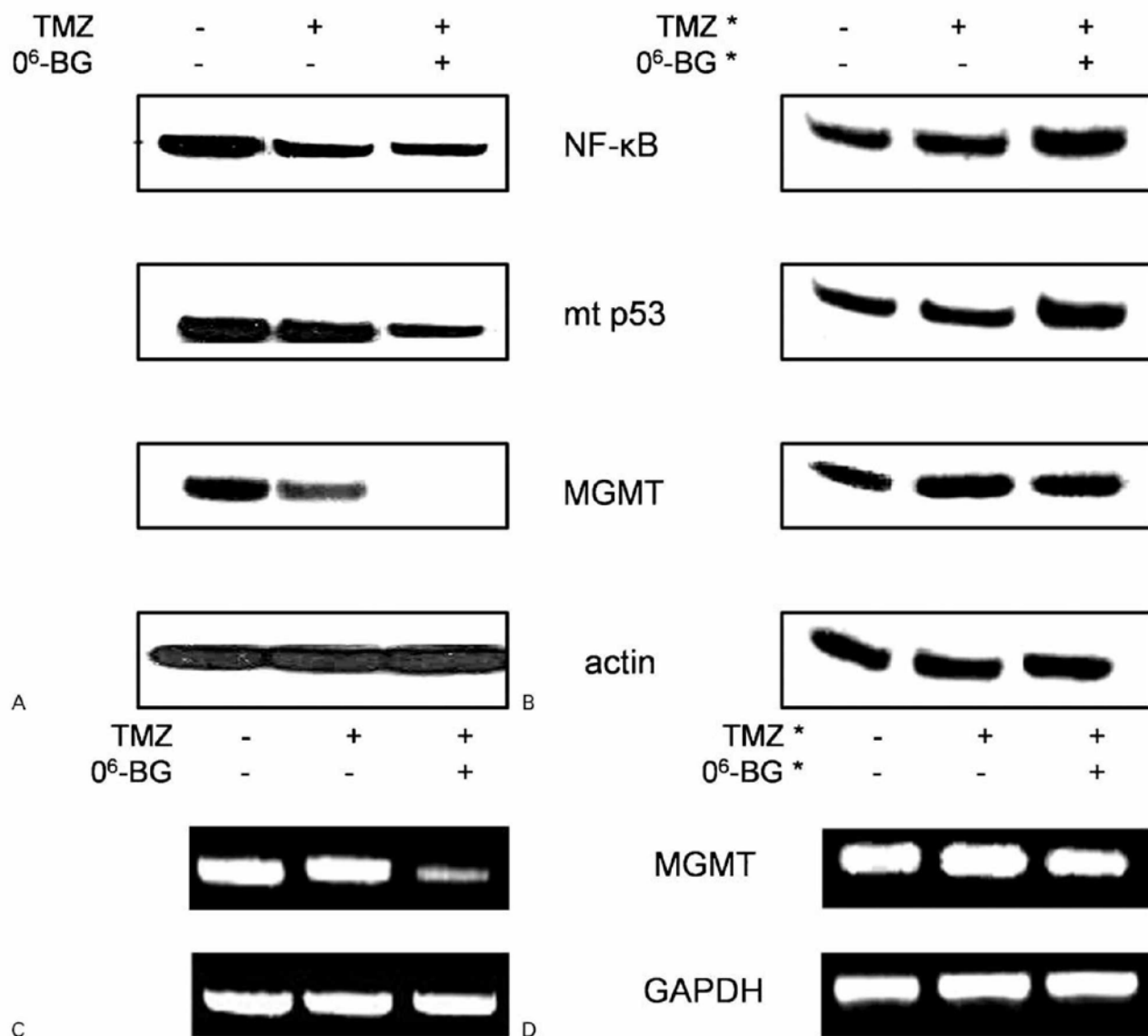


Figure 2 Effect of O⁶-benzylguanine (BG) and temozolomide (TMZ) on nuclear factor kappa B (NF κ B), mutant p53 (mt p53) and O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT). (A) Western blot analysis of NF κ B (p65), mt p53, and MGMT in T98G cells. Lanes from left to right as in Fig. 1 (i–iii). Actin was used as loading control. (B) Western blot analysis of NF κ B (p65), mt p53, and MGMT in T98G cells. Lanes from left to right as in Fig. 1 (iv–vi). Actin was used as loading control. (C) RT-PCR of MGMT mRNA levels in T98G cells. Lanes from left to right as in Fig. 1 (i–iii). GAPDH was used as loading control. (D) RT-PCR of MGMT mRNA levels in T98G cells. Lanes from left to right as in Fig. 1 (iv–vi). GAPDH was used as loading control. 4

conditions. We observed that they were both attenuated after exposure to combination treatment with BG and TMZ, whereas they were both increased to a level comparable to even higher than that of their baseline constitutive activation state 24 hours after removal of the drugs (Fig. 2A, Fig. 2B).

Discussion

Temozolomide resistance is an inherent feature of a significant proportion of GBMs, and direct DNA repair by MGMT is an established mechanism implicated in the poor treatment outcome of such patients.¹⁰ In addition, pathways other than DNA repair have also been associated with alkylator resistance. Nuclear factor kappa B is constitutively activated in GBM, promoting cancer cell migration, invasion, and resistance to chemotherapy.^{11,12}

Mutant p53 is another player in TMZ resistance as GBM patients with low mt p53 expression have higher progression-free survival time and may have longer term prognosis compared with those patients with high mt p53 expression.¹³ Intriguingly, both NF κ B and mt p53 are key transcriptional inducers of MGMT gene expression.^{6,8} One of the main resistance-modulating strategies being tested is the treatment with non-toxic pseudosubstrate inhibitors of MGMT, such as BG.² Given that prolonged incubation with BG is required for maximal potentiation of TMZ cytotoxicity,⁵ the aim of this study was to investigate whether NF κ B and mt p53 are involved in MGMT repletion after treatment with BG and TMZ.

Indeed, our data suggest that BG-mediated enhancement of TMZ cytotoxicity is associated with attenuation of both NF κ B and mt p53 resulting in

reduced MGMT expression in T98G cells. In addition, we have further observed that reversal of this sensitization occurs within 24 hours after treatment withdrawal, through repletion of MGMT transcript and protein levels which correlates with upregulation of both NF κ B and mt p53. Here lie implications for ongoing studies with BG and TMZ using different schedules and dosing regimens, the efficacy of which might be better evaluated with baseline or even early post-treatment assessment of NF κ B and mt p53, in order to identify responder and non-responder subgroups of patients and define the most effective and least toxic combinations of the two drugs.

References

- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, *et al.* O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem.* 2006;96:766–76.
- Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, *et al.* Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2009;27:1262–7.
- Zhang J, Stevens MF, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology.* 2010;78:103–14.
- Hirose Y, Kreklau EL, Erickson LC, Berger MS, Pieper RO. Delayed repletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase resulting in failure to protect the human glioblastoma cell line SF767 from temozolomide-induced cytotoxicity. *J Neurosurg.* 2003;98:591–8.
- Bobola MS, Silber JR, Ellenbogen RG, Geyer JR, Blank A, Goff RD. O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2747–55.
- Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, Efroni G, Zelikovitch B, Fellig Y, *et al.* Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res.* 2007;67:8952–9.
- Harris LC, Remack JS, Houghton PJ, Brent TP. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res.* 1996;56:2029–32.
- Wang X, Chen JX, Liu YH, You C, Mao Q. Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol Sci.* 8 Dec 2012 [Epub ahead of print].
- Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri RM, Destouni C, *et al.* Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NF κ B/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2011;11:13.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008;26:4189–99.
- Weaver KD, Yeyeodu S, Cusack JC Jr, Baldwin AS Jr, Ewend MG. Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas. *J Neurooncol.* 2003;61:187–96.
- Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA. Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J Neurooncol.* 2007;85:39–47.
- Li S, Jiang T, Li G, Wang Z. Impact of p53 status to response of temozolomide in low MGMT expression glioblastomas: preliminary results. *Neurol Res.* 2008;30:567–70.

Authors Queries

Journal: **Neurological Research**

Paper: **3177**

Title: **MGMT repletion after treatment of glioblastoma cells with temozolomide and O6-benzylguanine implicates NF κ B and mutant p53**

Dear Author

During the preparation of your manuscript for publication, the questions listed below have arisen. Please attend to these matters and return this form with your proof. Many thanks for your assistance

Query Reference	Query	Remarks
1	Please confirm the Email address that has to be retained.	
2	Please confirm that the running head is correct.	
3	Please provide the expansion for "PCR" Treatment conditions were as described above.	
4	Please provide expansion for "RT-PCR".	
5	Please update Reference 8.	