



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ Ν. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2009-2010

**Διερεύνηση Σχέσης μεταξύ των Μηχανισμών των
Οδών ΜΜΕ/NPs και NFκΒ/Πρωτεασώματος στον
Ανδρογονο-ανεξάρτητο Καρκίνο του Προστάτη (ΑΙΡ)**

**ANNA ΠΑΤΡΙΚΙΔΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

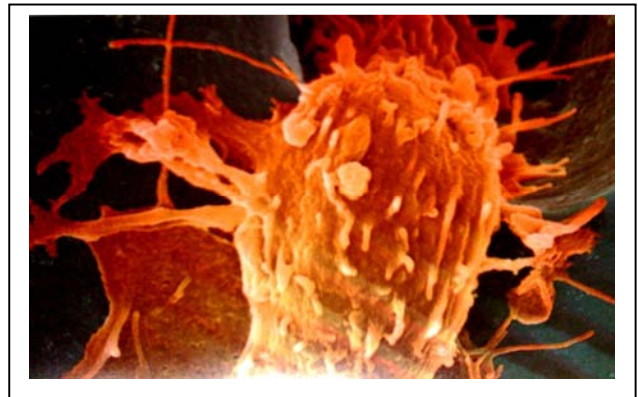
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**Διερεύνηση Σχέσης μεταξύ των Μηχανισμών των
Οδών MME/NPs και NFκB/Πρωτεασώματος στον
Ανδρογόνο-ανεξάρτητο Καρκίνο του Προστάτη (AIP)**

ANNA ΠΑΤΡΙΚΙΔΟΥ
MD DDS BSc(HumGen) MSc(OMFS) FDSRCS(Eng)
ΙΑΤΡΟΣ

Επιβλέπων: Αν. Καθ. Χρήστος Ν. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ

Απρίλιος 2010

ΔΗΛΩΣΗ ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

Βεβαιώνω ότι η εργασία που παρουσιάζεται σε αυτήν την διδακτορική διατριβή είναι εξ ολοκλήρου δική μου, εκτός από τα συγκεκριμένα σημεία όπου υποδεικνύεται διαφορετικά.

Πατρικίδου Άννα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΧΡΗΣΤΟΣ Ν. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
3. ΜΙΧΑΗΛ ΜΕΛΕΚΟΣ
Καθηγητής Ουρολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΧΡΗΣΤΟΣ Ν. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ
Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
3. ΜΙΧΑΗΛ ΜΕΛΕΚΟΣ
Καθηγητής Ουρολογίας
4. ΛΑΖΑΡΟΣ ΣΑΚΚΑΣ
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
5. ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ
Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας
6. ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ
Αναπλ. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής
7. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ
Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή μου, που μου έδωσε την ευκαιρία εξαιρετικής συνεργασίας και μάθησης στα πλαίσια μιας τόσο συναρπαστικής έρευνας, και για την συνεχή του υποστήριξη και εμπιστοσύνη.

Αντίστοιχα, είμαι ευγνώμων προς τις συνεργάτιδες του Εργαστηρίου μας, Αριστέα Καραγιαννάκη και Ελεάνα Χατζηδάκη, για την ανεκτίμητη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Γιάννη Βουτσαδάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές και την συμπαράσταση του ιδίως στην δύσκολη αρχή.

Θερμές ευχαριστίες στην Ροζαλία Βαλερή, Κυτταρολογικό Τμήμα Α.Ν.Θ. Θεαγενείου, και στην Έφη Αποστόλου, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, για την βοήθεια τους στην διεκπεραίωση μέρους των ερευνητικών πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Dr David Nanus, Cornell Weill Medical College, New York, USA, για την παροχή σημαντικού ερευνητικού υλικού αλλά και την κριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής της έρευνας.

Στην οικογένεια μου, για την αγάπη και την ομορφιά τους.

Και, πάνω από όλα, στον μικρό μου Έρωτα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα Τίτλου

Δήλωση Πνευματικής Ιδιοκτησίας

Ευχαριστίες

Πίνακας Περιεχομένων

Κατάλογος Εικόνων

Κατάλογος Πινάκων

Κατάλογος Παραρτημάτων

Συνομογραφίες

Σύνοψη

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος Προστάτη: το κλινικό πρόβλημα

1.1.1 Επιδημιολογία

1.1.2 Παράγοντες κινδύνου

1.1.3 Διάγνωση και σταδιοποίηση

1.1.4 Θεραπεία και πρόγνωση

1.2 Καρκίνος Προστάτη: Μοριακή βιολογία

1.2.1 Ο ανδρογονικός υποδοχέας

1.2.2 Κληρονομούμενος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου προστάτη

1.2.3 Επίκτητοι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί

1.2.3.1 Η αντιμετάθεση TMPRSS2:ETS

- 1.2.3.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί
- 1.2.3.3 Ανώμαλη ενεργοποίηση AR
- 1.2.3.4 Άλλοι μηχανισμοί
- 1.2.4 Μοντέλο καρκινογένεσης
- 1.2.5 Μικροπεριβάλλον όγκου
- 1.3 Η οδός NFκB-Ουβικουιίνης-Πρωτεασώματος
 - 1.3.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB
 - 1.3.1.1 Ρύθμιση σηματοδοτική οδού NFκB
 - 1.3.1.2 NFκB και καρκίνος προστάτη
 - 1.3.2 Το σύστημα Ουβικουιίνης-Πρωτεασώματος
 - 1.3.2.1 Δομή και λειτουργία συστήματος UPS
 - 1.3.2.2 Ο αναστολέας πρωτεασώματος βορτεζομίμη
- 1.4 Ο άξονας NEP/Νευροπεπτιδίων
 - 1.4.1 Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP)
 - 1.4.1.1 Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες NEP
 - 1.4.1.2 NEP και καρκίνος προστάτη
 - 1.4.2 Νευροπεπτίδια
 - 1.4.2.1 Ενδοθελίνη
 - 1.4.2.2 Βομβεσίνη και BLPs
 - 1.4.2.3 Νευροπεπτίδια και καρκίνος προστάτη

Κεφάλαιο 2 Ερευνητική Υπόθεση - Στόχοι

2.1 Ερευνητική Υπόθεση

2.2 Στόχοι

2.3 Κλινικό Ενδιαφέρον & Δυνατότητες Κλινικής Εφαρμογής

Κεφάλαιο 3 Υλικά & Μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια κυττάρων και αντιδραστήρια

3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών

3.3 Πυρηνικά & κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

3.4 Κυτταρομετρία ροής

3.5 Προσδιορισμός ενζυματικής δραστηριότητας NEP

3.6 Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης ενδοθελίνης (ET-1 ELISA)

3.7 Προσδιορισμός ενζυματικής δραστηριότητας 20S πρωτεασώματος

3.8 Πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

3.9 Ανοσοκυτταροχημεία

3.10 Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (EMSA)

Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα

4.1 Άξονας NEP/νευροπεπτιδίων σε σταθερή κατάσταση

4.1.1 Ανάλυση φυσικών κυτταρικών σειρών

4.1.2 Ανάλυση διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς

4.2 Άξονας NFκB/UPS σε σταθερή κατάσταση

4.2.1 Ανάλυση φυσικών κυτταρικών σειρών

- 4.2.1.1 Υποκυτταρική εντόπιση NFκB
- 4.2.1.2 Πυρηνική & κυτταροπλασματική πρωτεΐνη NFκB
- 4.2.1.3 Ανίχνευση δέσμευσης NFκB/DNA
- 4.2.1.4 Κυτταρικά επίπεδα IκB-α
- 4.2.1.5 Ενζυματική δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος
- 4.2.2 Ανάλυση διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς
- 4.3 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην κυτταρική βιωσιμότητα
- 4.4 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην υποκυτταρική εντόπιση του NFκB
- 4.5 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην ποσότητα πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB
- 4.6 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην σύνδεση NFκB/DNA
- 4.7 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην σύνδεση IκB-α
- 4.8 Επίδραση νευροπεπτιδίων στην δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος

Κεφάλαιο 5 Συζήτηση

- 5.1 Σχέση άξονα NEP/Νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/UPS σε σταθερή κατάσταση
- 5.2 Δυναμική αλληλεπίδραση άξονα NEP/Νευροπεπτιδίων και οδού NFκB/UPS
 - 5.2.1 Ενεργοποίηση της οδού NFκB/UPS από τα νευροπεπτίδια

5.2.2 Πρώιμη αύξηση της δραστηριότητας του 20S πρωτεασώματος από τα νευροπεπτίδια

5.2.3 Παραγωγή ROS από τα νευροπεπτίδια και επαγόμενες οδοί

5.2.3 Δυνητικό μοντέλο νευροπεπτιδιακής διέγερσης: ROS – Πρωτεάσωμα – NFκB

5.3 Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

Ηλεκτρονικές Πηγές

Παράρτημα I

Παράρτημα II

Παράρτημα III

Παράρτημα IV

Παράρτημα V

Παράρτημα VI

Παράρτημα VII

Παράρτημα VIII

Παράρτημα IX

Παράρτημα X

Παράρτημα XI

Παράρτημα XII

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Εξωφύλλου (αριστερά) Κύτταρα LnCaP σε κυτταρική διαίρεση

Εικόνα Εξωφύλλου (δεξιά) Κύτταρο LnCaP

Εικόνα 1.1 Επίπτωση καρκίνου στους άρρενες, Η.Π.Α., 1930-2005

Εικόνα 1.2 Θνησιμότητα καρκίνου στους άρρενες, Η.Π.Α., 1930-2005

Εικόνα 1.3 Επίπτωση Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. (περίοδος 1975-2006)

Εικόνα 1.4 Θνησιμότητα Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. (περίοδος 1975-2006)

Εικόνα 1.5 Επίπτωση Καρκίνου Προστάτη και Ηλικία

Εικόνα 1.6 Αντιμετώπιση κλινικώς εντοπισμένου καρκίνου προστάτη πολύ χαμηλού και χαμηλού κινδύνου υποτροπής

Εικόνα 1.7 Αντιμετώπιση κλινικώς εντοπισμένου καρκίνου προστάτη υψηλού κινδύνου υποτροπής και τοπικά προχωρημένης νόσου

Εικόνα 1.8 Πενταετής Επιβίωση Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. (περίοδος 1998-2005)

Εικόνα 1.9 Θνησιμότητα Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. (περίοδος 1975-2006)

Εικόνα 1.10 Φυσική ιστορία ορμονο-άντοχου καρκίνου προστάτη

Εικόνα 1.11 Δομή γονιδίου AR

Εικόνα 1.12 Μεταγραφικό σύμπλοκο AR

Εικόνα 1.13 Σηματοδοτική οδός AR

Εικόνα 1.14 Αντιμετάθεση TMPRSS2:ERG

Εικόνα 1.15 Επιγενετικοί μηχανισμοί στον καρκίνο προστάτη

Εικόνα 1.16 Προοδευτικό μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο προστάτη

Εικόνα 1.17 Αλληλεπιδράσεις μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο προστάτη

Εικόνα 1.18 Rel Homology Domain

Εικόνα 1.19 Ετεροδιμερές p50/RelB

Εικόνα 1.20 Οικογένειες NFκB, IκB και IKK

Εικόνα 1.21 Οδοί ενεργοποίησης NFκB

Εικόνα 1.22 Σηματοδοτική οδός NFκB

Εικόνα 1.23 Γονίδια-στόχοι NFκB που εμπλέκονται στην ογκογένεση

Εικόνα 1.24 Οδοί ενεργοποίησης NFκB στην ογκογένεση

Εικόνα 1.25 Δομή 20S πρωτεασώματος

Εικόνα 1.26 Πρωτεολυτική δράση πρωτεασώματος

Εικόνα 1.27 Αναστολέας πρωτεασώματος βορτεζομίμη

Εικόνα 1.28 3-D απεικόνιση μορίου NEP

Εικόνα 1.29 3-D απεικόνιση ενεργού κέντρου NEP

Εικόνα 1.30 3-D απεικόνιση μορίου ET-1

Εικόνα 1.31 Σηματοδοτικές οδοί που επάγονται από την ET-1

Εικόνα 2.1 Ερευνητική Υπόθεση

Εικόνα 3.1 Ανάστροφο μικροσκόπιο

Εικόνα 3.2 Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης

Εικόνα 4.1 Ανάλυση ειδικής δραστηριότητας NEP σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.2 Ανάλυση μεμβρανικής έκφρασης NEP σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.3 Μέτρηση NEP πρωτεΐνης σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.4 Μέτρηση εκκρινόμενης ET-1 σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.5 Ανάλυση ειδικής δραστηριότητας NEP πρωτεΐνης σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.6 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.7 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB με χρήση αναστολέων UPS σε κύτταρα PC-3

Εικόνα 4.8 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB με χρήση rhNEP σε κύτταρα PC-3

Εικόνα 4.9 Ανάλυση πυρηνικής και κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης NFκB σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.10 Ανίχνευση δέσμευσης NFκB/DNA σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.11 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.12 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση αναστολέα πρωτεασώματος

Εικόνα 4.13 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.14 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.15 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη

Εικόνα 4.16 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1

Εικόνα 4.17 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS

Εικόνα 4.18 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP

Εικόνα 4.19 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων UPS

Εικόνα 4.20 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων

Εικόνα 4.21 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων UPS

Εικόνα 4.22 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1 και αναστολέων

Εικόνα 4.23 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS και αναστολέων

Εικόνα 4.24 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP

Εικόνα 4.25 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων

Εικόνα 4.26 Ανίχνευση δέσμησης NFκB/DNA σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων (A)

Εικόνα 4.27 Ανίχνευση δέσμησης NFκB/DNA σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων (B)

Εικόνα 4.28 Ανίχνευση δέσμησης NFκB/DNA σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP

Εικόνα 4.29 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1 και αναστολέων

Εικόνα 4.30 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS και αναστολέων

Εικόνα 4.31 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων

Εικόνα 4.32 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση rhNEP και νευροπεπτιδίων

Εικόνα 4.33 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1: επώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων

Εικόνα 4.34 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS: επώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων

Εικόνα 4.35 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1: επώσεις αυξανόμενου χρόνου

Εικόνα 4.36 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS: επώσεις αυξανόμενου χρόνου

Εικόνα 4.37 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων: επώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων

Εικόνα 5.1 Ρόλος ET-1 στο οστικό μικροπεριβάλλον μεταστάσεων στον καρκίνο του προστάτη

Εικόνα 5.2 Ανταγωνιστές άξονα ενδοθηλίνης υπό κλινική διερεύνηση στον καρκίνο προστάτη

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Κληρονομούμενοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί και καρκίνος προστάτη

Πίνακας 1.2 Υποστρώματα NEP

Πίνακας 3.1 Έκφραση NEP στις κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Πίνακας 3.2 Αντιδραστήρια επωάσεων

Πίνακας 3.3 Πρωτογενή αντισώματα Western blotting

Πίνακας 4.1 Ανάλυση του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/UPS
σε σταθερή κατάσταση

Πίνακας 4.2 Ανάλυση της επίδρασης του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων στην οδό
NFκB/UPS

Πίνακας 4.1 Ανάλυση του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/UPS
σε σταθερή κατάσταση

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ

- Παράρτημα I Ανθρώπινα Σηματοδοτικά Γονίδια Rel/NFκB
- Παράρτημα II Γονίδια-στόχοι NFκB
- Παράρτημα III Ιδιότητες Φυσικών Κυτταρικών Σειρών Καρκίνου Προστάτη
- Παράρτημα IV Ανοσοκυτταροχημεία NFκB
- Παράρτημα V Πυρηνική NFκB πρωτεΐνη: Western blotting
- Παράρτημα VI Σύδεση NFκB/DNA: EMSA
- Παράρτημα VII Ολική Κυτταρική Πρωτεΐνη IκB-α: Western blotting
- Παράρτημα VIII Μέτρηση Δραστηριότητας 20S Πρωτεασώματος
- Παράρτημα IX Μέτρηση Ενζυματικής Δραστηριότητας NEP

Παράρτημα X Μεμβρανική CD10 (NEP) Πρωτεΐνη: Western blotting

Παράρτημα XI Επιφανειακή Έκφραση Πρωτεΐνης CD10 (NEP): Κυτταρομετρία Ροής

Παράρτημα XII Συγκέντρωση Εκκρινόμενης ET-1: Μέθοδος ELISA

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Mg	Microgram; Μικρογραμμάριο
MI	Microlitre; Μικρόλιτρο
μM	Micromolar; Μικρογραμμομόριο
AA	Anti-androgen; Αντι-ανδρογόνο
AD	Androgen-dependent; Ανδρογόνο-εξαρτώμενος
ADT	Androgen deprivation therapy; Θεραπεία στέρησης ανδρογόνων
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AI	Androgen-independent; Μη Ανδρογόνο-εξαρτώμενος
APM(N)	Aminopeptidase M (N); membrane alanyl aminopeptidase
AR	Androgen receptor; υποδοχέας ανδρογόνων

ARE	Androgen-response element
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1; Ρυθμιστική αποπτωτικών σημάτων κινάση 1
BB₂	Type 2 bombesin receptor; υποδοχέας βομβεσίνης τύπου 2
BBS	Bombesin; βομβεσίνη
bcl-2	B cell lymphoma 2; Λέμφωμα B κυττάρων τύπου 2
BPH	Benign prostate hyperplasia; καλοήθης υπερπλασία προστάτη
BSA	Bovine serum albumin; λευκωματίνη βοείου προελεύσεως
CALLA	Common Acute Lymphocytic Leukaemia Antigen; Κοινό Αντιγόνο Οξείας Λεμφοβλαστικής Αναιμίας
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II; Εξαρτώμενη από την Ca ²⁺ /καλμοδουλίνη κινάση II
CD10	Cluster of Differentiation 10
CE	Cytoplasmic extracts; κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα
CHAPS	3-[3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate
DAB	Diaminobenzidine; Διαμινοβενζιδίνη
DAG	Diacylglycerol; Διασυλγλυκερόλη
DHT	Dihydrotestosterone; Διυδροτεστοστερόνη
DNA	Deoxyribonucleic acid; Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures; Ευρωπαϊκή Συλλογή Ζωικών Κυτταρικών Σειρών
ECE1	Endothelin-converting enzyme 1; Μετατρεπτικό της

	ενδοθηλίνης ένζυμο 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor; επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Epidermal growth factor receptor; υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay; Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay; Ηλεκτροφορητική Δοκιμή Μετατόπισης Κινητικότητας
ET-1	Endothelin 1; Ενδοθηλίνη 1
ETAR	Endothelin receptor A; υποδοχέας A ενδοθηλίνης
ETBR	Endothelin receptor B; υποδοχέας B ενδοθηλίνης
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal Bovine Serum; βόειος εμβρυϊκός ορός
FCM	Flow cytometry; Κυτταρομετρία ροής
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GPCR	G protein coupled receptor
GRP	Gastrin-releasing peptide
GRP-R	Gastrin-releasing peptide receptor
HDAC	Histone Deacetylase; Αποακετυλίωση Ιστονών
HG-PIN	High-grade prostate intra-epithelial neoplasia; Υψηλού βαθμού προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία
hr(s)	Ωρα(ες)

ICC	Immunocytochemistry; Ανοσοκυτταροχημεία
IGF	Insulin growth factor; Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης
IκB	Inhibitor of Kappa-B; Αναστολέας του Κάππα Β
IKK	Inhibitor of Kappa-B kinase; Αναστολέας της κινάσης του Κάππα-B
IL-6	Interleukin 6; Ιντερευκίνη 6
Kb	Kilobase; Κιλοβάση
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase; Πρωτεϊνική Κινάση που Ενεργοποιείται από Μιτογόνα
MFI	Mean Fluorescent Intensity; Μέση Ένταση Φθορισμού
Mg	Milligram; μικρογραμμάριο
Min	Minute; Λεπτό
ml	Millilitre; μικρόλιτρο
MMPs	Matrix metalloproteinases; μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας
Ng	Nanogram; νανογραμμάριο
NE	Nuclear extracts; πυρηνικά εκχυλίσματα
NEP	Neutral endopeptidase; Ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
NFκB	Nuclear Factor Kappa-B; Πυρηνικός παράγοντας Κάππα-B
NPs	Neuropeptides; Νευροπεπτίδια
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Prostate cancer; Καρκίνος Προστάτη
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor; Υποδοχέας αυξητικού

	παράγοντα αιμοπεταλίων
PEST	Proline Glutamic acid Serine Threonine (sequence)
PKC	Protein kinase C; Πρωτεϊνική Κινάση C
PLCγ	Phospholipase C-gamma; Φωσφολιπάση C- γ
Pmoles	Picomoles; πικογραμμομόρια
PSA	Prostate Specific Antigen; Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
RFU	Relative Fluorescence Unit
rhNEP	Recombinant human NEP; ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
ROS	Reactive oxygen species; Ενεργείς ρίζες οξυγόνου
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medium)
SAPKs	Stress-activated protein kinases; Πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες
Sec	Second; Δευτερόλεπτο
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results (Program)
TNFα	Tumour Necrosis Factor α ; Παράγοντας ιστικής νέκρωσης α
TLR	Toll-like receptor
U	Unit(s); Μονάδες
UPS	Ubiquitin-Proteasome System; Σύστημα Ουβικουιτίνης-Πρωτεασώματος
WB	Western blotting; πρωτεϊνική ανοσοαποτύπωση

ΣΥΝΟΨΗ

Η ανδρογονο-ανεξαρτησία (ή ορθότερα με βάση τον νεότερο όρο η ανθεκτικότητα στον ευνουχισμό) στον καρκίνο του προστάτη (PC) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό γεγονός που σηματοδοτεί την πρόοδο της νόσου και την αλλαγή προς έναν επιθετικότερο φαινότυπο. Η νευροενδοκρινική διαφοροποίηση και η αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB είναι δύο μηχανισμοί που έχουν ανεξάρτητα συνδεθεί με αυτή τη διαδικασία. Ερευνήσαμε τις σχέσεις αλληλεπίδρασης αυτών των οδών χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλα ανδρογονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη (AD) και μη ανδρογονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη (AI).

Μετρήσαμε τα κυτταρικά επίπεδα, τη δραστηριότητα και την μεμβρανική έκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP), τα επίπεδα της εκκρινόμενης ET-1, τα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά επίπεδα, την ενδοκυττάρια εντόπιση και το

ποσοστό σύνδεσης του DNA του NF-κB, καθώς και την πρωτεασωμική δραστηριότητα σε φυσικές και διαμολυσμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη, αντιπροσωπεύοντας πρότυπες καταστάσεις AD και AI καρκίνου.

Σε σταθερή κατάσταση βρήκαμε ότι τα ανδρογόνο-εξαρτώμενα κύτταρα είχαν ενεργοποιημένη την οδό NEP/NPs, με υψηλή έκφραση και δραστηριότητα NEP και χαμηλή εκκρινόμενη ET-1. Αντίθετα, παρουσίασαν χαμηλό επίπεδο ενεργοποίησης της οδού NFκB (κυτταροπλασματική εντόπιση, χαμηλά επίπεδα πυρηνικής πρωτεΐνης, χαμηλά ποσοστά σύνδεσης με DNA), με σύγχρονη σχετικά μειωμένη δραστηριότητα του 20S πρωτεοσώματος και αυξημένα κυτταρικά επίπεδα IκB-α. Τα μη ανδρογόνο-εξαρτώμενα κύτταρα παρουσίασαν την ακριβώς αντίστροφη εικόνα, δηλαδή αυξημένη δραστηριότητα 20S πρωτεοσώματος και ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της κανονικής οδού, και ελάχιστη δραστηριότητα NEP με απότοκο ενισχυμένο νευροπεπτιδικό παρακρινές περιβάλλον.

Στην συνέχεια της έρευνας αναλύθηκε η πιθανότητα ύπαρξης μιας δυναμικής σχέσης μεταξύ αυτών των οδών και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Διέγερση με νευροπεπτίδια προκάλεσε ενεργοποίηση της οδού πρωτεοσώματος/NF-κB (πυρηνική μετακίνηση NF-κB, άυξηση ποσού πυρηνικής πρωτεΐνης, αυξημένη σύνδεση NF-κB/DNA, μειωμένα κυτταρικά επίπεδα IκB-α), αυξημένη πρωτεασωμική δραστηριότητα, αλλά μόνο σε συνθήκες έλλειψης NEP.

Επιπλέον, η ενεργοποίηση αυτή σαν αποτέλεσμα διέγερσης με νευροπεπτίδια δεν μπορούσε να επιτευχθεί αν προηγούνταν χρήση ειδικών νευροπεπτιδιακών αναστολέων ή αναστολέων της οδού πρωτεασώματος/NF-κΒ. Τέλος, η αύξηση της πρωτεσωμικής δραστηριότητας φαίνεται να είναι πρώιμο αποτέλεσμα της νευροπεπτιδιακής διέγερσης, και έπεται η μείωση των κυτταρικών επιπέδων IκΒ-α και η διέγερση του NF-κΒ.

Τα αποτελέσματα μας φαίνεται ότι υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας άμεσης μηχανιστικής σχέσης μεταξύ του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκΒ/πρωτεασώματος, με μια σαφή εικόνα εμπλοκής των νευροπεπτιδίων στην εξέλιξη προς την επιθετικότερη κατάσταση του μη-ανδρογόνου-εξαρτώμενου καρκίνου προστάτη.

Οι σύγχρονες τάσεις στην αντινεοπλασματική θεραπεία υποστηρίζουν τις θεραπείες συνδυασμού για βέλτιστη αποδοτικότητα και εύρος αντικαρκινικής δράσης. Επομένως, η μεταφραστική έρευνα με στόχο την διευκρίνηση των μοριακών μηχανισμών που υπαγορεύουν την μετάβαση σε επιθετικότερους καρκινικούς φαινότυπους στοχεύει στην συνδυαστική κλινική εφαρμογή αγωνιστών/ανταγωνιστών. Τα δεδομένα της παρούσας ερευνητικής εργασίας υποδεικνύουν ότι τα νευροπεπτίδια επηρεάζουν την δραστηριότητα της οδού NFκΒ/πρωτεασώματος. Ως εκ τούτου, θεραπεία συνδυασμού που θα στοχεύει και στις δύο οδούς μπορεί τελικά να αποδειχθεί ωφέλιμη στην κλινική πράξη,

εμποδίζοντας αποτελεσματικότερα οδούς που έχουν γνωστή εμπλοκή στην επιβίωση, διήθηση και μετάσταση των προστατικών καρκινικών κυττάρων.

SYNOPSIS

INTRODUCTION

Castration-resistance in prostate cancer is a critical event hallmarking a switch to a more aggressive phenotype. Upregulation of NF κ B activity and neuroendocrine differentiation are two mechanisms known to be involved in prostate cancer progression to castration resistance. We investigated the interrelations of these pathways using *in vitro* models of androgen-dependent (AD) and androgen-independent (AI) prostate cancer (PC).

METHODS

We measured cellular levels, activity and surface expression of neutral endopeptidase (NEP), levels of secreted ET1, levels, sub-cellular localisation and DNA binding ability of NF κ B, I κ B α levels and proteasomal activity in human

native prostate cancer cell lines (LnCaP and PC3) and a transfectant line (WT-5), modelling AD and AI states.

RESULTS

At baseline, AD cells were found to have upregulated NEP/NPs pathway with high NEP expression and activity and less secreted ET-1. In contrast, they exhibited a low-level activation of the NF κ B pathway associated with comparatively low 20S proteasome activity. The AI cells showed the exact mirror image, namely increased proteasomal activity resulting in a canonical pathway-mediated NF κ B activation, and minimal NEP activity with increased levels of secreted ET-1.

Neuropeptides induced nuclear translocation of NF κ B in AI cells, also evident as increased DNA binding in mobility shift assay (EMSA), reduced total I κ B levels, and increased 20S proteasomal activity. AD cells showed no appreciable nuclear translocation upon neuropeptide stimulation, with less intense DNA binding signal on EMSA and decreased proteasomal activity. These effects were at least partially prevented by specific neuropeptide receptor inhibitors, as well as NF κ B, IKK and proteasome inhibitors.

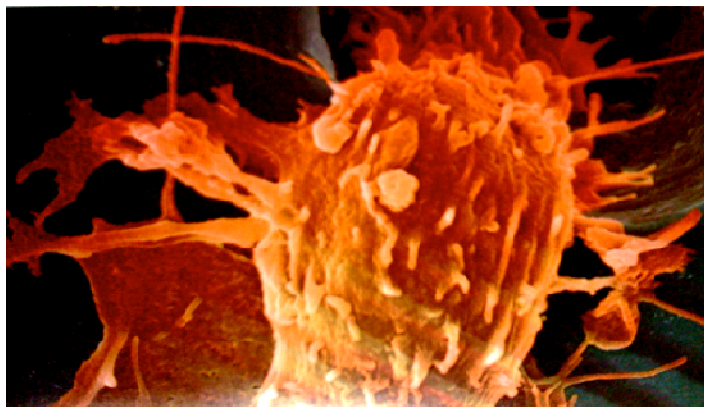
CONCLUSION

Analysis of components of the two pathways at baseline has shown that these pathways exhibit an inverse and mirror image relationship in androgen-dependent (AD) and –independent (AI) states *in vitro*. Our results also support evidence for a direct mechanistic connection between the neutral

endopeptidase/neuropeptides and NFκB/proteasome pathways, with a distinct neuropeptide-induced profile in the more aggressive, AI cancer state. A combination therapy targeting both pathways may ultimately prove to be of benefit in clinical practice.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





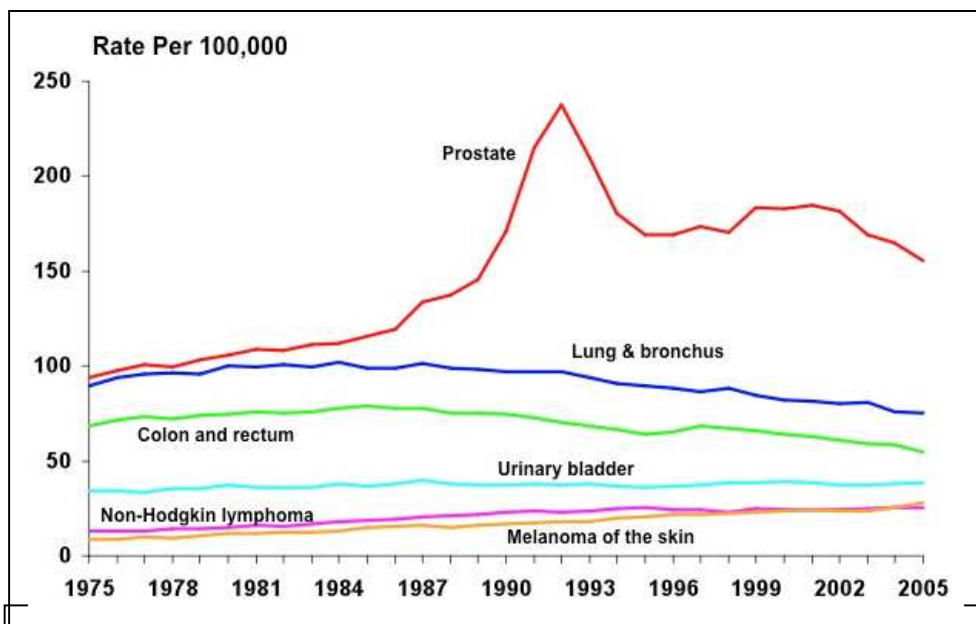
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΡΟΣΤΑΤΗ: ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

1.1.1 Επιδημιολογία

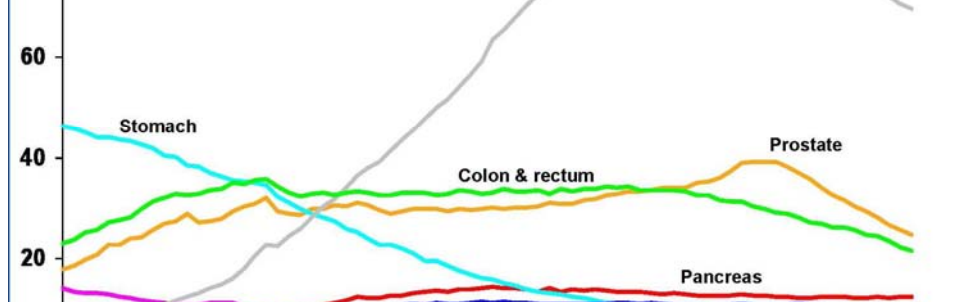
Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πιο αινιγματική από τις συχνότερες κακοήθειες συμπαγών οργάνων. Παγκοσμίως είναι ο πέμπτος πιο συχνός καρκίνος και ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος στους άντρες, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (11.7% των νέων περιστατικών καρκίνου παγκοσμίως, 19% στις ανεπτυγμένες χώρες και 5.3% στις αναπτυσσόμενες χώρες (*Parkin et al, 2005*). Στις ανεπτυγμένες χώρες είναι η πιο συχνά διαγνωσθείσα κακοήθεια, και δεύτερη μετά τον καρκίνο πνεύμονα αιτία θανάτου στους άντρες (*Εικόνα 1.1 & 1.2*). Υπολογίζεται ότι, στις δυτικές κοινωνίες, ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης μικροσκοπικού καρκίνου προστάτη είναι περίπου 30%. Η συχνότητα ανεύρεσης μικροσκοπικού καρκίνου προστάτη σε υλικό νεκροψιών είναι περίπου 80% για

άντρες ηλικίας 80 ετών. Όμως, καθώς η νόσος αναπτύσσεται αργά, ο κίνδυνος ανάπτυξης κλινικά ανιχνεύσιμου καρκίνου είναι περίπου 16% (δια βίου κίνδυνος για διάγνωση καρκίνου προστάτη 1 προς 6, υπολογισμένος με βάση τις διαγνώσεις στις Η.Π.Α. για την περίοδο 2004-2006). Περίπου 8% των ανδρών θα αναπτύξουν καρκίνο προστάτη σε ηλικία 50-70 ετών (*Horner et al, 2009, SEER Cancer Review Statistics 1975-2006*). Ο δια βίου κίνδυνος θανάτου από την νόσο είναι περίπου 3% (*Kirby & Patel, 2008*).



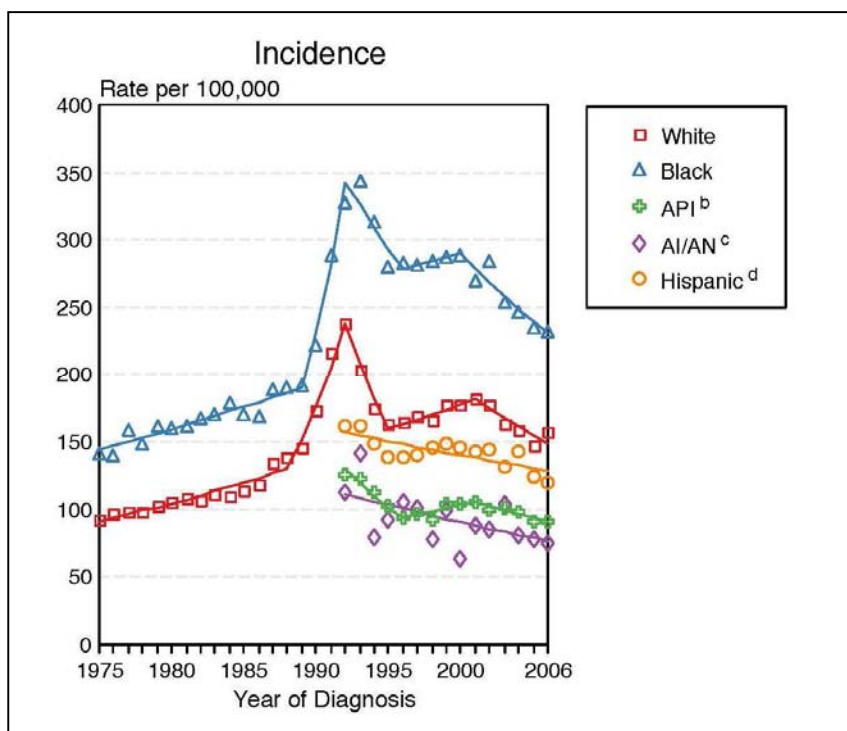
Εικόνα 1.1. Επίπτωση καρκίνου στους άντρες, Η.Π.Α., 1930-2005 (προσαρμοσμένη για την ηλικία με βάση τον πληθυσμό Η.Π.Α. του έτους 2000). Πηγή: US Mortality Data 1960-2005, US Mortality Volumes 1930-1959, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2008

80



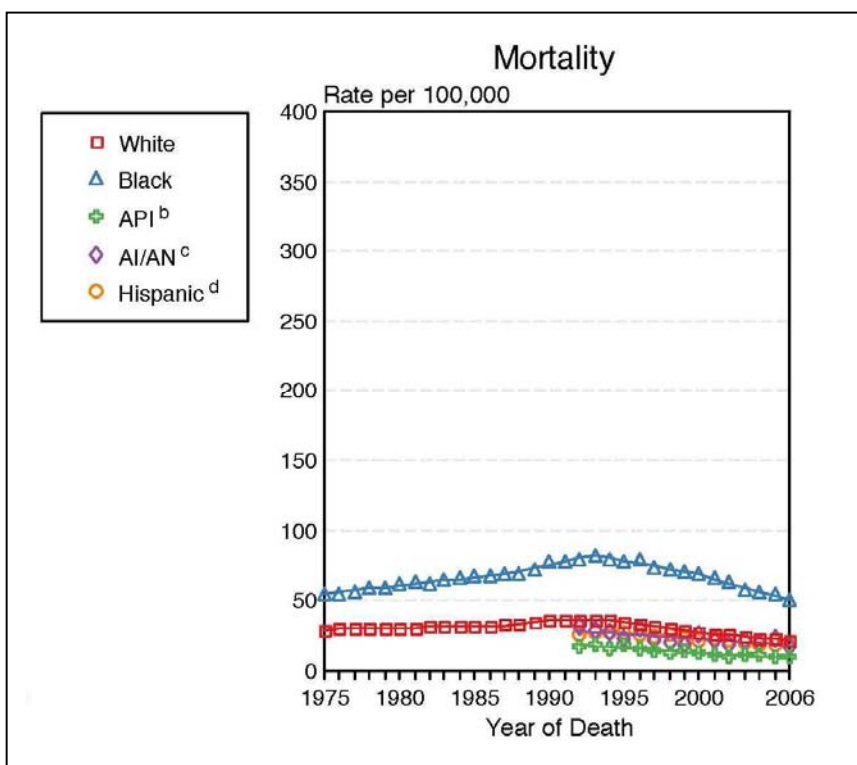
Εικόνα 1.2. Θνησιμότητα καρκίνου στους άντρες, Η.Π.Α., 1930-2005 (προσαρμοσμένη για την ηλικία με βάση τον πληθυσμό Η.Π.Α. του έτους 2000). Πηγή: US Mortality Data 1960-2005, US Mortality Volumes 1930-1959, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2008

Παγκοσμίως, υπήρξε μια απότομη αύξηση της συχνότητας του καρκίνου προστάτη στις δυτικές κοινωνίες κυρίως στα τέλη της δεκαετίας του '80, που αντιστοιχούσε στην διάδοση της χρήσης του ελέγχου του Ειδικού Προστατικού Αντιγόνου (Prostate Specific Antigen, PSA) για την διάγνωση της νόσου. Από την δεκαετία του 1990 και μετά υπάρχει μια σταθερή μικρή πτώση στην επίπτωση της νόσου. Στην περίοδο 2002-2006, η διάμεση ηλικία διάγνωσης του καρκίνου προστάτη ήταν τα 68 έτη. Η προσαρμοσμένη στην ηλικία επίπτωση στις Η.Π.Α. ήταν 159.3 ανά 100,000 άντρες ετησίως (*Horner et al, 2009, SEER Cancer Review Statistics 1975-2006*) (*Εικόνα 1.3*). Παγκοσμίως, υπήρξαν περίπου 680,000 περιστατικά καρκίνου προστάτη το έτος 2002 (*Parkin et al, 2005*). Από την άλλη πλευρά, επειδή ο καρκίνος προστάτη είναι νόσος ηλικιών άνω των 50 ετών, η παγκόσμια τάση για αύξηση του μέσου όρου ηλικίας του πληθυσμού σημαίνει ότι ο αριθμός των ανδρών με διάγνωση καρκίνου προστάτη αναμένεται να αυξηθεί στις επόμενες δύο δεκαετίες.



Εικόνα 1.3. Επίπτωση Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. για την περίοδο 1975-2006 (SEER Program Joinpoint Analyses)

Η θνησιμότητα από την νόσο στην Ευρώπη είχε ένα μέγιστο αύξησης το 1993, ακολουθούμενη από μια περίοδο σταθεροποίησης και μια πρόσφατη πτωτική τάση (Kirby & Patel, 2008). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η διάμεση ηλικία θανάτου από την νόσο για την περίοδο 2002-2006 ήταν τα 80 έτη. Περίπου 0.0% πέθαναν σε ηλικία κάτω των 20 ετών, 0.0% σε ηλικίες μεταξύ 20 και 34 ετών, 0.1% σε ηλικίες μεταξύ 35 και 44 ετών, 1.4% σε ηλικίες μεταξύ 45 και 54 ετών, 7.2% σε ηλικίες μεταξύ 55 και 64 ετών, 20.1% σε ηλικίες μεταξύ 65 και 74 ετών, 40.9% σε ηλικίες μεταξύ 75 και 84 ετών, και 30.3% σε ηλικίες άνω των 85 ετών. Η προσαρμοσμένη με βάση την ηλικία θνησιμότητα ήταν 25.6 ανά 100,000 άντρες ετησίως, για την περίοδο 2002-2006 (Horner et al, 2009, SEER Cancer Review Statistics 1975-2006) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4.
Θνησιμότητα Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. για την περίοδο 1975-2006 (SEER Program Joinpoint Analyses)

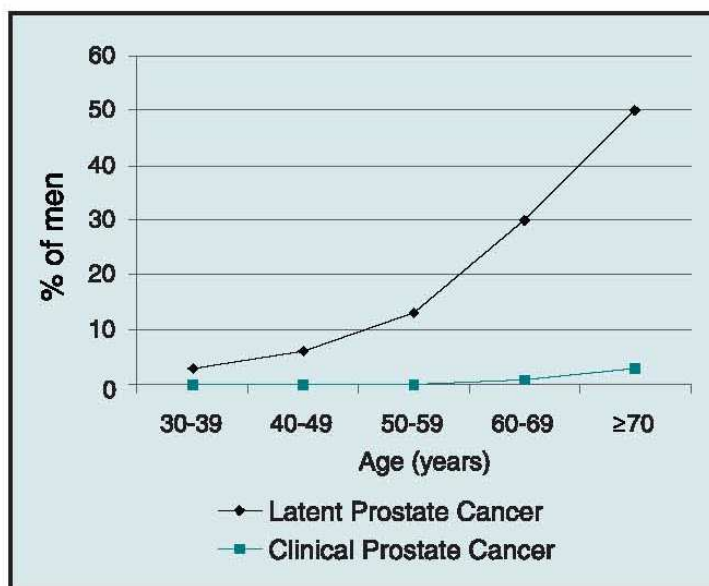
1.1.2 Παράγοντες Κινδύνου

Αν και τα δεδομένα δεν έχουν απόλυτη συνοχή, επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει έναν αριθμό αναγνωρισμένων και πιθανών παραγόντων κινδύνου για τον καρκίνο προστάτη.

Ηλικία

Ο καρκίνος του προστάτη έχει μια από τις ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ ηλικίας και κακοήθειας στον άνθρωπο, και είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επίδρασης στην ανάπτυξη της νόσου. Κλινική εμφάνιση της νόσου είναι σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών, ενώ η επίπτωση αυξάνει σημαντικά μετά την ηλικία των 60 ετών.

Η παρουσία μικροσκοπικού (occult) καρκίνου προστάτη αυξάνει σημαντικά με την ηλικία, όπως καταδεικνύεται από την αναδρομική ανάλυση μελετών σε υλικό νεκροψίας από διάφορες χώρες (*Εικόνα 1.5*).



Εικόνα 1.5. Επίπτωση καρκίνου προστάτη και ηλικία: σύγκριση κλινικώς διαγνωσμένων καρκίνων και ευρημάτων νεκροψίας (Πηγή: *Delongchamps et al, 2006*)

Φυλή

Υπάρχουν έντονες γεωγραφικές και φυλετικές διαφορές στην επίπτωση του κλινικού καρκίνου προστάτη. Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος στην Βόρεια Αμερική και στην Δυτική Ευρώπη, και χαμηλότερος στην Άπω Ανατολή. Στις Η.Π.Α., ο κίνδυνος είναι υψηλότερος για τους μαύρους συγκριτικά με τους λευκούς, με εμφάνιση της νόσου σε νεαρότερες ηλικίες στους πρώτους. Οι Κινέζικες και Ιαπωνικές φυλές έχουν την χαμηλότερη επίπτωση της νόσου. Η επίπτωση της υποκλινικής νόσου, όμως, είναι παρόμοια σε όλους τους πληθυσμούς. Σε πληθυσμιακές μελέτες, η συχνότητα της νόσου σε πληθυσμούς που μετανάστευσαν από περιοχές χαμηλής σε περιοχές υψηλής επίπτωσης αυξάνει εντός δύο γενεών. Αυτό υποδεικνύει ότι περιβαλλοντικές επιδράσεις όπως διατροφή μπορεί να έχουν σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη της νόσου, ή στην πρόοδο του ιστολογικού καρκίνου σε κλινικά ανιχνεύσιμο καρκίνο προστάτη (*Kirby & Patel, 2008*).

Κληρονομικότητα

Περίπου 9% όλων των περιστατικών καρκίνου προστάτη έχουν κληρονομική βάση. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνει κατά 2.5 φορές εάν υπάρχει πρώτου-βαθμού συγγενής με καρκίνο προστάτη. Μεγαλύτερος αριθμός συγγενών με νόσο αυξάνει περαιτέρω τον κίνδυνο. Δύο ή τρεις συγγενείς πρώτου βαθμού αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης κατά 5 και 11 φορές αντίστοιχα. Εμφάνιση καρκίνου προστάτη σε μικρή ηλικία επίσης αυξάνει τον κίνδυνο (*Steinberg et al, 1990*).

Ένας αριθμός γονιδίων έχει συσχετιστεί με κληρονομικότητα της νόσου. Αυτά, καθώς και η αλληλεπίδραση γονιδιακών παραγόντων και περιβάλλοντος αναφορικά με την εμφάνιση της νόσου θα αναλυθούν παρακάτω.

Ορμόνες

Η τεστοστερόνη και ο πιο δραστικός της μεταβολίτης διυδροτεστοστερόνη (dihydrotestosterone, DHT) είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη, και επομένως μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου προστάτη. Ο καρκίνος προστάτη δεν αναπτύσσεται ποτέ σε άτομα που έχουν ευνοηστεί πριν την εφηβεία, ή σε άτομα με έλλειψη 5 α -αναγωγάσης (το ένζυμο που μετατρέπει την τεστοστερόνη σε DHT) (*Ross et al, 1992*). Σε μια μελέτη αναστολής της τύπου II 5 α -αναγωγάσης με φιναστερίδη έδειξε μια μείωση στην ανάπτυξη καρκίνου προστάτη κατά περίπου 25%, συνοδευόμενη όμως από μια –αμφιλεγόμενη– αύξηση στην συχνότητα καρκίνου προστάτη υψηλής κακοήθειας (*Thompson et al, 2003, Redman et al, 2008*).

Παχυσαρκία

Η σχέση μεταξύ δείκτη μάζας σώματος και επίπτωσης καρκίνου προστάτη είναι αμφιλεγόμενη. Πρώιμες μελέτες έδειξαν αυξημένο κίνδυνο σε παχύσαρκους άντρες, ενώ νεώτερες μελέτες έδειξαν το αντίθετο (*Porter and Stanford, 2005*). Το τελευταίο μπορεί να έχει σχέση με το γεγονός ότι οι παχύσαρκοι άντρες έχουν χαμηλότερα επίπεδα PSA και ανδρογόνων, άρα διαγιγνώσκονται σε μικρότερο ποσοστό με καρκίνο του προστάτη στην σημερινή εποχή του PSA. Όμως,

υπάρχει ένα ξεκάθαρα αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας σε παχύσαρκους άντρες με καρκίνο προστάτη, το οποίο μπορεί να έχει σχέση με ενεργοποίηση της προκαρκινικής δράσης της οδού του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης (insulin growth factor, IGF) (*Kirby & Patel, 2008*).

Δίαιτα

Έχει προταθεί σχέση μεταξύ αυξημένης κατανάλωσης κρέατος και κεκορεσμένων λιπαρών, στοιχείων της διατροφής των δυτικών κοινωνιών, και ανάπτυξης καρκίνου προστάτη. Επίσης υπάρχει ένδειξη ότι το α -λινολεϊκό οξύ μπορεί να συσχετίζεται με κίνδυνο ανάπτυξης προχωρημένου καρκίνου προστάτη, που μπορεί να έχει σχέση με αυξημένο οξειδωτικό στρες και επαγόμενη βλάβη DNA, ή με την ανάπτυξη παχυσαρκίας (*Kirby & Patel, 2008*). Αντίθετα, τα ωμέγα-3 λιπαρά συσχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου προστάτη (*Aronson et al, 2010*).

Μελέτες παρατήρησης και μια προκαταρκτική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη (Nutritional Prevention of Cancer, NPC) υπέδειξαν ότι αυξημένη πρόσληψη σεληνίου συσχετίζεται με κατά 63% μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου προστάτη (*Duffield-Lillico et al, 2003*). Αντίστοιχα, η μελέτη ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study) κατέδειξε μείωση κατά 32% του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου προστάτη με χορήγηση α -τοκοφερόλης (ή βιταμίνης E) (*Heinonen et al, 1998*). Όμως, η αξία του σεληνίου και της Βιταμίνης E ως χημειοπροστατευτική προσέγγιση δεν επιβεβαιώθηκε στην

μελέτη SELECT, η οποία διακόπηκε πρόωρα λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας (*Scott et al, 2009*).

Έκθεση στον ήλιο και βιταμίνη D

Η θνησιμότητα από τον καρκίνο του προστάτη είναι αυξημένη σε περιοχές με γεωγραφικές περιοχές με αυξημένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, και έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D, η σύνθεση της οποίας έχει σχέση με έκθεση στον ήλιο, είναι χαμηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη από ότι στον γενικό πληθυσμό. Όμως πρόσφατες μελέτες δεν κατέδειξαν μείωση του κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου προστάτη μετά από χημειοπροφύλαξη με χορήγηση βιταμίνης D (*Park et al, 2010*).

1.1.3 Διάγνωση και σταδιοποίηση

Η κλινικά εντοπισμένη νόσος είναι συνήθως ασυμπτωματική, ή ο ασθενής παρουσιάζεται με συμπτωματολογία καλοήθους προστατικής υπερτροφίας (benign prostate hyperplasia, BPH), όπως συχνουρία, αίσθημα έπειξης, δυσκολία στην έναρξη της ούρησης κ.λ.π. Η διάγνωση γίνεται συνήθως λόγω αυξημένων επιπέδων PSA ορού, το οποίο οδηγεί σε βιοψία, συνήθως διορθικά υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση (transrectal ultrasound-guided biopsy; TRUS biopsy). Συχνά επίσης είναι τυχαίο εύρημα μετά από διουρηθρική εκτομή προστάτη (transurethral resection of the prostate, TURP) για συμπτώματα BPH.

Η διάγνωση της ασυμπτωματικής νόσου με αυξημένα επίπεδα PSA και η κλινική απόφαση για λήψη βιοψίας υποβοηθάται από τα κλινικά ευρήματα της δακτυλικής εξέτασης (digital rectal examination, DRE), αλλά και από παράγωγους δείκτες σχετικούς με το PSA, όπως η ταχύτητα PSA, η πυκνότητα PSA, ο δείκτης ελεύθερου προς συνδεδεμένου PSA, καθώς και ειδικά νορμογράμματα ηλικίας (*Benson et al, 1992a; Benson et al, 1992b; Nixon & Brawer, 1997; Catalona et al, 1998; Catalona et al, 2000; Berger et al, 2007*).

Η κλινική παρουσίαση της τοπικά προχωρημένης νόσου μπορεί να είναι με συμπτώματα αιματουρίας, δυσουρίας, περινεϊκό και υπερηβικό άλγος, ακράτεια, στυτική δυσλειτουργία, ουρητηρική απόφραξη (με ανουρία), συμπτώματα νεφρικής ανεπάρκειας, αιμοσπερμία και συμπτώματα από το ορθό, όπως τεινεσμός.

Συνολικά, η διάγνωση και σταδιοποίηση της τοπικής και τοπικά προχωρημένης νόσου γίνεται με τις παρακάτω μεθόδους:

- Δακτυλική εξέταση
- Μέτρηση PSA και σχετικών δεικτών
- Διορθικό υπερηχογράφημα και βιοψία (με Gleason score)
- Απεικόνιση με αξονική τομογραφία ή/και μαγνητική τομογραφία
- Χρήση νορμογραμμάτων για την σταδιοποίηση και την πρόγνωση

Η κλινική παρουσίαση της μεταστατικής νόσου είναι συχνά με συμπτώματα οστικού άλγους, λεμφαδενικής διόγκωσης, πνευλικού άλγους ή ανουρίας λόγω απόφραξης ουρητήρων από λεμφαδενικά μπλοκ. Σε προχωρημένες καταστάσεις

μπορεί να εμφανιστεί έντονη απώλεια βάρους και καχεξία, παραπληγία λόγω συμπίεσης νωτιαίου μυελού ή λήθαργος (λόγω αναιμίας και ουραιμίας).

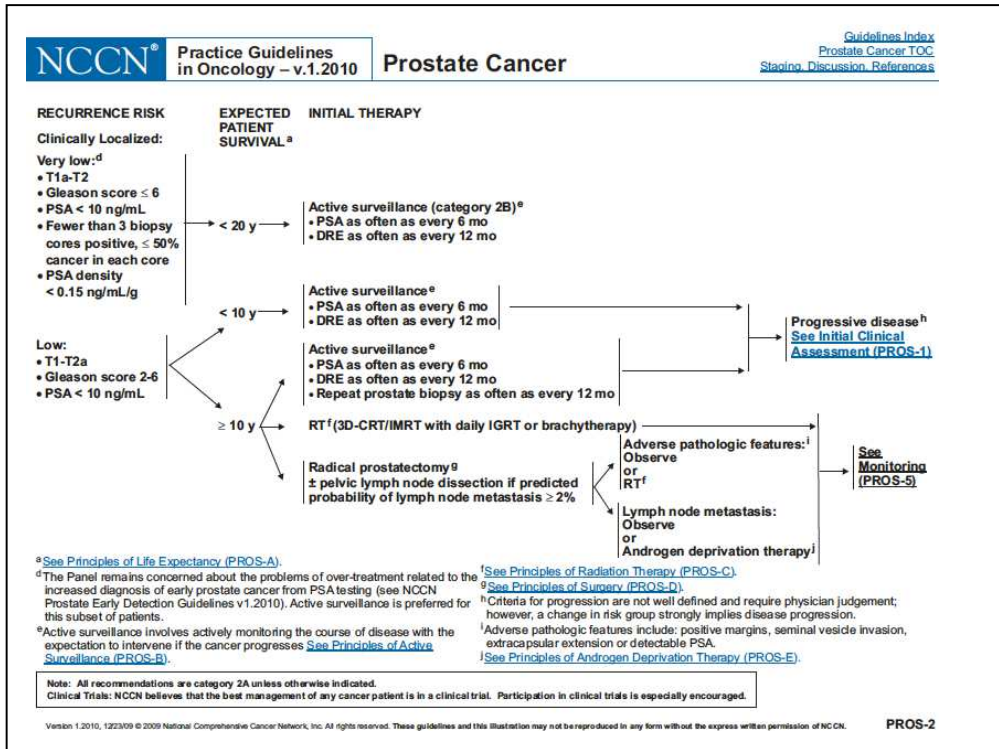
Για την σταδιοποίηση της μεταστατικής νόσου, εκτός από αυτά που αναφέρθηκαν για την εντοπισμένη και τοπικά προχωρημένη νόσο, χρησιμοποιούνται και τα παρακάτω:

- Σπινθηρογράφημα οστών
- Αξονική τομογραφία άνω & κάτω κοιλίας/οπισθοπεριτοναίου (ή μαγνητική τομογραφία)
- Αξονική τομογραφία θώρακος (ή απλή ακτινογραφία θώρακος, ανάλογα με τις κλινικές ενδείξεις) (*Kirby & Patel, 2008*).

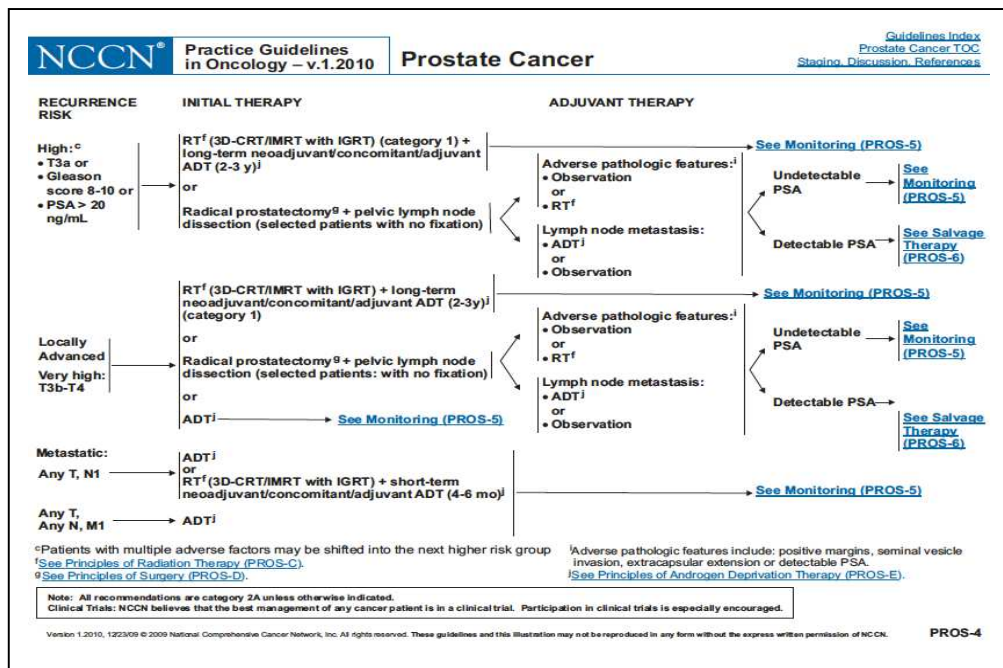
1.1.4 Θεραπεία και πρόγνωση

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, με βάση της συστάσεις του National Comprehensive Cancer Network (*Mohler et al, 2010*) εξαρτάται από τον κίνδυνο υποτροπής. Για τους ασθενείς με κλινικά εντοπισμένη νόσο πολύ χαμηλού κινδύνου υποτροπής και προσδόκιμο επιβίωσης <20 έτη, καθώς και για τους ασθενείς με νόσο χαμηλού κινδύνου υποτροπής και προσδόκιμο επιβίωσης <10 έτη, οι πολύ πρόσφατες κλινικές οδηγίες του NCCN συστήνουν ενεργό παρακολούθηση με τακτικό έλεγχο PSA και DRE (*Εικόνα 1.6*). Για νόσο υψηλότερου κινδύνου υποτροπής οι θεραπευτικές επιλογές είναι κυρίως η ριζική προστατεκτομή (με ή χωρίς πυελικό λεμφαδενικό καθαρισμό) και ακτινοθεραπεία/βραχυθεραπεία. Για νόσο υψηλού κινδύνου υποτροπής ή

προχωρημένη/μεταστατική ο θεραπευτικός σχεδιασμός βασίζεται στην ορμονοθεραπεία (θεραπεία στήρησης ανδρογόνων; androgen deprivation therapy, ADT) (Εικόνα 1.7).



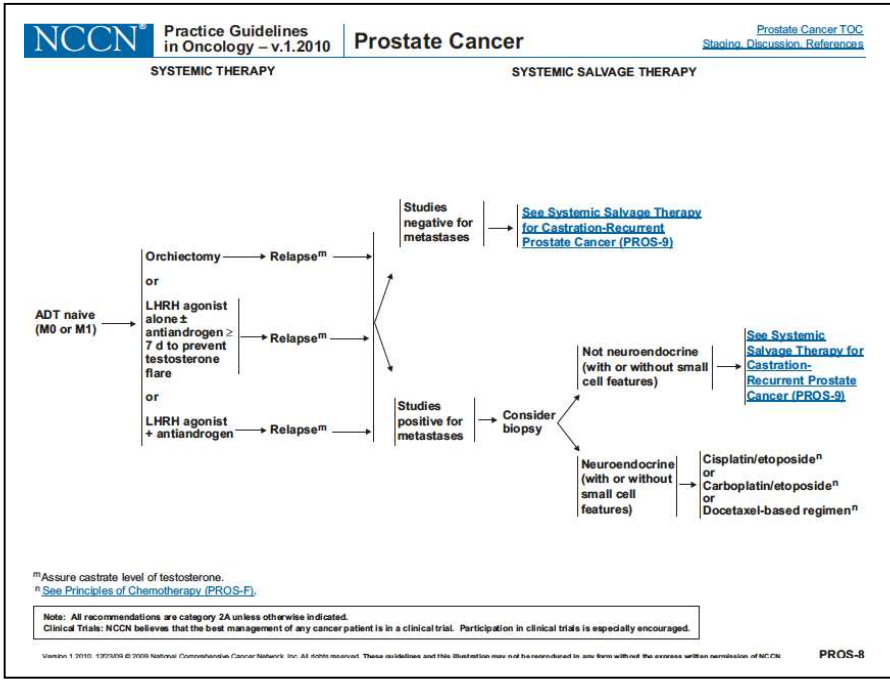
Εικόνα 1.6. Αντιμετώπιση κλινικώς εντοπισμένου καρκίνου προστάτη πολύ χαμηλού και χαμηλού κινδύνου υποτροπής (Πηγή: NCCN Prostate Cancer Guidelines v. 1.2010)



Εικόνα 1.7. Αντιμετώπιση κλινικώς εντοπισμένου καρκίνου προστάτη υψηλού κινδύνου υποτροπής και τοπικά προχωρημένης νόσου (Πηγή: *NCCN Prostate Cancer Guidelines v.1.2010*)

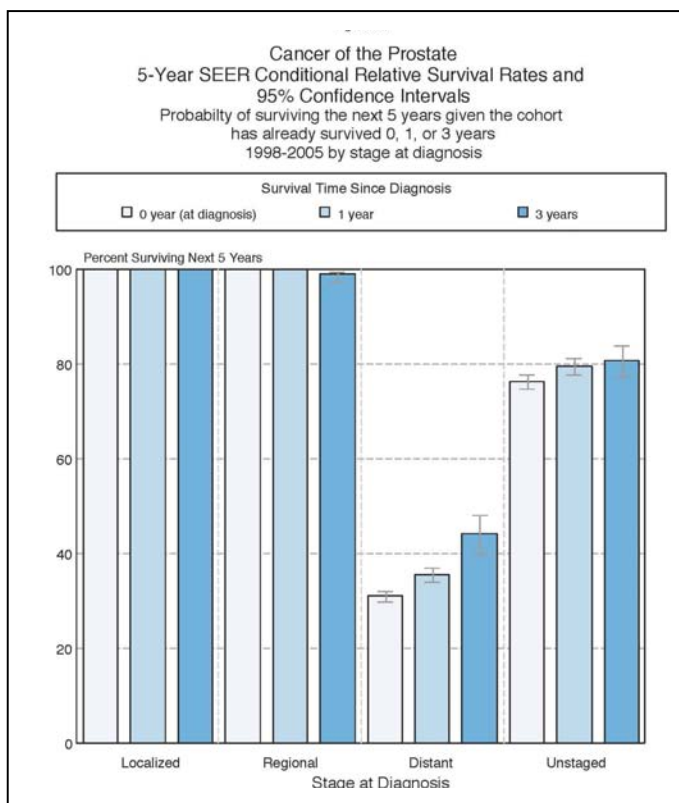
Σε ασθενείς με βιοχημική

πρόοδο νόσου ή ασυμπτωματικούς μεταστατικούς ασθενείς με αργή εξέλιξη νόσου (συνήθως οστικές μεταστάσεις μόνο) έχει νόημα η χρησιμοποίηση δεύτερης γραμμής ορμονικών χειρισμών (π.χ. αντι-ανδρογόνα [AAs], εστραμουστίνη, οιστρογόνα, προγεστερόνες, γλυκοκορτικοειδή, κετοκοναζόλη), ή άλλων φαρμακευτικών αγωγών στα πλαίσια κλινικών μελετών (π.χ. ο αναστολέας του κυτοχρώματος CYP17 abiraterone, που αναστέλει την παραγωγή τεστοστερόνης σε όρχεις, επινεφρίδια και προστάτη) Σε ορμονοάντοχη νόσο και/ή συμπτωματικούς ασθενείς με γρήγορη εξέλιξη νόσου έχει ένδειξη η χημειοθεραπεία (*Εικόνα 1.8*).



Εικόνα 1.8. Συστηματική θεραπεία στον καρκίνο προστάτη (Πηγή: *NCCN Prostate Cancer Guidelines v.1.2010*)

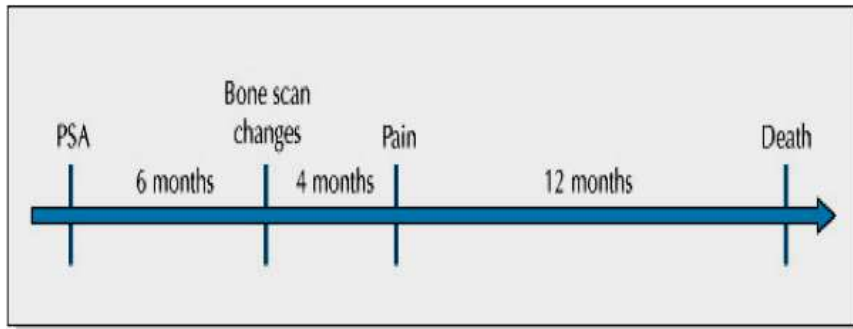
Η πρόγνωση της νόσου έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της ευρείας εφαρμογής του ελέγχου PSA που βοήθησε στην διάγνωση της νόσου σε πρωιμότερα στάδια. Έτσι, σήμερα η πενταετής επιβίωση της εντοπισμένης και τοπικά προχωρημένης νόσου στις δυτικές κοινωνίες είναι έως και 100%. Όμως, παρά την πρόοδο της συστηματικής θεραπείας, η πρόγνωση της προχωρημένης και μεταστατικής νόσου εξακολουθεί να είναι δυσμενής (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Πενταετής Επιβίωση Καρκίνου Προστάτη στις Η.Π.Α. για την περίοδο 1998-2005 (SEER Program Joinpoint Analyses)

Στην πράξη, η φυσική ιστορία της ορμονο-άντοχης νόσου είναι ιδιαίτερα ραγδαίας εξέλιξης, ιδιαίτερως σε σύγκριση με την ορμονο-εξαρτώμενη νόσο, και για αυτόν ακριβώς τον λόγο είναι σημείο εστίασης της έρευνας γύρω από τον καρκίνο του προστάτη, τόσο της μεταφραστικής και κλινικά εφαρμοσμένης, όσο

και της έρευνας των βασικών μηχανισμών μοριακής και κυτταρικής βιολογίας που εμπλέκονται στην ορμονο-αντοχή (*Εικόνα 1.10*).



Εικόνα 1.10. Φυσική εξέλιξη ορμονο-άντοχου καρκίνου προστάτη

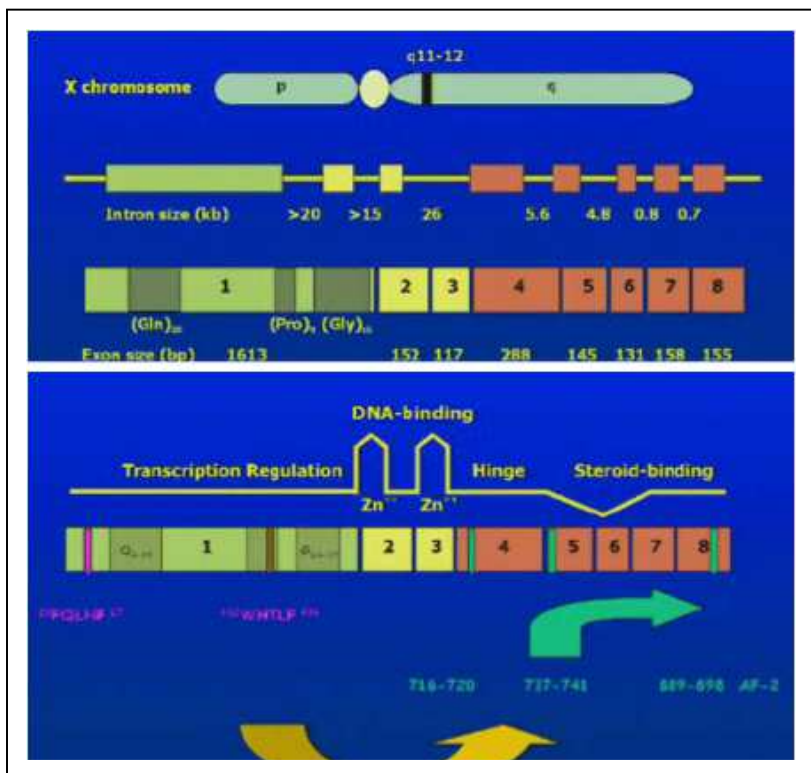
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΡΟΣΤΑΤΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

1.2.1 Ο ανδρογονικός υποδοχέας

Ο ανδρογονικός υποδοχέας (androgen receptor, AR) βρίσκεται στο κέντρο της βιολογίας του καρκίνου του προστάτη. Είναι μέλος της υπερ-οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από τους ειδικούς προσδέτες τους (τα ανδρογόνα), καθορίζοντας την συζουαλική διαφοροποίηση του άρρενος φύλου ενδομητρίως, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών φύλου και την παραγωγή σπέρματος στην εφηβεία, την σνάοοτυξη του προστάτη αδένα στον ενήλικο, και την πρωτογενή κυτταρική αύξηση στον καρκίνο προστάτη (*Brinkmann & Trapman, 2000*). Τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον AR περιέχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες

στις ρυθμιστικές περιοχές τους (εκκινητής/ενισχυτής) που αναγνωρίζονται από τον AR και ονομάζονται AREs (androgen-response elements). Το πιο γνωστό γονίδιο-στόχος του AR είναι το PSA, το οποίο περιέχει τέτοια AREs (*Shang et al, 2002*).

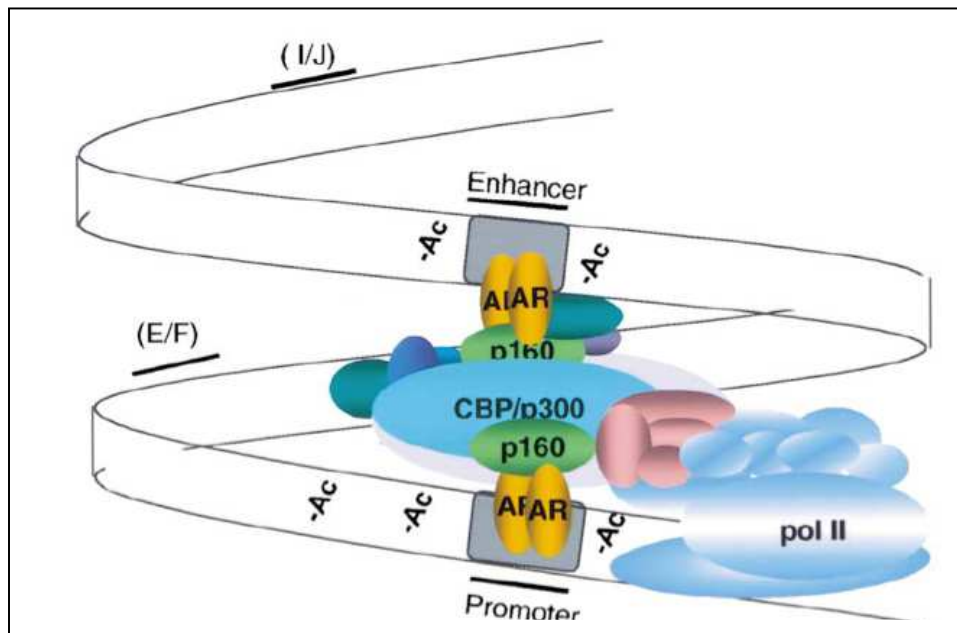
Το γονίδιο του AR περιέχει μια κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD), μια περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη στο καρβοξυλικό άκρο (Ligand-binding domain, LBD), και δύο δυνητικές περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-1 και AF-2). Η δομή του γονιδίου του AR φαίνεται στην *Εικόνα 1.11*.



Εικόνα 1.11.
Δομή γονιδίου AR

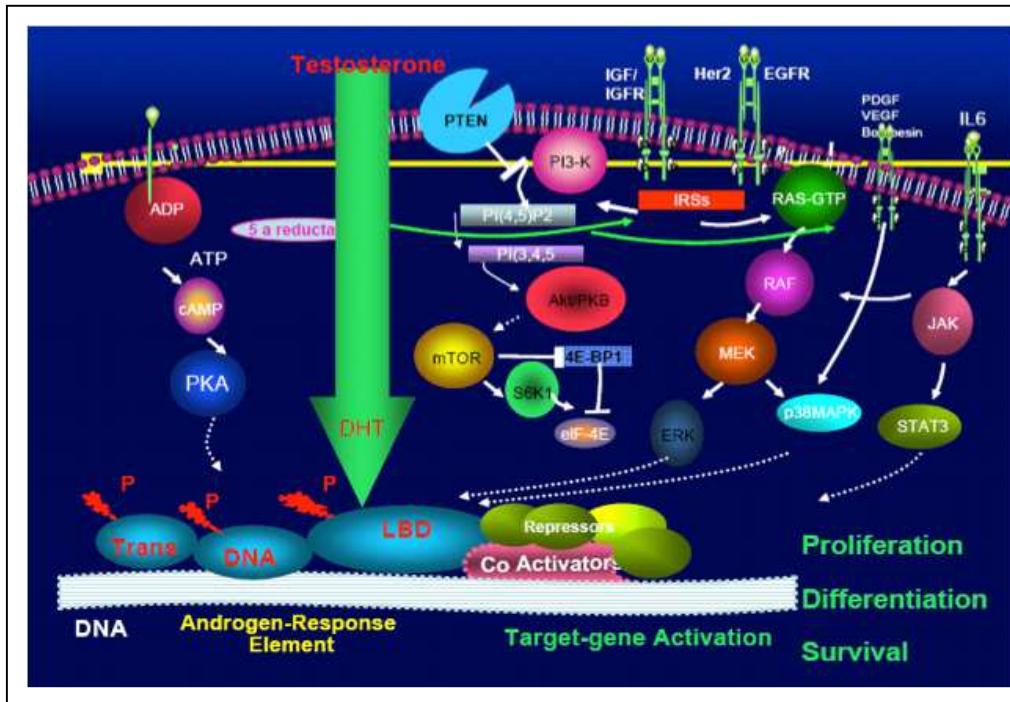
Ρύθμιση της φωσφορυλίωσης του AR επηρεάζει την σύνδεση με τους προσδέτες και εοπμένως την ρυθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων (*Guo et al,*

2006). Η σύνδεση με τα ανδρογόνα προκαλεί δομική τροποποίηση του υποδοχέα, συνοδευόμενη από περαιτέρω φωσφορυλίωση του AR. Το σύμπλοκο AR-προσδέτη αλληλεπιδρά με AREs στα γονίδια-στόχος του AR, και επάγει την μεταγραφή τους (Brinkmann et al, 1999). Το μεταγραφικό σύμπλοκο περιέχει επίσης συν-ενεργοποιητές (p160, CPB, p300) και RNA πολυμεράσες, ενώ η μεταγραφή σταματάει με την πρόσδεση στο σύμπλοκο σχετικών καταστολέων (Shang et al, 2002) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Μεταγραφικό σύμπλοκο AR

Πέρα από την ενεργοποίηση του από τα ανδρογόνα, ο AR αλληλεπιδρά με άλλες σηματοδοτικές οδούς μέσω δευτέρων αγγελιοφόρων, όπως η οδός EGFR (μέσω Ras/Raf/MEK), PTEN (μέσω PI3K/Akt) κ.λ.π. (Εικόνα 1.13), ρυθμίζοντας έτσι οδούς που έχουν σχέση με κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και επιβίωση.



Εικόνα 1.13. Σηματοδοτική οδός AR

1.2.2 Κληρονομούμενος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου προστάτη

Μελέτες ανάλυσης του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος (genome-wide association studies, GWA studies) έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση ενός αριθμού πολυμορφισμών μισς βάσης (single nucleotide polymorphisms, SNPs) που συσχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη. Μια περιοχή ~1Mb στο χρωμόσωμα 8q24 έχει βρεθεί ότι εμπεριέχει τέτοια SNPs, τα οποία φαίνεται να προσδίδουν 25% με 50% κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη. Η περιοχή αυτή είναι κοντά στη θέση του ογκογονιδίου *MYC*, αλλά τα SNPs αυτά δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του *MYC*. Επιπλέον, υπάρχουν δύο περιοχές στα χρωμοσώματα 17q και 10q που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως η β-

μικροσεμινοπρωτεΐνη, που επίσης συσχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης PC. Τέλος, από τις σημαντικότερες κληρονομούμενες βλάβες είναι αδρανοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *RNASEL*, γονίδιο που εμπλέκεται στον αντι-ϊική άμυνα, προωθεί απόπτωση και αναστέλει την σηματοδοτική οδό των ανδρογόνων (Schultz & Hoffmann, 2009; Witte, 2009) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Κληρονομούμενοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί και καρκίνος προστάτη (από Witte, 2009)

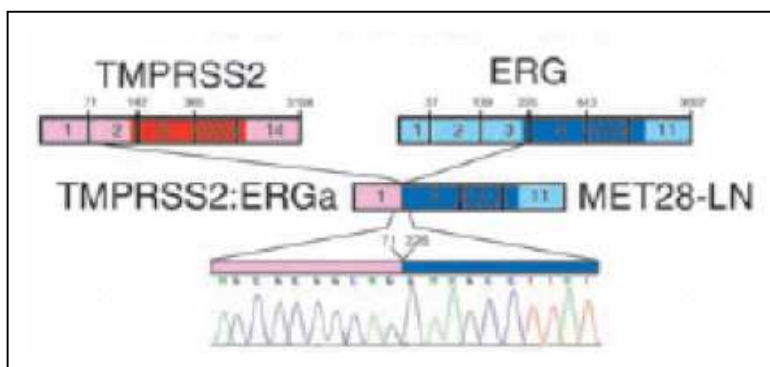
Locus			Frequency of risk allele (+) ^{a,b}		Association ^c		Nearby genes and potential function
Chromosomal Region	SNP	Allele (- / +)	Controls	Cases	Odds ratio ^d	p value	
2p15	rs721048	G/A	0.19	0.21	1.15	7.7×10^{-4}	<i>EHBP1</i> : endocytic trafficking
3p12 ^{ll}	rs2660753	C/T	0.10	0.12	1.30	2.7×10^{-4}	Intergenic
6q25	rs9364554	C/T	0.29	0.33	1.21	5.5×10^{-10}	<i>SLC22A3</i> : elimination of drugs and toxins
7q21	rs6465657	T/C	0.46	0.50	1.19	1.1×10^{-9}	<i>LMTK2</i> : endosomal membrane trafficking
8q24 (region 2)	rs16901979	C/A	0.04	0.06	1.52	1.1×10^{-12}	Intergenic
8q24 (region 3)	rs6983267	T/G	0.50	0.56	1.25	9.4×10^{-13}	Intergenic
8q24 (region 1)	rs1447295	C/A	0.10	0.14	1.42	6.4×10^{-18}	Intergenic (the oncogene <i>MYC</i> is 200 kb downstream)
10q11	rs10993994	C/T	0.38	0.46	1.38	8.7×10^{-18}	<i>MSMB</i> : tumour suppressor properties
10q26	rs4962416	T/C	0.27	0.32	1.18	2.7×10^{-4}	<i>CTBP2</i> : antiapoptotic activity
11q13	rs7931342	T/G	0.51	0.56	1.21	1.7×10^{-11}	Intergenic
17q12	rs4430796	G/A	0.49	0.55	1.22	1.4×10^{-11}	<i>HNF1B</i> : tumour suppressor properties, epithelial differentiation
17q24	rs1859962	T/G	0.46	0.51	1.20	2.5×10^{-10}	Intergenic
19q13	rs2735839	A/G	0.83	0.87	1.37	1.5×10^{-18}	<i>KLK2</i> and <i>KLK3</i> : serine protease that affects PSA concentrations, androgenic
Xp11	rs5945619	T/C	0.36	0.41	1.29	1.5×10^{-9}	<i>NUDT10</i> and <i>NUDT11</i> : apoptosis, DNA repair, stress response

1.2.3 Επίκτητοι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί

1.2.3.1 Η αντιμετάθεση TMPRSS2:ETS

Μια από τις πιο σημαντικές γενετικές βλάβες που εμπλέκονται στον καρκίνο προστάτη είναι η αντιμετάθεση TMPRSS2:ETS. Το γονίδιο TMPRSS2 (21q22.2) κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης, που είναι γονίδιο στόχος του AR, και έχει σημαντική έκφραση στον φυσιολογικό προστάτη. Η οικογένεια ETS

είναι οικογένεια μεταγραφικών ρυθμιστών, οι οποίοι έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται στον καρκίνο προστάτη. Σε αυτούς ανήκουν τα γονίδια *ERG* (21q22.3), *ETV1* (7p21.2), *ETV4* (17q21) και *ETV5* (3q27). Ο εκκινητής του *TMPRSS2* έχει βρεθεί ότι αντιμετατίθεται και συνέχεται με κάποιο μέλος της οικογένειας *ETS*, και επομένως ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας βρίσκεται πλέον υπό την καθοδήγηση του AR. Σε πάνω από 90% των αντιμεταθέσεων εμπλέκεται το γονίδιο *ERG*, ενώ η πιο συχνή βλάβη είναι η απώλεια ενός τμήματος του 5'-*ERG* (1Edel) (60%-90% των περιπτώσεων, ιδιαίτερα σε μεταστατικούς όγκους) (Εικόνα 1.14). Η συχνότητα την αντιμετάθεσης αυξάνει με τη εξέλιξη σε προκαρκινικές και καρκινικές καταστάσεις: 0% σε φυσιολογικό ιστό, 2.4% σε BPH, 20% σε υψηλού βαθμού προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (HG-PIN), 50% σε εντοπισμένο καρκίνο προστάτη και 80%-90% στον μεταστατικό καρκίνο. Ως εκ τούτου, φαίνεται να αποτελεί μια γονιδιακή υπογραφή επιθετικού φαινοτύπου (Tomlins et al, 2005).



Εικόνα 1.14.
Αντιμετάθεση
TMPRSS2:ERG

1.2.3.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί

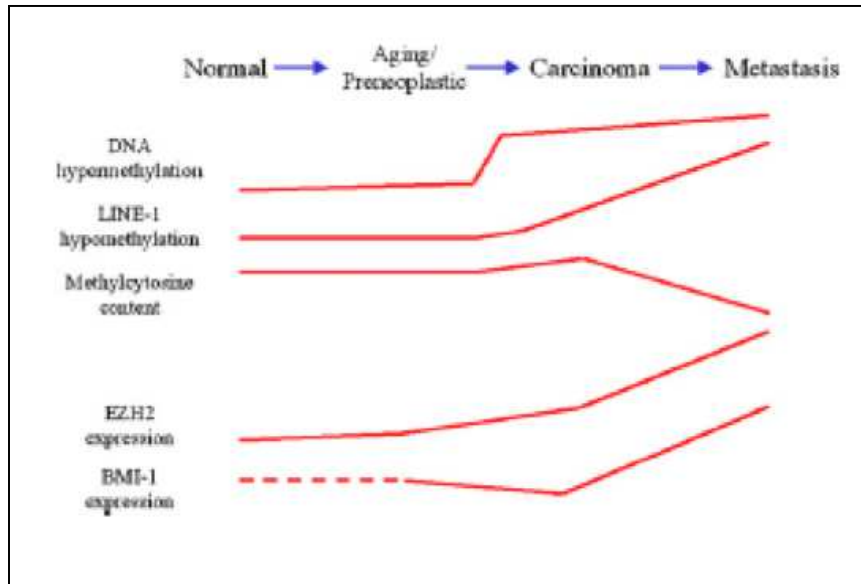
Από τους πιο σημαντικούς επιγενετικούς μηχανισμούς είναι η υπερμεθυλίωση του DNA, η οποία είναι πρώιμο γεγονός που προδιαθέτει σε καρκινογένεση.

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 50 γονίδια που υπερμεθυλιώνονται στον καρκίνο προστάτη. Παραδείγματα είναι το *GSTP1* (glutathione S transferase Pi) που είναι υπερμεθυλιωμένο σε 75%-95% της HG-PIN, και το *APC*, του οποίου η μεθυλίωση αυξάνει κατά την εξέλιξη από BPH σε HG-PIN, και συσχετίζεται με στάδιο και πρόγνωση της νόσου. Είναι όμως ετερογενές φαινόμενο. Για παράδειγμα, ο εκκινητής του γονιδίου *RASSF1A* (Ras association domain family member 1) είναι συχνά ετερογενώς υπερμεθυλιωμένος σε καλοήθεις περιοχές αδένων προστάτη που φέρουν καρκινώματα συγκριτικά με την πυκνή υπερμεθυλίωση των περιοχών με το καρκίνωμα ([Schultz & Hoffmann, 2009](#)).

Μια άλλη επιγενετική τροποποίηση που συμβαίνει αργότερα και συσχετίζεται με εξέλιξη της νόσου και μετάσταση είναι η υπομεθυλίωση του DNA, που είναι «καθολική» (π.χ. υπομεθυλίωση των στοιχείων LINE-1 retrotransposons) και όχι ειδική για συγκεκριμένες γονιδιακές θέσεις, όπως είναι η υπερμεθυλίωση. Συνήθως ενέχει απώλεια μεθυλκυτοσίνης, και οδηγεί σε απώλεια του μεθυλιωτικού προφίλ που φυσιολογικά καταστέλλει την έκφραση κάποιων γονιδίων (imprinting), και έτσι οδηγεί σε υπερέκφραση γονιδίων όπως το IGF2 ([Schultz & Hoffmann, 2009](#)).

Τέλος, άλλοι επιγενετικοί μηχανισμοί αφορούν τροποποιήσεις χρωματίνης που συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και ορμονο-αντοχή (π.χ. υπερέκφραση HDAC1 που συνυπάρχει συχνά με την αντιμετάθεση TMPRSS2:ERG), και αλλαγές στην δομή των συμπλόκων PcG (polycomb complexes), που επίσης συσχετίζονται με προχωρημένη νόσο ([Schultz & Hoffmann, 2009](#)).

Ένα συνολικό γράφημα που παρουσιάζει τους επιγενετικούς μηχανισμούς στον καρκίνο προστάτη φαίνεται στην [Εικόνα 1.15](#).



Εικόνα 1.15.
Επιγενετικοί μηχανισμοί στον καρκίνο προστάτη (από Schultz & Hoffmann, 2009)

1.2.3.3 Ανώμαλη ενεργοποίηση AR

Μια πολύ σημαντική ανακάλυψη ήταν ότι η πρόοδος προς ορμονο-αντοχή είναι εξαρτώμενη από τον υποδοχέα AR. Η ομάδα του Chen και συνεργατών έδειξαν ότι ο κοινός παρονομαστής της ορμονο-αντοχής σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα PC είναι η υπερέκφραση του AR ([Chen et al, 2004](#)). Αυτή η υπερέκφραση οδηγεί σε υπερευασθησία στην παρουσία των ανδρογόνων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, αυτή η υπερέκφραση είναι ικανή να τροποποιήσει την δράση των αντι-ανδρογόνων (π.χ. βικαλουταμίδη) και να τους μετατρέψει σε αγωνιστές του AR. Τέλος, η υπερέκφραση AR επιφέρει κυτταρική αύξηση ακόμη και σε απουσία ανδρογόνων ([Chen et al, 2004](#)). Με αυτόν τον τρόπο, ο AR

φαίνεται να αποκτά δράση ογκογονιδίου προωθώντας την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στα προχωρημένα στάδια PC.

Η ανώμαλη αυτή ενεργοποίηση του AR γίνεται με τους παρακάτω μηχανισμούς (*Linja et al, 2001; Sun et al, 2003; Yoshida et al, 2005; Guo et al, 2006; Mahajan et al, 2007; Mackinnon et al, 2009*):

- Πολλαπλασιασμός του γονιδίου AR: 20% σε ορμονο-ανθεκτικούς όγκους, 2% σε ορμονο-ευαίσθητους όγκους
- Μεταλλάξεις του γονιδίου AR: αυτές προκαλούνται από την χρήση AAs και είναι ειδικοί για αυτά, π.χ. φλουταμίδη/T877A, βικαλουταμίδη/W741C. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις αυτές αυξάνουν την ευαισθησία του AR στις στεροειδείς ορμόνες.
- Φωσφορυλίωση του AR: π.χ. η τυροσίνη στη θέση 534 είναι στόχος φωσφορυλίωσης από το SRC (οδός PI3K/Akt). Η φωσφορυλίωση αυτή αυξάνει στην ορμονο-άντοχη νόσο, και ενεργοποιεί τον AR, ο οποίος αναδραστικά είναι ικανός να αυξήσει την ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt μέσω SRC
- Ενεργοποίηση των συν-ρυθμιστών του AR: π.χ. αύξηση του TIF2, το οποίο οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του AR σε χαμηλά ανδρογονικά επίπεδα

1.2.3.4 Άλλοι μηχανισμοί

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο AR αλληλεπιδρά με άλλες σηματοδοτικές οδούς στον έλεγχο της φυσιολογικής λειτουργίας του προστάτη αδένου.

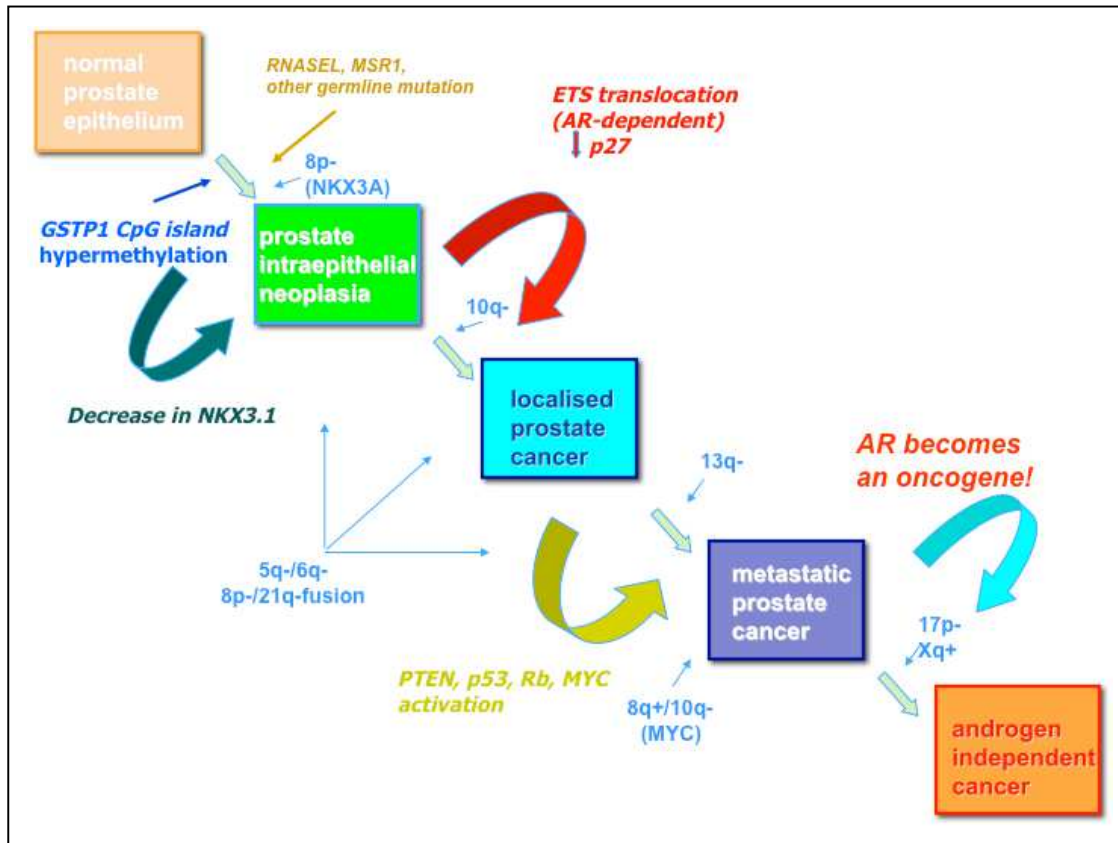
Αντίστοιχα, απορύθμιση της λειτουργίας αυτών των οδών παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου προστάτη και την πορεία προς την ορμονο-άντοχη νόσο (*Mackinnon et al, 2009*):

- Αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων στεροειδικής βιοσύνθεσης: με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα PC παράγουν μόνο τους ανδρογόνα για την αύξηση τους
- Απώλεια του γονιδίου PTEN: αυτό φυσιολογικά καταστέλλει την σηματοδοτική οδό Akt, και απώλεια του οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού αυτής
- Ενεργοποίηση ογκογονιδίου MYC και άλλων ογκογονιδίων, ή καταστολή ογκο-προστατευτικών γονιδίων, π.χ. p53
- Υπερέκφραση/πολλαπλασιασμός του γονιδίου Her2/Neu: είναι συχνό εύρημα στην ορμονο-άντοχη νόσο, και οδηγεί στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του AR μέσω MAPK
- Υπερέκφραση TWIST: αυτός είναι ένας εξελικτικά διατηρημένος μεταγραφικός παράγοντας. Έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στο 90% του PC, ενώ μόνο στο 6-7% της BPH, και η έκφραση του συσχετίζεται με το Gleason score και την εμφάνιση μετάστασης

1.2.4 Μοντέλο Καρκινογένεσης

Λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα από όλους τους μοριακούς μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορεί να δημιουργηθεί ένα συνολικό μοντέλο

καρκινογένεσης και προοδευτικής εξέλιξης για τον καρκίνο προστάτη, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 1.16*:

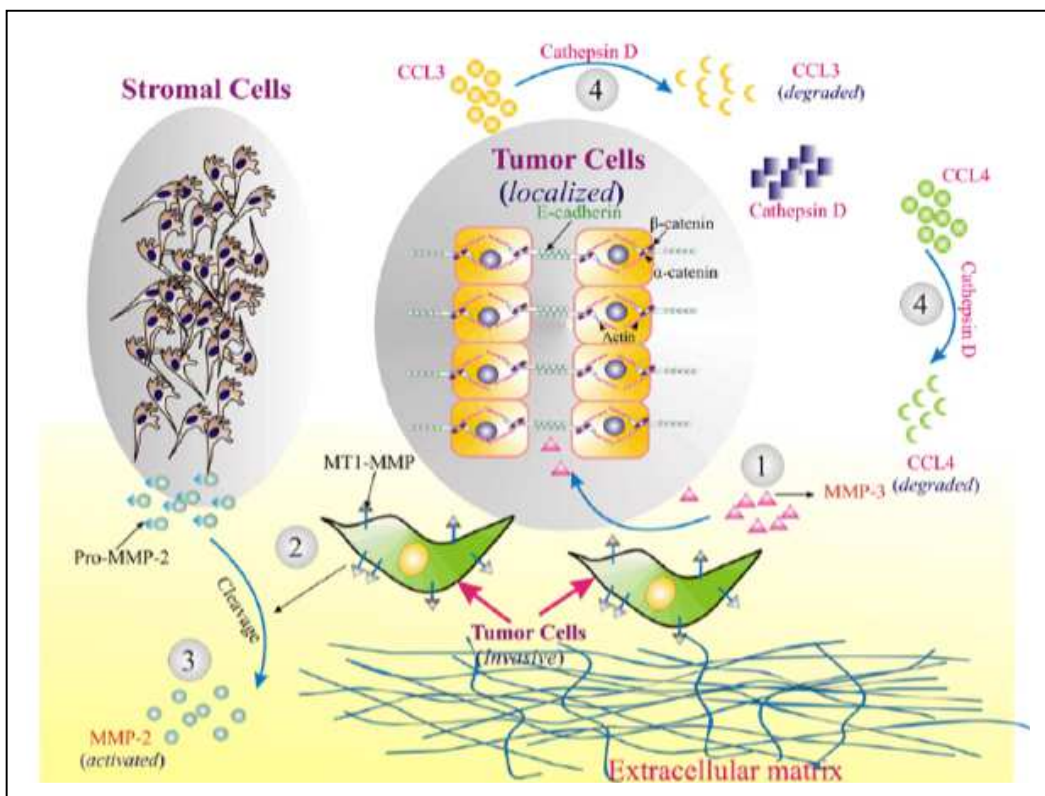


Εικόνα 1.16. Προοδευτικό μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο προστάτη (προσαρμοσμένο από *Gelmann EP, ACO GU Cancers Symposium 2008*)

1.2.5 Μικροπεριβάλλον Όγκου

Η σύγχρονη βιολογία καρκίνου έχει εστιάσει το ενδιαφέρον της στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος τους. Στον καρκίνο του προστάτη, αυτό αφορά την αλληλεπίδραση στο μικροπεριβάλλον του πρωτοπαθούς όγκου, και αυτού των οστικών μεταστάσεων. Και στις δύο περιπτώσεις, τα κύτταρα του όγκου αλληλεπιδρούν με τα

στρωματικά κύτταρα της θεμέλιας ουσίας, τα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα κύτταρα ή τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες, παράγοντας ή μετατρέποντας τον ρυθμό παραγωγής ουσιών όπως χυμοκίνες, καθεψίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases; MMPs), χρησιμοποιώντας έτσι το περιβάλλον του ξενιστή προς όφελος τους, αποκτώντας ικανότητες αύξησης, διήθησης και μετανάστευσης, συγχρόνως αποφεύγοντας τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι αμφίδρομη, και από αυτήν εξαρτάται η επιτυχία επιβίωσης του καρκινικού κυττάρου στο δεδομένο περιβάλλον (*Bascom & Kenny, 2005; Wilson & Singh, 2008*) (Εικόνα 1.17):



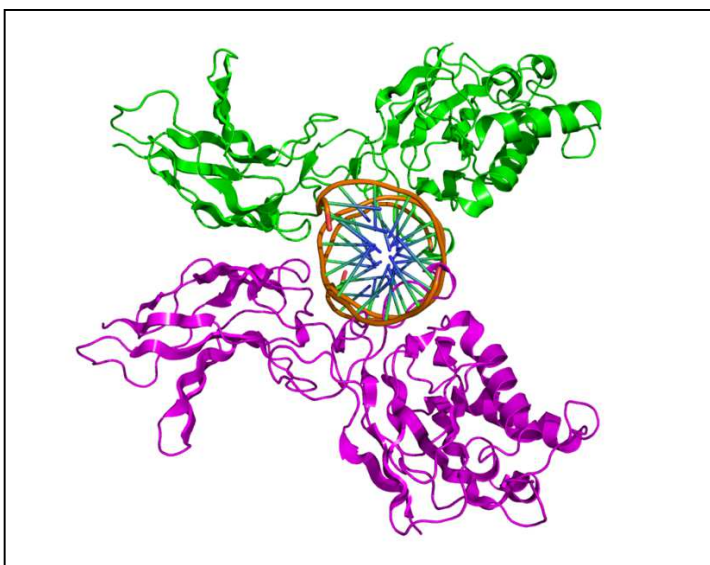
Εικόνα 1.17. Αλληλεπιδράσεις μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο προστάτη (από *Wilson & Singh, 2008*)

1.3 Η Οδός NF κ B – ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ – ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

1.3.1 Ο Μεταγραφικός Παράγοντας NF κ B

1.3.1.1 Ρύθμιση σηματοδοτικής οδού NF κ B

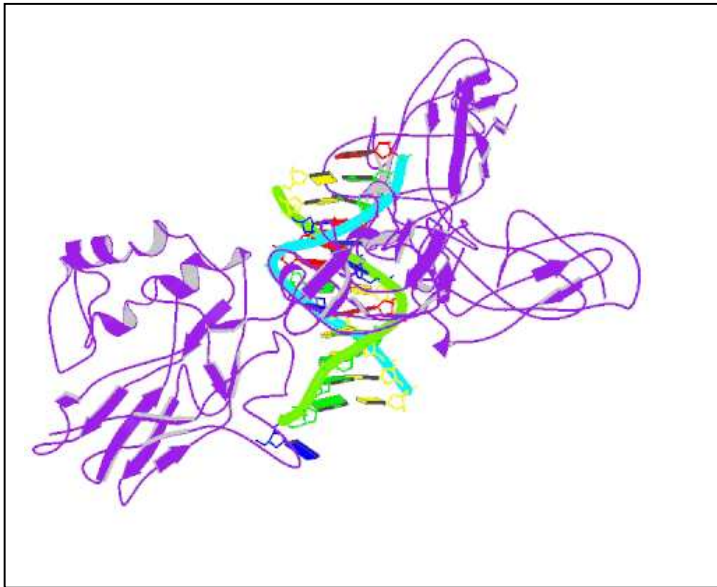
Η οικογένεια πρωτεϊνών Rel ή NF-kappaB (NF- κ B) αποτελείται από μια οικογένεια δομικά ομόλογων ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών, όπως οι ανοσιακές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις, αναπτυξιακές διαδικασίες, κυτταρική αύξηση, και απόπτωση (*Παράρτημα 1, Εικόνα 1.20*). 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- κ B έχουν μια εξελικτικά διατηρημένη δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA/διμερισμού που ονομάζεται περιοχή ομολογίας Rel (Rel homology domain; RHD) (*Gilmore, 1990*) (*Εικόνα 1.18*).



Εικόνα 1.18. *Rel Homology Domain.* Ομοδιμερές NF κ B1 (p105) (πράσινο και μωβ) προσδεμένο σε DNA (καφέ) μέσω της RHD (μπλε) (3-D γράφημα σχεδιασμένο με τα προγράμματα PyMol και PDB1VC crystallographic structure).

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 (*Palombella et al, 1994; Gilmore, 2006*). 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 (*Gilmore, 2006*).

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. Το πιο συχνό ετεροδιμερές είναι το p50/RelA ετεροδιμερές, που είναι ο κυριότερος μεταγραφικός παράγοντας για τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα (*Chen et al, 1998*) (*Εικόνα 1.19*).



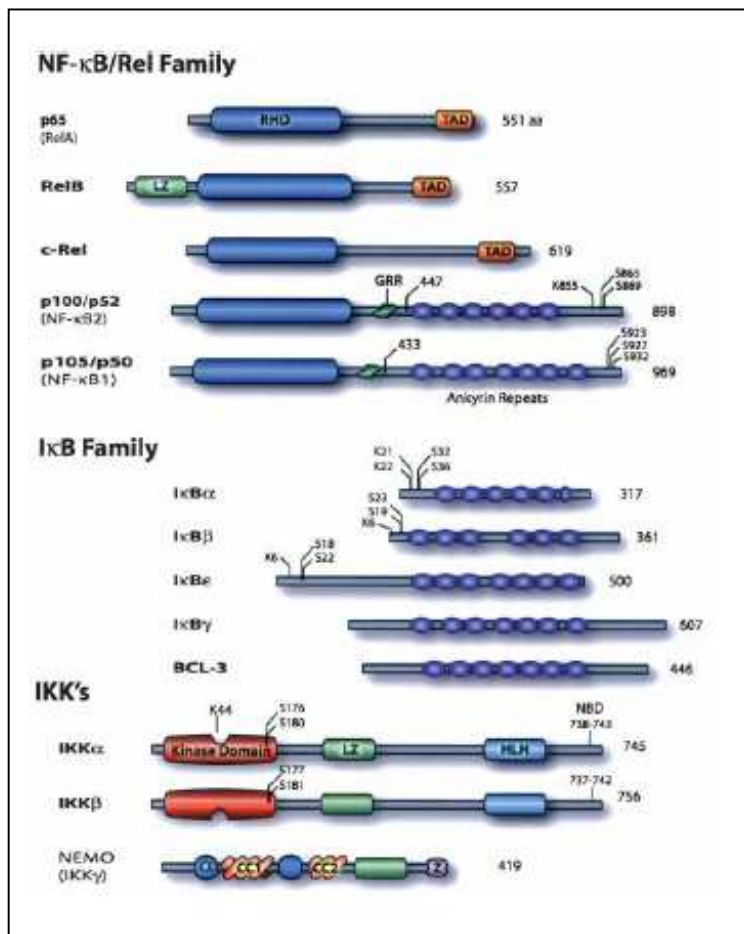
Εικόνα 1.19 Ετεροδιμερές p50/RelA. 3D κρυσταλλογραφική μορφή του συμπλέγματος p50/p65 (1VKX) συνδεδεμένο σε DNA (Protein Data Bank).

Η δραστηριότητα του NF- κ B ελέγχεται κυρίως μέσω των ανασταλτικών πρωτεϊνών I κ B. Υπάρχουν διάφορα μέλη της ομάδας των πρωτεϊνών I κ B (π.χ. I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ (*Παράρτημα I, Εικόνα 1.20*), οι οποίες δείχνουν διαφορετικές συγγένειες για τα διάφορα συμπλέγματα Rel/NF κ B, έχουν διαφορετικό έλεγχο λειτουργίας και εξειδικευμένη ιστική έκφραση (*Hayden & Ghosh, 2004; Gilmore, 2006*).

Η πλέον καλά μελετημένη αλληλεπίδραση είναι αυτή του I κ B α με το διμερές p50/RelA. Η αλληλεπίδραση τους αποτρέπει την ικανότητα του NF κ B να προσδένεται στο DNA και έχει ως αποτέλεσμα το σύμπλεγμα NF κ B να βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα λόγω ενός ισχυρού σήματος εξόδου από τον πυρήνα στο I κ B α . Στην πράξη, το σύμπλεγμα NF κ B/I κ B 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

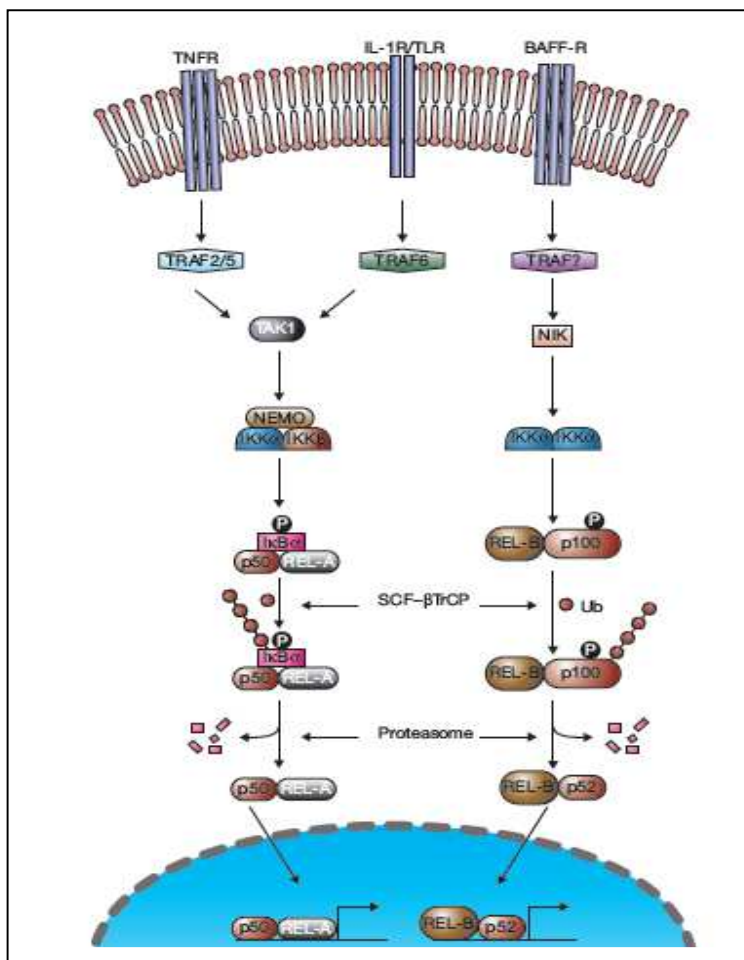
της σηματοδότησης (Chen, 2005; Gilmore, 2006). Αντίθετα, όταν το NFκB δεν συνδέεται με το ΙκΒ, επέρχεται πυρηνική μετακίνηση του ελεύθερου NFκB.

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 ΙκΒ, το σύμπλοκο αναστολέων του ΙκΒ (ΙκΒ kinase, IKK) (Παράρτημα I, Εικόνα 1.20). Η IKK στα περισσότερα κύτταρα έχει τουλάχιστον 3 υπομονάδες: IKKα, IKKβ και IKKγ (NEMO). Τα IKKα και IKKβ είναι καταλυτικές υπομονάδες κινάσης, ενώ το IKKγ είναι ρυθμιστική υπομονάδα που λειτουργεί διαγνωστικά και ρυθμιστικά ως προς τη σηματοδότηση για την ενεργοποίηση των καταλυτικών υπομονάδων.



Εικόνα 1.20 Οικογένειες NFκB, ΙκΒ και IKK. [RHD]: Rel homology domain; [TAD]: transactivation domain; [LZ]: leucine zipper domain; [GRR]: glycine-rich domain; [HLH]: helix-loop-helix domain; [Z]: zing finger domain; [CC1/2]: coiled-coil domains; [NBD]: NEMO-binding domain; [α]: α-helical domain (από Hayden & Ghosh, 2004).

Στην κλασική ή κανονική οδό ενεργοποίησης του NF- κ B, η ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK οδηγεί σε φωσφορυλίωση από το IKK β δύο σερινικών θέσεων στο αμινοτελικό άκρο του I κ B α , το οποίο αποτελεί σήμα για ουβικουιλίνωση και πρωτεασωματική αποδόμηση. Στην μη κανονική ή εναλλακτική οδό, το σύμπλεγμα p100/RelB ενεργοποιείται από φωσφορυλίωση του p100 από ένα ομοδιμερές IKK α (χωρίς την υπομονάδα NEMO), οδηγώντας σε ουβικουιλίνωση και μερική πρωτεόλυση του p100, μετατρέποντας το έτσι στο ενεργό p52/RelB κύτταρα. Η εναλλακτική οδός έχει βρεθεί ενεργή σε B λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (*Hayden & Ghosh, 2004; Chen, 2005; Gilmore, 2006; Scheidereit, 2006*) (Εικόνα 1.21).

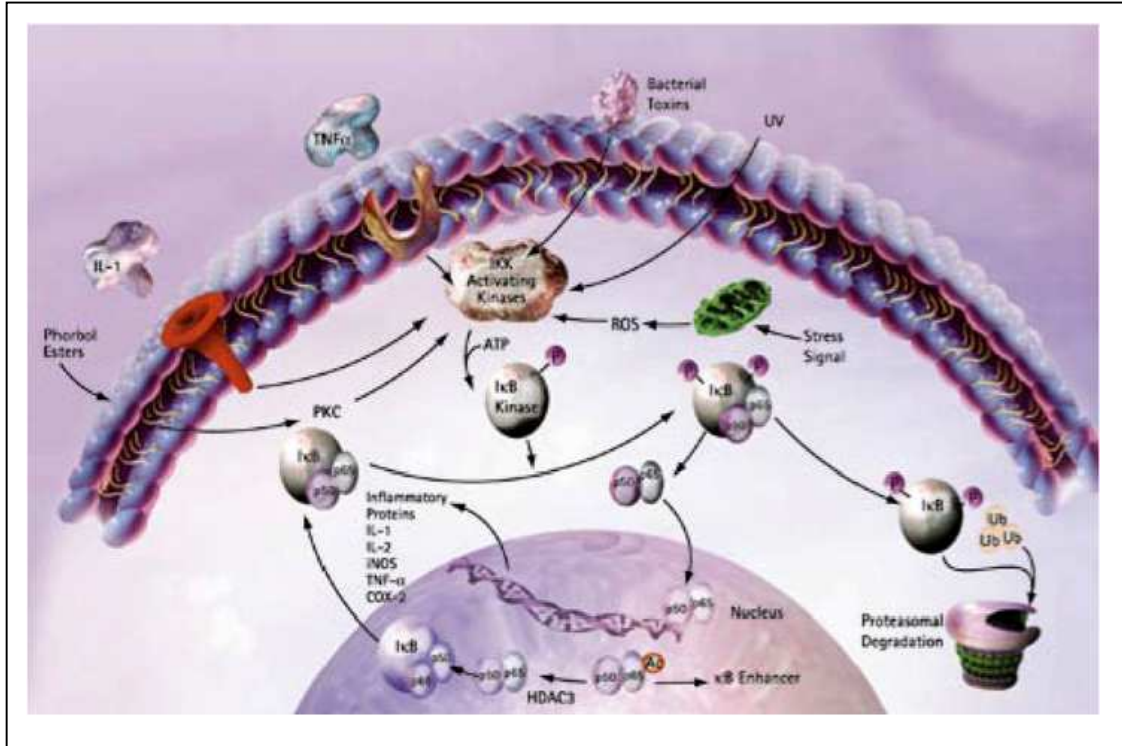


Εικόνα 1.21 Οδοί ενεργοποίησης NF κ B. Αριστερά: κανονική οδός, μέσω υποδοχέων TNFR και IL-1R/TLR. Δεξιά: μη κανονική οδός, μέσω υποδοχέα BAFF-R των B-λεμφοκυττάρων (από *Chen, 2005*).

Και στις δύο οδούς, το ελεύθερο σύμπλεγμα NFκB εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί μεταγραφικά γονίδια-στόχους (*Παράρτημα II*). Στην κλασσική οδό, ένα από τα γονίδια-στόχοι είναι αυτό που κωδικοποιεί το IκBα (*Sun et al, 1993*). Το νεο-συντιθέμενο IκBα εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται με το NFκB αποσυνδέοντας το έτσι από το DNA, και το σύμπλεγμα εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα επαναφέροντας έτσι την κατάσταση ισορροπίας. Ως εκ τούτου, η ενεργοποίηση του NFκB είναι γενικότερα μια βραχείας διάρκειας κατάσταση, διαρκώντας 30-60 λεπτά στα περισσότερα κύτταρα (*Hayden & Ghosh 2004; Chen, 2005; Gilmore, 2006; Scheidereit, 2006*).

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 ουβικουιλίνωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμουλίωση, οξειδωση/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 αποακετυλιασών ιστονών (histone deacetylase, HDAC), π.χ. HDAC1, HDAC3 (*Chen et al, 2002; Hayden & Ghosh 2004; Gao et al, 2005; Chen 2005*).

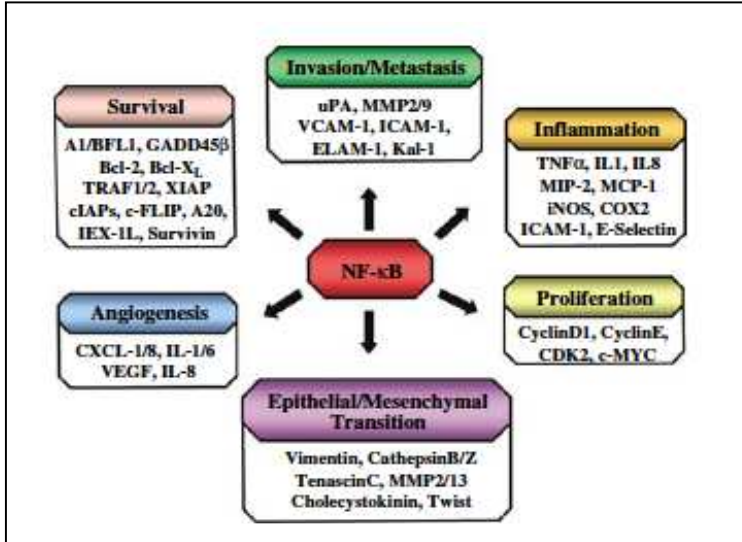
Μια συνολική εικόνα της σηματοδοτικής οδού του NFκB φαίνεται στην [Εικόνα 1.22](#).



Εικόνα 1.22 Σηματοδοτική οδός NFκB.

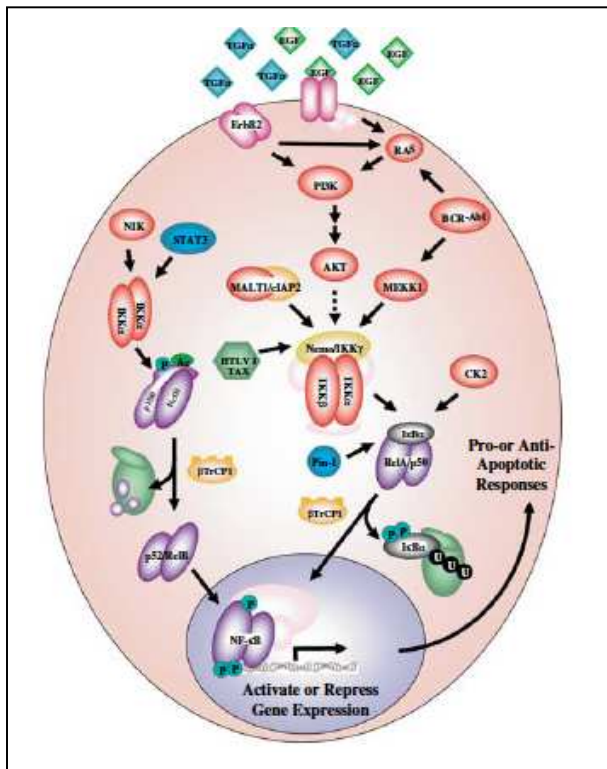
1.3.1.2 NFκB και καρκίνος προστάτη

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 ([Εικόνα 1.23](#)) ([Chen et al, 2005](#), [Bassères & Baldwin, 2006](#)).



Εικόνα 1.23 Γονίδια-στόχοι $NF\kappa B$ που εμπλέκονται στην ογκογένεση. Κυτταρική επιβίωση, Διήθηση/Μετάσταση, Φλεγμονή, Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, Επιθηλιακή/Μεσεγχυματογενής μετάβαση, Αγγειογένεση (από Bassères & Baldwin, 2006).

Η ενεργοποίηση του $NF\kappa B$ 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 IKK α), από τον PDGF ή μέσω κυτοκινών όπως η IL-6 (Εικόνα 1.24) (Bassères & Baldwin, 2006).



Εικόνα 1.24 Οδοί ενεργοποίησης $NF\kappa B$ στην ογκογένεση (από Bassères & Baldwin, 2006).

Για τον καρκίνο του προστάτη υπάρχουν ενδείξεις αυξημένης δραστηριότητας του NFκB μέσω της ενεργοποίησης της IKK. Ο ενεργοποιημένος NF-κB προωθεί κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό μέσω ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων *c-myc*, *cyclin D1* και *IL-6*. Επιπλέον, αυξάνει την έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων όπως το *Bcl-2*, αν και υπάρχουν αναφορές προ-αποπτωτικής δράσης του NFκB, με αύξηση της έκφρασης του *Bax*. Γονίδια-στόχοι του NFκB εμπλέκονται επίσης στην αγγειογένεση (*IL-8*, *VEGF*), διήθηση και μετάσταση (*e-σελεκτίνη*, *MMP9*, *uPA*, υποδοχέας *uPA*) (*Sweeny et al, 1997; Muenchen et al, 2000; Gasparian et al, 2002; Lindholm et al, 2001; Suh & Rabson, 2004; Papandreou & Logothetis, 2004; Paule et al, 2007*).

Αυτό το προφίλ ενεργοποίησης του NFκB σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία, προχωρημένο στάδιο καρκίνου, βιοχημική πρόοδο νόσου και υψηλά επίπεδα PSA διάγνωσης (*Baldwin et al, 2001; Papandreou et al, 2004; Papandreou & Logothetis, 2004; Ross et al, 2004; Paule et al, 2007*). Πράγματι, υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι η έκθεση σε *IL-6* επιφέρει τη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση των υπο-κλώνων του όγκου στον καρκίνο του προστάτη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αντι-αποπτωτικού φαινότυπου και αντίσταση στη χημειοθεραπεία (*Spiotto et al, 2000; Sanford & Dewille, 2005*).

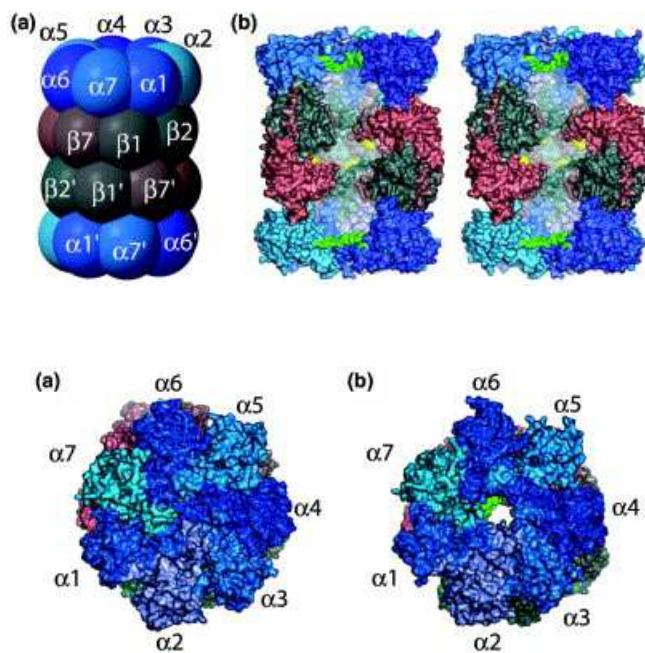
1.3.2 Το Σύστημα Ουβικουιλίνης-Πρωτεασώματος

1.3.2.1 Δομή και λειτουργία συστήματος UPS

Το σύστημα ουβικουιλίνης/πρωτεασώματος (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, η επιδιόρθωση του DNA, ο χρωματινικός ανασχηματισμός και η μεταγραφή (*Chen, 2005; DeMartino and Gillette, 2007; Vlachostergios et al, 2009a; Vlachostergios et al, 2009b*).

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 (*Pickart & Cohen, 2004*). 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 (*Εικόνα 1.25*). 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 είσοδοι κλείνουν και η δραστηριότητα του πρωτεασώματος καταστέλλεται (Εικόνα 1.25) (Pickart & Cohen, 2004; Rechsteiner & Hill 2005; DeMartino and Gillette, 2007; Drews et al, 2007).



Εικόνα 1.25 Δομή 20S πρωτεασώματος. Επάνω: Πλάγια όψη. Ενεργά κέντρα σχηματίζονται στα αμινοτελικά άκρα των υπομονάδων $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 7$. Κάτω: Κάτοψη συμπλόκου πρωτεασώματος στην κλειστή (αριστερά) και την ανοιχτή (δεξιά) διαμόρφωση (από Rechsteiner & Hill, 2005).

Η φωσφορυλίωση της αλληλουχίας PEST (proline-glutamate-serine-threonine) ή αλληλουχιών τύπου PEST, ως απάντηση σε σήματα κυτταρικής στόχευσης, προκαλεί την έναρξη της ουβικουιλίνωσης και σημαίνει τις πρωτεΐνες για πρωτεασωματική επεξεργασία και/ή αποδόμηση. Η φωσφορυλιωμένη αλληλουχία PEST αναγνωρίζεται από λιγκάσες ουβικουιλίνης, που καταλύουν την προσθήκη ενός μορίου ουβικουιλίνης. Στην συνέχεια προστίθενται μια αλυσίδα πολυουβικουιλίνης χαρακτηριστικού σχηματισμού, μέσω της οποίας το πρωτεάσωμα αναγνωρίζει πρωτεΐνες προς αποδόμηση (*Papandreou & Logothetis, 2004; Pickart & Cohen, 2004; Chen, 2005; DeMartino & Gillete, 2007*).

Αναλυτικά, η σύνδεση μιας πρωτεΐνης με την ουβικουιλίνη επιτελείται σε 3 στάδια που καταλύονται από τρεις κατηγορίες ενζύμων. Η πρώτη κατηγορία είναι τα ένζυμα που ενεργοποιούν την ουβικουιλίνη (αποκαλούμενα και E1) τα οποία χρησιμοποιώντας ενέργεια από την αποδόμηση του ATP συνδέονται μέσω μιας κυστεΐνης με την ουβικουιλίνη και την ενεργοποιούν. Στη συνέχεια η ουβικουιλίνη μεταφέρεται σε μια κυστεΐνη ενός ενζύμου της κατηγορίας E2 (Ubiquitin Conjugating enzyme). Στο τρίτο στάδιο της διαδικασίας, η συνδεδεμένη ουβικουιλίνη μεταφέρεται με την βοήθεια ενός ενζύμου με δράση λιγκάσης της ουβικουιλίνης (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 ουβικουιλίνης. Επιπλέον μόρια ουβικουιλίνης μπορούν να συνδεθούν στο παραπάνω σύμπλεγμα μέσω αμινοξέων λυσίνης του μορίου της ουβικουιλίνης, συνήθως το K48. Η σύνδεση της ουβικουιλίνης με πρωτεΐνες-στόχους μέσω άλλων λυσινών του μορίου της όπως η K29 και η K63 δεν

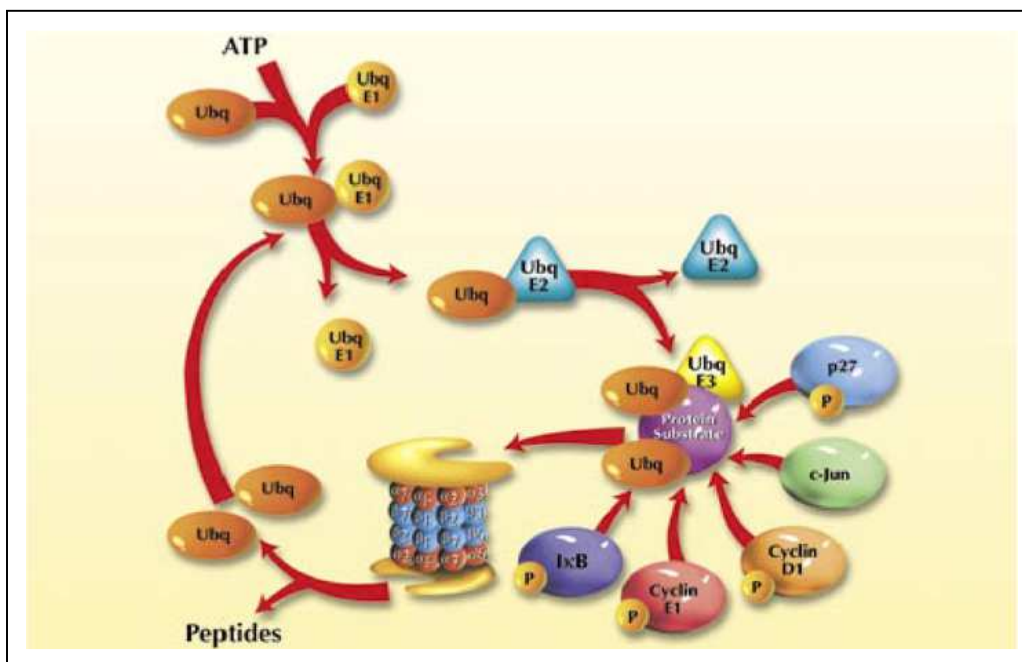
αποτελούν μήνυμα αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα για αποδόμηση αλλά εμπλέκονται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA και η ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μια αλυσίδα από τουλάχιστον 4 μόρια ουβικουιτίνης χρειάζεται ώστε η πρωτεΐνη στόχος να αναγνωρισθεί και να αποδομηθεί από 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) (*Jiang et al, 2001; Cyr et al, 2002; Pickart, 2004; Miller & Gordon, 2005; Mani & Gelmann, 2005; Welchman et al, 2005*).

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 (*Pickart, 2004; Pickart & Cohen, 2004; Chen, 2005; DeMartino & Gillete, 2007*).

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 (Adams et al, 1999; Papandreou et al, 2004; DeMartino & Gillete, 2007; Jung et al, 2007). Συνολικά η πρωτεολυτική δράση του πρωτεασώματος φαίνεται στην *Εικόνα 1.26*.

Πέρα από τον γνωστό πρωτεολυτικό ρόλο του πρωτεασώματος, πρόσματα έχει αναγνωριστεί ότι το τελευταίο έχει πολύ σημαντικούς μη-πρωτεολυτικούς ρόλους που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και την αντίσταση στην χημειο/ακτινοθεραπεία. Τέτοιοι ρόλοι διενεργούνται μέσω αποουβικουιτυλίωσης, σουμοϋλίωσης ή NEDDυλίωσης πρωτεϊνών (Vlachostergios et al, 2009a; Vlachostergios et al, 2009b).



Εικόνα 1.26 Πρωτεολυτική δράση πρωτεασώματος.

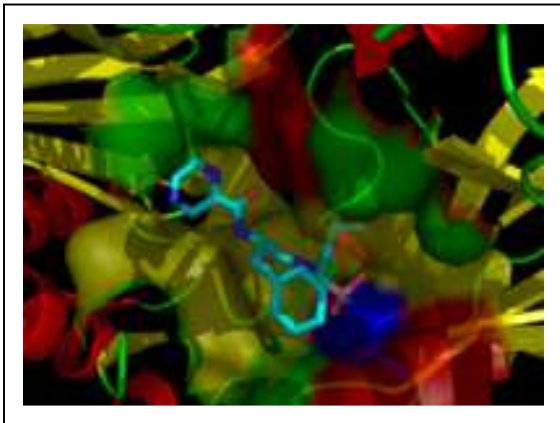
Το πρωτεάσωμα είναι ένας ευαίσθητος μηχανισμός που μπορεί να προσαρμόζεται ανάλογα για να ελέγχει την ομοιόσταση της ουβικουιτίνης, ακόμα και υπό αναστολή (*DeMartino & Gillette 2007; Naujokat et al, 2007*). Επιπλέον, τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος, ως απάντηση στην αλλαγή 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 (*DeMartino & Gillette, 2007; Boisvert et al 2009*).

Το σύστημα UPS ρυθμίζει πολλά βήματα στην οδό NF-κB: τη ουβικουιτίνωση και πρωτεολυτική αποδόμηση της IκB, την επεξεργασία των πρόδρομων μορφών NF-κB p100 και p105, και την ενεργοποίηση της κινάσης IκB (IKK), το τελευταίο τόσο σε εξάρτηση, όσο και ανεξάρτητα της διάσπασης (*Papandreou and Logothetis, 2004; Chen, 2005*).

1.3.2.2 Ο αναστολέας πρωτεασώματος βορτεζομίμη

Η βορτεζομίμη (PS-341, VELCADE®) είναι ο πρώτος και ο μόνος, προς το παρόν, αναστολέας του πρωτεασώματος που χρησιμοποιείται κλινικά. Είναι πεπτιδίο που ανήκει στις πεπτιδύλ-αλδεΐδες και είναι παράγωγο του βορονικού οξέος (N-πυραζιν-καρβονυλ-L-φαινυλαλανίνη-L-λευκίνη βορονικό οξύ) (*Εικόνα 1.27*). 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 δραστικότητα χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος ενώ δεν επηρεάζει άλλα σημαντικά ένζυμα του κυττάρου όπως η τρυψίνη, η θρομβίνη, η χυμοτρυψίνη, η καθεψίνη Β, και η ελαστάση (*Adams et al, 1999; Lightcap et al, 2000; Richardson et al, 2003; O'Connor, 2006*).



Εικόνα 1.27 Αναστολέας πρωτεασώματος βορτεζομίμη. Απεικόνιση σύνδεσης πάνω σε πρωτεάσωμα μήκητος

Φαρμακοκινητικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της βορτεζομίμης 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. Το VELCADE® έχει αποδεδειγμένη κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική σειρά προστάτη PC-3 *in vitro* με GI₅₀: 7nM, και σταματάει την αύξηση του όγκου από τα ίδια κύτταρα σε ζωικά μοντέλα (*Adams et al, 1999; Richardson et al, 2003; Papandreou & Logothetis, 2004*). Η

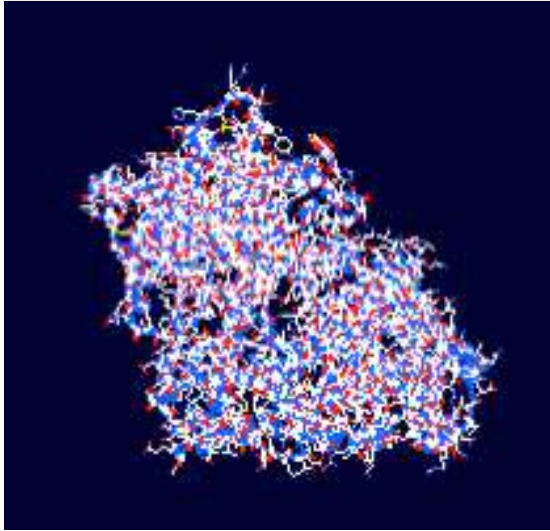
βορτεζομίμπη έχει χρησιμοποιηθεί σε μια Φάσεως 1 κλινική μελέτη σε ασθενείς καρκίνου προστάτη, κατά την οποία αποδείχθηκε ότι η μέγιστη ανεκτή και αποτελεσματική δόση ήταν 1.6mg/m² χορηγούμενο ενδοφλεβίως εβδομαδιαία για 4 εβδομάδες με κύκλο 5 εβδομάδων. Η μέση αναστολή πρωτεασωμικής δραστηριότητας 1 ώρα μετά την δόση ήταν ≥75%. Σε αυτές τις δόσεις, υπήρξαν ενδείξεις βιολογικής δραστηριότητας (μείωση δεικτών σχετιζόμενων με το NFκB) και αντινεοπλασματική δράση (*Papandreou et al al, 2004; Papandreou & Logothetis, 2004*).

1.4 Ο ΑΞΟΝΑΣ NEP / ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

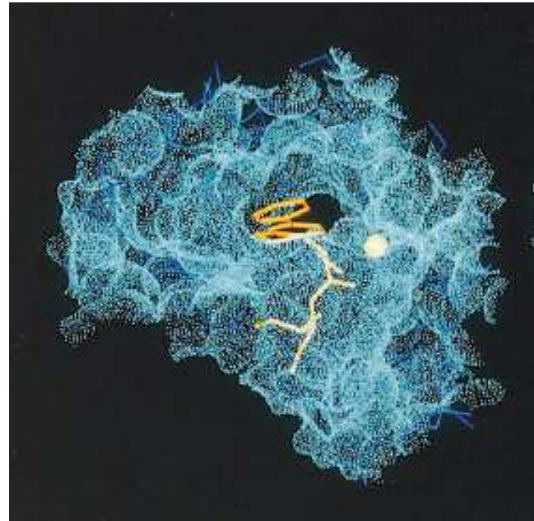
1.4.1 Η Ουδέτερη Ενδοπεπτιδάση (NEP)

1.4.1.1 Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες NEP

Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP, νεπριλυσίνη, εγκεφαλινάση, ενδοπεπτιδάση 2, kidney-brush-border neutral proteinase, atriopeptidase, Common acute lymphocytic leukaemia antigen; CALLA, CD10) (EC 3.4.24.11, GenBank ID: 4311, UniProt ID: P08473) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II (90-110kDa, μήκος πρωτεϊνικής αλληλουχίας: 750 αμινοξέα). Είναι μεταλλο-ενδοπεπτιδάση ψευδάργυρου τύπου θερμολυσίνης της οικογένειας M13 πεπτιδασών, που εκφράζεται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του προστάτη (*Εικόνες 1.28 & 1.29*).



Εικόνα 1.28 3-D απεικόνιση μορίου NEP.
UniProt ID: P08473, NEP_HUMAN
[απεικόνιση με DeepView/Swiss-Pdb Viewer
3.7 (SP5)]



Εικόνα 1.29 3-D απεικόνιση ενεργού κέντρου NEP. Αμινοξέα 507-749. Μόριο προσδεμένου υποστρώματος με κίτρινο (από Tiraboschi et al, 1999)

Το ένζυμο παίζει σημαντικό ρόλο στην ακύρωση πεπτιδικής σήμανσης στην επιφάνεια των κυτάρων. Διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια μήκους έως και 30 αμινοξέων στην αμινική πλευρά των υδρόφοβων αμινοξέων τους, ιδιαιτέρως σε θέσεις Phe ή Tyr. Έτσι, υδρολύει και απενεργοποιεί διάφορα ενεργά ενδογενή πεπτίδια, όπως τα οπιούχα πενταπεπτίδια Met- και Leu-εγκεφαλίνη, η ουσία P, η βραδυκινίνη, η αγγειοτενσίνη 1 και 2, η ενδοθηλίνη 1 και πεπτίδια τύπου βομβεσίνης, που συνολικά ονομάζονται νευροπεπτίδια (neuropeptides, NPs) (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2 Υποστρώματα NEP

Υπόστρωμα	Κύρια Ιδιότητα	UniProt ID	Gene name
-----------	----------------	---------------	--------------

ET-1	Αγγειοσυσπαστικό/μιτογόνο πεπτιδίο	P05305*	EDN1*
ET-2	Αγγειοσυσπαστικό/μιτογόνο πεπτιδίο	P20800*	EDN2*
ET-3	Αγγειοδιασταλτικό πεπτιδίο	P14138*	EDN3*
Βομβεσίνη	Πρόκληση μυϊκής σύσπασης/μιτογόνο πεπτιδίο	P84213	(πρωτεΐνη του είδους <i>Bombina variegata</i>)
Gastrin-releasing peptide (GRP)	Διέγερση έκκρισης γαστρίνης	P07492	GRP
Αγγειοτενσίνη 1, 2	Πρωτεΐνες του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης	P01019*	AGT*
Νευροτενσίνη/ νευρομεδίνη N	Πρόκληση μυϊκής σύσπασης/μεταβολισμός λίπους	P30990	NTS
Καλσιτονίνη	Ρύθμιση ομοιόστασης ασβεστίου	P01258	CALCA (CALC1)
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	Διαμεσολαβητής φλεγμονής	P02741	CRP (PTX1)
Βραδυκινίνη	Διαμεσολαβητής φλεγμονής	P01042*	KNG1 (BDK)*

Ουσία P	Διαμεσολαβητής φλεγμονής	P20366*	TNK1*
Brain natriuretic peptide (atrial natriuretic peptide)	Νατριούρηση, διούρηση, αγγειοδιαστολή	P16860*	NPPB*
Οξυτοκίνη	Σύσπαση λείων μυϊκών ινών μήτρας και μαζικού αδένου	P01178*	OXT*
Leu- & Met-εγκεφαλίνη	Οπιοειδή πεπτιδία	P01210*	PENK*
bFGF	Αγγειογόνος/μιτογόνος παράγοντας	P09038	FGF2

* Αναφέρεται στο πρόδρομο μόριο

Με αυτόν τον τρόπο, η NEP μειώνει την τοπική συγκέντρωση νευροπεπτιδίων που είναι διαθέσιμα για σύνδεση με τον υποδοχέα και την επαγωγή μηνύματος νευροπεπτιδίου μέσω της σύνδεσής του με τον υποδοχέα της πρωτεΐνης G. Έτσι, λειτουργεί σε διάφορα συστήματα οργάνων για να μειώσει την ανταπόκριση σε αυτές τις πεπτιδικές ορμόνες (*Shipp et al, 1991; Shipp and Look, 1993; Kenny 1993; Turner et al, 2001*).

1.4.1.2 NEP και καρκίνος προστάτη

Η NEP έχει εμπλακεί στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υδρολύοντας νευροπεπτιδία, όπως η ενδοθηλίνη και πεπτιδία τύπου βομβεσίνης,

που έχουν αποδειχθεί ισχυρά μιτογόνα τόσο για τα καλοήθη, όσο και για τα κακοήθη κύτταρα (*King et al, 1993; Sumitomo et al, 2001*). Απώλεια ή μείωση της έκφρασης του NEP έχει αναφερθεί σε διάφορα νεοπλάσματα (*Dai et al, 2001*). Η μειωμένη NEP επιτρέπει τη συσσώρευση υψηλότερων συγκεντρώσεων πεπτιδίων στην επιφάνεια των κυττάρων και μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη και εξέλιξη νεοπλασμάτων (*Shipp & Look, 1993, Nanus, 2003*). Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι τα νευροπεπτίδια ενεργούν ως μιτογόνα για πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος του προστάτη (*King et al, 1993; Bologna et al, 1989*). Στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη και στα πρώιμα στάδια του ανδρογονοεξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη, ο NEP διασπά τα νευροπεπτίδια και προλαμβάνει τη δημιουργία αυτοκρινικού ή παρακρινικού περιβάλλοντος που αυτά προκαλούν. Έτσι, η NEP αναστέλλει τη μετανάστευση, σταματά την κυτταρική ανάπτυξη και την ογκογένεση, ενώ επιφέρει απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου (*Sumitomo et al, 2000; Dai et al, 2001*).

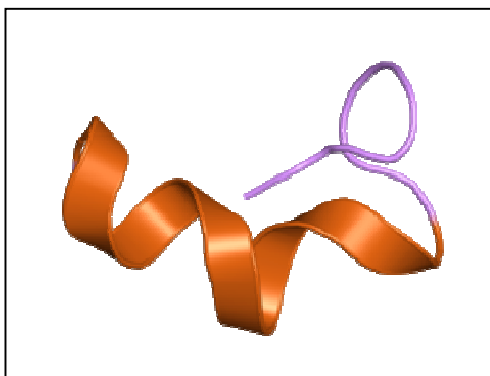
Κατά τη μετάβαση στην ανδρογono-ανεξαρτησία, η NEP βρέθηκε να έχει μειωμένη ή κατασταλαμμένη έκφραση (*Papandreou et al, 1998*), συχνά μέσω της υπερμεθυλίωσης του προωθητή της (*Usmani et al, 2000*). Επιπλέον, φαίνεται ότι η θεραπεία στέρησης ανδρογόνων (ADT) οδηγεί σε εμφάνιση κλώνων με μειωμένη έκφραση NEP, καθώς η τελευταία είναι μεταγραφικό γονίδιο-στόχος του υποδοχέα ανδρογόνων και ως εκ τούτου η έλλειψη ανδρογόνων μειώνει την

μεταγραφή της (*Papandreou et al, 1998; Shen et al, 2000a; Shen et al, 2000b*). Φαίνεται ότι τα κύτταρα PC που επιβιώνουν της ADT έχουν μειωμένα επίπεδα NEP. Πράγματι, έλλειψη έκφρασης NEP παρατηρήθηκε σχεδόν στο 50% τόσο του πρωτοπαθούς, όσο και του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη (*Papandreou et al, 1998; Osman et al, 2004*), και συσχετίζεται με βιοχημική πρόοδο νόσου μετά προστατεκτομή (*Osman et al, 2006, Godara et al, 2007*).

1.4.2 Νευροπεπτίδια

1.4.2.1 Ενδοθηλίνη

Οι ενδοθηλίνες (ETs) είναι μια οικογένεια 3 πεπτιδίων, τις ET-1, ET-2 και ET-3, τα οποία είναι ισχυρά αγγειοσυσπαστικά αλλά και μιτογόνα πεπτίδια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ανθρώπινων νεοπλασμάτων (π.χ. καρκίνος προστάτη, ωθηκών, νεφροκυτταρικός, πνεύμονος, ορθοκολικού, μαστού, τραχήλου, ενδομητρίου, κύστεως, εγκεφάλου, σαρκώματος Kaposi, και μελανώματος) (*Masaki, 2000; Nelson et al, 2003; Bagnato et al, 2008*). Η σημαντικότερη από αυτές, με ισχυρή δράση στα επιθηλιακά κύτταρα, είναι η ET-1 (*Εικόνα 1.30*). Η ενδοθηλίνη 1 παράγεται από ένα πρόδρομο μόριο, την προ-προενδοθηλίνη-1 (GeneID: 1906, Chr6p24.1), μέσω της δράσης του ενζύμου ECE-1 (endothelin-converting enzyme 1).



Εικόνα 1.30 3-D απεικόνιση μορίου ET-1. Αμινοξέα 1-21. Κρυσταλλογραφική απεικόνιση (PDB entry: 1edn)

Η βιολογική δράση των ενδοθηλινών διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης δύο υποδοχέων τύπου σύνδεσης με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCR), τον υποδοχέα ET_A και τον υποδοχέα ET_B. Ο υποδοχέας ET_B έχει ίδιο βαθμό συγγένειας και με τις 3 ενδοθηλίνες, ενώ ο υποδοχέας ET_A έχει πολύ χαμηλότερο βαθμό συγγένειας με την ET-3 συγκριτικά με τις άλλες δύο ενδοθηλίνες. Κυρίως, ενεργοποίηση του ET_BR οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών που ανταγωνίζονται το σηματοδοτικό μονοπάτι του ET_AR.

Η ενεργοποίηση του ET_AR οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), που οδηγεί σε διάσπαση του διφωσφορικού φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP₂), αλλά και η ενεργοποίηση της οδού της MAPK (mitogen-activated protein kinase), τα οποία οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση διάφορων άμεσων γονιδίων-στόχων (*Bagnato et al, 2008*).

1.4.2.2 Βομβεσίνη και BLPs

Η βομβεσίνη (BBS, BOMB_BOMVA, UniProt ID: P84213) είναι μια πρωτεΐνη μήκους 14 αμινοξέων που περιέχεται στις δερματικές εκκρίσεις του είδους *Bombina variegata*. Προκαλεί σύσπαση λείων μυϊκών ινών, και έχει ρόλο στην πρόκληση υποθερμίας, διεγείρει τον διπλασιασμό DNA και την απελευθέρωση

πολλών γαστρεντερικών ορμονών. Επίσης, είναι ικανή να διεγείρει την απελευθέρωση ινσουλίνης.

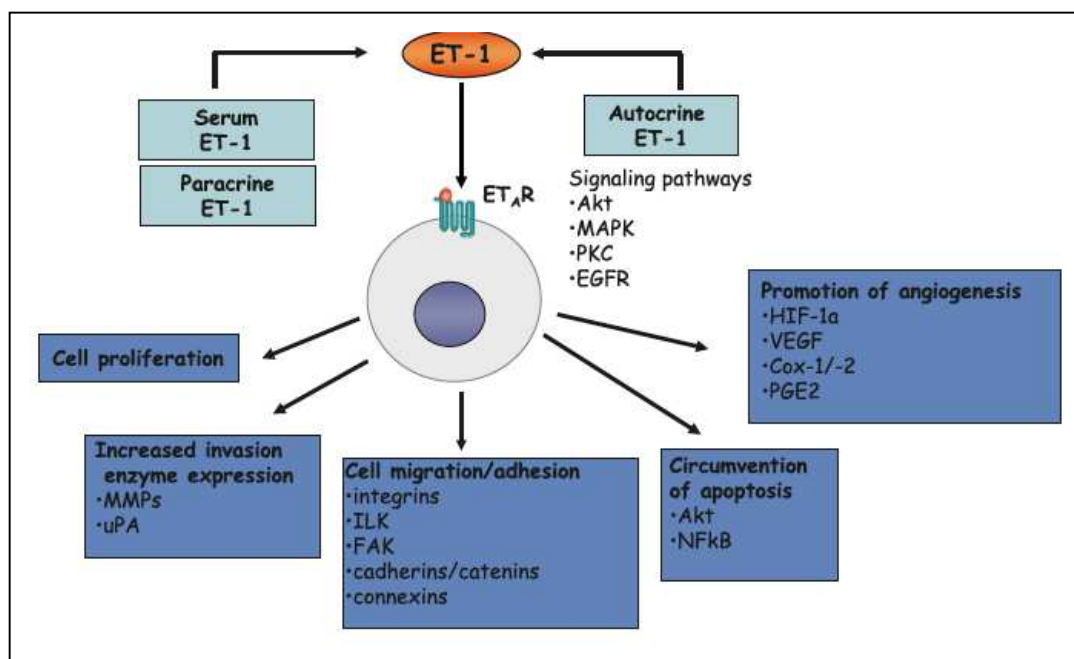
Τα ανθρώπινα ανάλογα της βομβεσίνης ονομάζονται πεπτίδια τύπου βομβεσίνης (bombesin-like peptides, BLPs). Σε αυτά ανήκουν η πρωτεΐνη GRP (gastrin-releasing peptide, UniProt ID P07492), η Νευρομεδίνη Β (Neuromedin Β, NMB, UniProt ID: P08949) και το βιολογικά ενεργό GRP πεπτίδιο Νευρομεδίνη C. Η GRP διεγείρει απελευθέρωση γαστρίνης και άλλων γαστρεντερικών ορμονών, και λειτουργεί ως αρνητικός αναδραστικός μηχανισμός για τον έλεγχο του φόβου. Η NMB προκαλεί σύσπαση λείων μυϊκών ινών, όπως και η βομβεσίνη.

Υπάρχουν τρία είδη ανθρώπινων υποδοχέων στα οποία δρουν τα BLPs: Neuromedin-B receptor (NMBR, BB₁), Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR, BB₂), bombesin receptor subtype-3 (BRS3, BB₃). Αναφορικά με την φαρμακολογία των υποδοχέων βομβεσίνης, οι βαθμοί συγγένειας είναι ως εξής: NMB>BBS>GRP για τον υποδοχέα BB₁ και GRP>BBS>NMB για τον υποδοχέα BB₂. Οι υποδοχείς βομβεσίνης ανευρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στον οισοφάγο, τον πνεύμονα, το γαστρεντερικό σωλήνα και τα αναπαραγωγικά όργανα. Στο ΚΝΣ, τα BLPs μπορούν να επιφέρουν αίσθημα κορεσμού, πιθανώς μέσω αλληλεπίδρασης με τον απελευθερωτικό παράγοντα κοτρικοτροπίνης. Επίσης παίζουν ρόλο στη θερμορύθμιση και παράγουν κνησμό μη σχετιζόμενο με απελευθέρωση ισταμίνης. Επιπλέον, εμπλέκονται στην ρύθμιση κερκαδιανών ρυθμών και στην δραστηριότητα του σεροτονινεργικού συστήματος, και συσχετίζονται με διαταραχές ύπνου και κατάθλιψη. Στο γαστρεντερικό σύστημα, τα πεπτίδια αυτά προκαλούν σύσπαση λείων μυϊκών

ινών, και ρυθμίζουν τις γαστρεντερικές και παγκρεατικές εκκρίσεις. Τέλος, έχουν αναπτυξιακό ρόλο στην οργανογένεση του πνεύμονα και της μήτρας (*Kroog et al, 1995; Ryan et al, 1999*).

1.4.2.3 Νευροπεπτίδια και καρκίνος προστάτη

Έχει βρεθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα συχνά χρησιμοποιούν την φυσιολογική λειτουργία των GPCRs για να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα, να αποφεύγουν την ανοσολογική άμυνα, να αυξήσουν την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, να διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και να μεθίστανται σε άλλα όργανα. Η ανώμαλη έκφραση των GPCRs, όπως οι υποδοχείς ενδοθηλίνης, και η αυτοκρινής ή παρακρινής ενεργοποίηση τους από τους αγωνιστές τους, που εκλύονται από τον όγκο ή από στρωματικά κύτταρα, είναι μια από τις πιο συχνές τακτικές που χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για την διέγερση των GPCRs και των σηματοδοτικών τους οδών, όπως η οδός Akt, MAPK, PKC και EGFR (*Εικόνα 1.31*) (*Bagnato et al, 2008*).



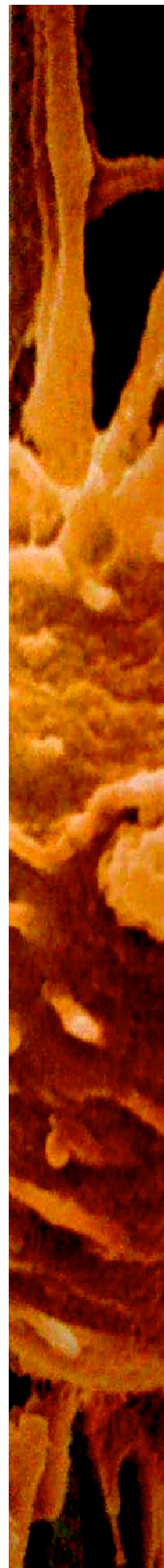
Η μείωση της
έκφρασης NEP

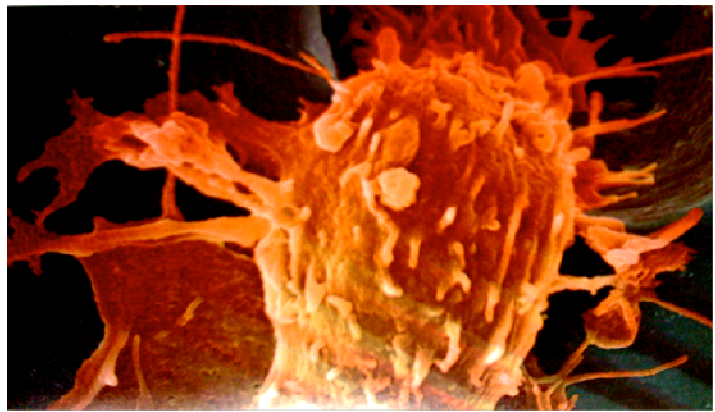
Εικόνα 1.31 Σηματοδοτικές οδοί που επάγονται από την ET-1 (από Bagnato et al, 2008).

που συμβαίνει στον προχωρημένο καρκίνο προστάτη, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αφήνει ανεμπόδιστη την αυτοκρινή και παρακρινή μιτογόνο δράση των νευροπεπτιδίων, που λειτουργεί ως εναλλακτική οδός ανάπτυξης των PC κυττάρων σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης ανδρογόνων (*Dai et al, 2001, Sumitomo et al, 2001, Nanus, 2003, Paule et al, 2007*). Πράγματι, η ενδοθηλίνη 1 και η βομβεσίνη έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη και τον σχηματισμό νεο-οστού *in vitro* (*Bologna et al, 1989; Nelson et al, 1995; Nelson et al, 1996; Aprikian et al, 1997; Festuccia et al, 1998*), ευνοούν τη μετανάστευση κυττάρων (*Dai et al, 2001; Sumitomo et al, 2001; Levine et al, 2003; Dawson et al, 2004*), αλλά και δείχνουν ισχυρή συνέργεια με άλλους αυξητικούς παράγοντες που εμπλέκονται στα προχωρημένα στάδια του καρκίνου του προστάτη (*Battistini et al, 1993; Steiner, 1993; Sumitomo et al, 2001*). Ο προχωρημένος και ο μεταστατικός καρκίνος του προστάτη παρουσιάζει αυξημένη έκφραση ET_AR και μειωμένη έκφραση ET_BR, διατηρώντας έτσι ισχυρή τη δράση της ET-1 που επιφέρει το ET_AR (*Nelson et al, 1996, Godara et al, 2007*) και υψηλότερα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα, σε σύγκριση με τον καρκίνο που δεν έχει αντιμετωπισθεί με ορμόνες (*Nelson et al, 1995*), με αντίστοιχο προφίλ έκφρασης ET-1 και υποδοχέων στην *in vitro* ανάλυση κυτταρικών σειρών (*Grant et al, 1997*). Συγχρόνως, έχει βρεθεί ότι το ένζυμο ECE-1 είναι υπερεκφρασμένο στον καρκίνο προστάτη (*Dawson et al, 2006*). Ομοίως, στον

προχωρημένο καρκίνο του προστάτη υπάρχει υπερέκφραση των υποδοχέων της οικογένειας GRP-R, μέσω της οποίας τα πεπτίδια τύπου βομβεσίνης ασκούν τη δράση τους (*Reile et al, 1994; Aprikian et al, 1996; Markwalder & Reubi, 1999; Sun et al, 2000*), καθώς και αυξημένα επίπεδα BLPs ορού στο 40% των ασθενών με ορμονο-άντοχο καρκίνο προστάτη (*Logothetis & Hoosein, 1992*). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η ET-1 και η βομβεσίνη προκαλούν ενεργοποίηση του AR μέσω Src/PI3K, και σύγχρονη ενεργοποίηση του ογκογονιδίου c-myc (*Kung & Evans, 2009; Lee et al, 2009*).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





Κεφάλαιο 2: Ερευνητική Υπόθεση - Στόχοι

2.1 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Ο άξονας ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης/νευροπεπτιδίων και η οδός NFκB/ουβικουιτίνης/πρωτεασώματος είναι οι δύο μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί -ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο- με τον καρκίνο του προστάτη (*Nelson et al, 1995; Papandreou et al, 1998; Sumitomo et al, 1999; Muenchen et al, 2000; Lindholm et al, 2001; Gasparian et al, 2002; Papandreou & Logothetis, 2004; Paule et al, 2007*). Σε αυτή την εργασία ερευνήσαμε τη σχέση αυτών των οδών, χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλα ανδρογονο-εξαρτώμενου και μη ανδρογονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη.

Οι οδοί NEP/NPs και NFκB/πρωτεασώματος είναι απευθείας άμεσα συνδεδεμένοι και αλληλεπιδρούν στον καρκίνο προστάτη

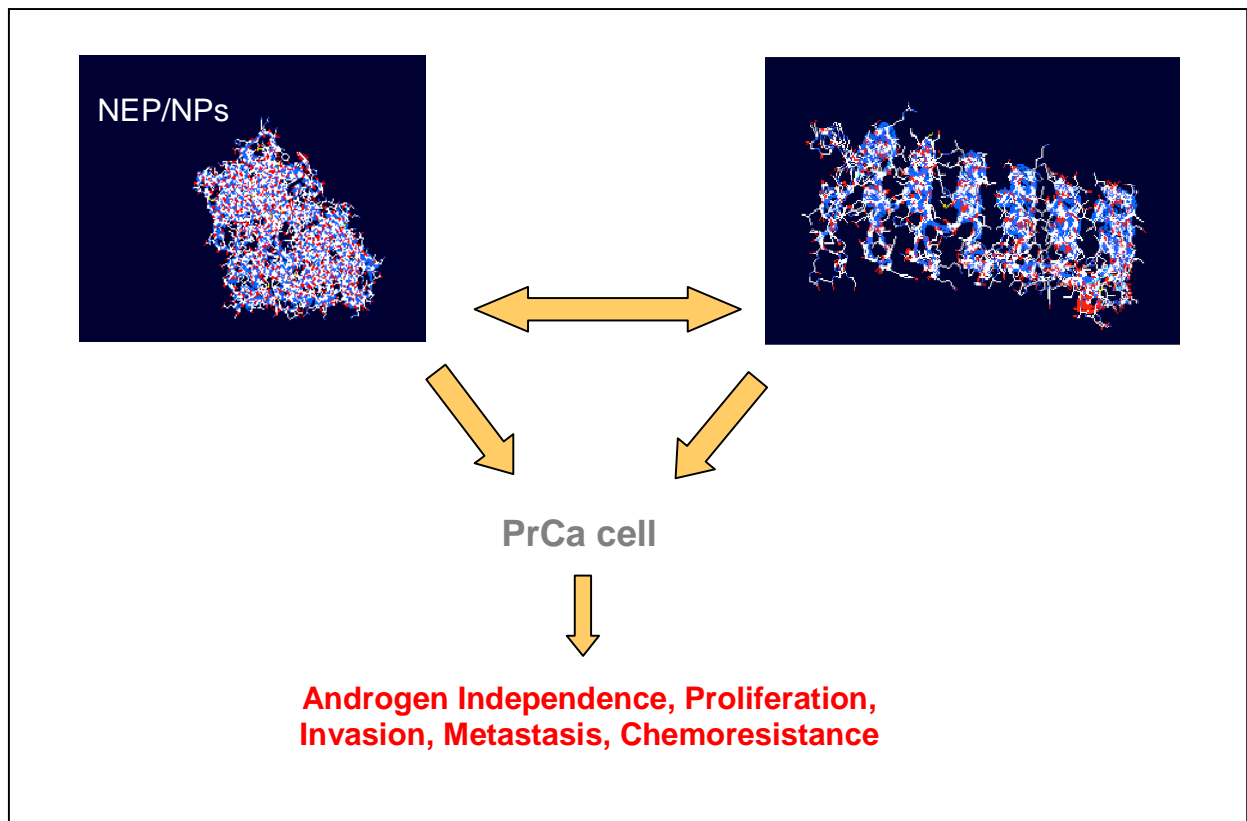
Αυτό στην πράξη θα σήμαινε ότι τα νευροπεπτιδία μπορούν να δράσουν ως διεγέρτες για την ενεργοποίηση του NFκB από την ανενεργό κυτταροπλασματική μορφή και να προκαλέσουν μετατόπιση στον πυρήνα (παρόμοιος μηχανισμός με την δράση των εξωκυττάρων διεγερτών του NFκB).

Για την διερεύνηση αυτής της υπόθεσης, επιλέξαμε την Ενδοθηλίνη-1 (EDN1, GenBank ID: 1906; UniProt Accession No: P05305) και την βομβεσίνη (BOMB_BOMVA, GenBank ID: X52447.1; UniProt Accession No: P84213) [σαν ομόλογο πεπτίδιο της ανθρώπινης GRP (Gastrin-releasing peptide/Bombesin-related peptide) (GRP, GenBank ID: 2922; UniProt Accession No: P07492)] ως αντιπροσωπευτικά νευροπεπτίδια. Αν η υπόθεση μας είναι ορθή, θα πρέπει να αποδειχθούν τα παρακάτω:

↓ επίπεδα και/ή δραστικότητα NEP = ↑ επίπεδα και δράση νευροπεπτιδίων

= ↑ πρωτεασωματική δραστηριότητα = ↑ πρωτεασωματική

αποδόμηση IκB = ↑ δραστηριότητα IKK = ↑ μεταγραφική δραστηριότητα NFκB



Εικόνα 2.1 Ερευνητική Υπόθεση. Οι οδοί NEP/Νευροπεπτιδίων και NFκB/UPS εμπλέκονται και αλληλεπιδρούν στην εξέλιξη του καρκίνου προστάτη

2.2 ΣΤΟΧΟΙ

Οι βασικοί στόχοι αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι οι παρακάτω:

- Διερεύνηση σχέσης μηχανισμών του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/πρωτεασώματος σε σταθερή κατάσταση (baseline)
- Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/πρωτεασώματος μετά από διέγερση με αγωνιστές/ανταγωνιστές των οδών αυτών

2.3 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Δράση 1: Έλεγχος επιπέδων και δραστικότητας NEP/νευροπεπτιδίων σε όλες τις κυτταρικές σειρές

1a. Έλεγχος δραστικότητας NEP σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Χρωμογόνος μέθοδος εκτίμησης ενζυμικής δραστηριότητας (Chromogenic enzyme activity assay)

1b. Έλεγχος επιπέδων NEP σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis)

1c. Έλεγχος μεμβρανικής έκφρασης NEP σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Κυτταρομετρία ροής (NEP surface expression analysis by flow cytometry)

1d. Έλεγχος επιπέδων εκκρινόμενης ET-1 +/- Bombesin (BBS) σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: ELISA

Δράση 2: Έλεγχος επιπέδων και δραστηριότητας NFκB/πρωτεασώματος/IκB σε όλες τις κυτταρικές σειρές

2a. Έλεγχος υποκυτταρικής εντόπισης NFκB σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Ανοσοκυταροχημεία (Immunocytochemistry)

2b. Έλεγχος πυρηνικών/κυτταροπλασματικών επιπέδων NFκB σε όλες τις κυτταρικές σειρές:

Τεχνική: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis)

2c. Έλεγχος σύνδεσης NFκB/DNA σε όλες τις κυτταρικές σειρές:

Τεχνική: Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

2d. Έλεγχος ολικών επιπέδων IκB-α σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis)

2e. Έλεγχος πρωτεασωματικής δραστηριότητας σε όλες τις κυτταρικές σειρές

Τεχνική: Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay)

Δράση 3: Χορήγηση αναστολέα πρωτεασώματος → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 4: Χορήγηση αναστολέα IKK → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 5: Χορήγηση αναστολέα NFκB → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay),

Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 6: Χορήγηση αναστολέα rhNEP → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 7: Χορήγηση ET-1 → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 8: Χορήγηση βομβεσίνης → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 9: Χορήγηση ανταγωνιστή ET_AR και ET-1 → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεάσωμα

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 10: Χορήγηση ανταγωνιστή υποδοχέα βομβεσίνης και βομβεσίνης → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 11: Χορήγηση ET-1 & αναστολέα πρωτεασώματος → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 12: Χορήγηση βομβεσίνης & αναστολέα πρωτεασώματος → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 13: Χορήγηση ET-1 & αναστολέα IKK → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 14: Χορήγηση βομβεσίνης & αναστολέα IKK → έλεγχος επίδρασης στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 15: Χορήγηση ET-1 & αναστολέα NFκB → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 16: Χορήγηση βομβεσίνης & αναστολέα NFκB → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

Δράση 17: Χορήγηση ET-1 & rhNEP → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

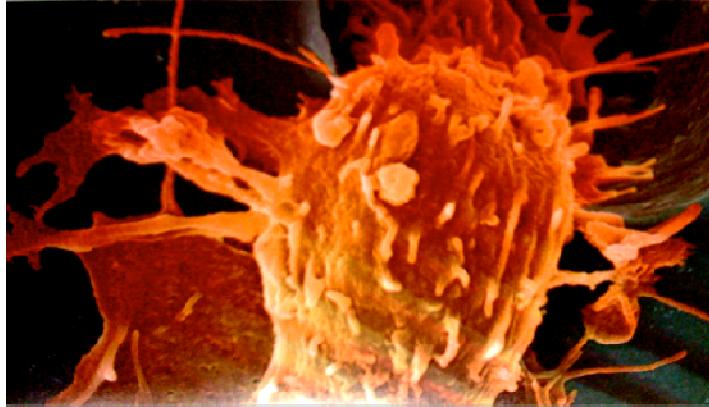
Δράση 18: Χορήγηση βομβεσίνης & rhNEP → έλεγχος αποτελέσματος στην οδό NFκB/πρωτεασώματος

Τεχνικές: Ανάλυση χημειοφωταύγειας ή/και χρωματομετρική με Western blot (Chemiluminescent and/or colorimetric WB analysis), Φθοριομετρική εκτίμηση ενζυμικής δραστηριότητας (20S Proteasome Activity assay), Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry), Ηλεκτροφορητική δοκιμή μετατόπισης κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assay)

2.3 ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ & ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Σχεδιασμός ενισχυμένης αντικαρκινικής δράσης στον προχωρημένο καρκίνο του προστάτη με συνδυαστική χρήση των παρακάτω:

- Αναστολείς πρωτεασώματος
- Αναστολείς NFκB
- rhNEP ή αύξηση της ενδογενούς έκφρασης NEP
- Αναστολείς ET-1 ή υποδοχέων ET-1
- Αναστολείς IKK
- Αύξηση έκφρασης IκB



Κεφάλαιο 3: Υλικά & Μέθοδοι

3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη LnCaP και PC-3 αγοράστηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιιεργειών (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Health Protection Agency, Salisbury, UK) (*Παράρτημα III*). Όλα τα πειράματα έγιναν εντός 6 μηνών από την απόκτηση

της κάθε κυτταρικής σειράς. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η κυτταρική σειρά WT-5, απόγονος της μη ανδρογόνου-εξαρτώμενης, νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης σειράς Tsu-Pr, διαμολυσμένη με φορέα με ένθεση τμήματος κωδικοποίησης του NEP κατασταλλόμενο σε παρουσία τετρακυκλίνης. Η σειρά WT-5 παραχωρήθηκε ευγενώς από τον Dr David Nanus, Weill Medical College, Cornell University, USA. Οι μη διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Euroclone, 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° σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε ειδικό κυτταρικό επωαστήριο (Thermo Electron, UK). Η διαμολυσμένη σειρά καλλιεργήθηκε σε RPMI 1640 που περιείχε 10% FBS, 5% L-γλουταμίνη, 150μg/ml Hygromycin (GIBCO, UK), 500μg/ml Geneticin (GIBCO, UK) και 1μg/ml τετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich, UK). Για την καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό χωρίς τετρακυκλίνη χρησιμοποιήθηκε ειδικό διάλυμα FBS (tetracycline-free FBS, Biochrom). Για τα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που βρίσκονταν σε πυκνότητα 70% με 80% σε φλάσκες καλλιέργειας 25 ml. Για την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε κυτταρολογικά πλακίδια και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό όπως περιγράφεται παραπάνω. Κύτταρα καλλιεργούμενα χωρίς προσθήκη άλλων αντιδραστηρίων χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας τους τα κύτταρα ελέγχονταν για μικροβιακές επιμολύνσεις με έλεγχο σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert 40CFL, Carl Zeiss, Germany) και με χρήση ειδικής διαγνωστικής μεθόδου για μυκόπλασμα (Mycoplasma Detection Kit,

Euroclone, UK). Τα διαλύματα ελέγχονταν πριν την χρήση με ειδικό όργανο μέτρησης pH, και το pH τους προσαρμοζόταν στο επιθυμητό.



Εικόνα 3.1 Ανάστροφο μικροσκόπιο. Μοντέλο Axiovert 40CFL, Carl Zeiss, Germany

Πίνακας 3.1 Έκφραση NEP στις κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη

Μη διαμολυσμένες	
LNCaP	+++ NEP έκφραση +++NEP δραστηριότητα
PC3	- NEP έκφραση

Διαμολυσμένες	
WT-5 (Tsu-Pr transfectant with NEP insert)	<p>Tet-off</p> <p>+++ NEP έκφραση +++ NEP δραστηριότητα</p> <p>Tet-on</p> <p>+ NEP έκφραση (leaky vector) + NEP δραστηριότητα (leaky vector)</p>

Το χρωμογόνο υπόστρωμα Suc-Ala-Ala-Phe-pNa για την μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας NEP αγοράστηκε από την Bachem Biosciences, Germany. Η αμινοπεπτιδάση M(N) (aminopeptidase M or N; EC 3.4.11.2) αγοράστηκε από την Roche SA. Το φθορίζον υπόστρωμα Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC αγοράστηκε από την Calbiochem (Merck Hellas). Το πεπτίδιο ET-1 και ο αναστολέας του υποδοχέα A ενδοθηλίνης (ET_A receptor antagonist BQ123) αγοράστηκαν από την Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Γερμανία. Η βομβεσίνη, ο ανταγωνιστής του υποδοχέα BB₂ (BB₂/GRP-preferring receptor antagonist RC-3095), ο αναστολέας IKK (wedelolactone), ο αναστολέας NFκB (BAY 11-7082), και ο rhTNFα αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich, UK. Η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη NEP παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Dr David Nanus, Weill Cornell Medical College, New York, USA. Ο αναστολέας πρωτεοσώματος (Bortezomib, VELCADE®) αγοράστηκε από τη Janssen-Cilag Pharmaceuticals, Ελλάδα. Το κεκαθαρμένο ένζυμο 20S πρωτεασώματος

προήλθε από την Chemicon International, USA. Ο αναστολέας πρωτεασώματος λακτακυστίνη αγοράστηκε από την Cayman Chemical, 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).

Πίνακας 3.2 Αντιδραστήρια επώασεων

Αντιδραστήριο	Ιδιότητα	Κωδικός	Εταιρία
ET-1	Νευροπεπτίδιο	023-101	Phoenix Pharmaceuticals, Inc
BQ-123	Ανταγωνιστής υποδοχέα ET _A R	023-34	Phoenix Pharmaceuticals, Inc
Βομβεσίνη	Νευροπεπτίδιο	B4272	Sigma Aldrich
RC-3095	Ανταγωνιστής υποδοχέα BB ₂	R9653	Sigma Aldrich
BAY 11-7082	Αναστολέας NFκB	B5556	Sigma Aldrich
Wedelolactone	Αναστολέας IKK	W4016	Sigma Aldrich
Bortezomib	Αναστολέας πρωτεασώματος	n/a	Novocastra
Lactacystin	Αναστολέας	70980	Sigma Aldrich

	πρωτεασώματος		
20S proteasome control	Υπομονάδα πρωτεασώματος	APT280	Chemicon International
rhNEP	Ενδοπεπτιδάση	n/a	Παραχώρηση από Dr D. Nanus
rhTNF α	Αυξητικός παράγοντας	T0157	Sigma Adrich

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

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 (Phosphate-buffered Saline). 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 NEP και 20S πρωτεασώματος ετοιμάσθηκαν ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα με διάλυμα 0.5% CHAPS (3-[3-

cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate) που δεν επηρέασε την ενζυματική δραστηριότητα της NEP και του πρωτεασώματος (*Papandreou et al, 1998*).

3.3 ΠΥΡΗΝΙΚΑ & ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Τα πυρηνικά εκχυλίσματα ετοιμάσθηκαν όπως περιγράφουν οι *Carter et al (1998)* με κάποιες τροποποιήσεις, όπως έχουν περιγραφεί προηγουμένως (*Ouadrhiri Y et al, 2002*). 10^6 κύτταρα αφαιρέθηκαν προσεκτικά με χρήση οργάνου απόξεσης κυττάρων και θρυψίνης, πλύθηκαν σε ψυχρό PBS και συγκεντρώθηκαν σε 400μl διαλύματος ψυχρής λύσης 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 για 20 λεπτά σε πάγο. Το πυρηνικό εναιώρημα στη συνέχεια υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 13.000 rpm, και τα επιπλέοντα πυρηνικά εκχυλίσματα αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.4 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Τα κύτταρα αφαιρέθηκαν προσεκτικά από τις φλάσκες καλλιέργειας με χρήση οργάνου απόξεσης κυττάρων και θρυψίνης, πλύθηκαν δύο φορές σε PBS και επανατοποθετήθηκαν σε υγρό καλλιέργειας, και αναλύθηκαν για κυτταρική επιφανειακή έκφραση CD10 με χρήση φθορίζοντος μονοκλωνικού αντισώματος ινδικού χοιριδίου ενάντι του CD10 (clone ALB1, Beckman Coulter). Χρησιμοποιήθηκε ένα αντι-ανθρώπινο αντίσωμα ινδικού χοιριδίου IgG1-FITC (Beckman Coulter) ως ισότοπος έλεγχος. Η ανάλυση έγινε με κυτταρομετρητή ροής laser Argon and HeNe (Beckman Coulter). Η κυτταρική βιωσιμότητα μετρήθηκε πριν τον κυτταρομετρικό έλεγχο με κυανό του τρυπανίου (Trypan blue exclusion) και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας με ιστόγραμμα FS/SS (forward scatter-side scatter). Η κυτταρομετρία ροής έγινε σε άλλο εργαστήριο επί πληρωμή.

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ NEP

Πραγματοποιήθηκε χρωματομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας NEP στα ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα, με χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος Suc-Ala-Ala-Phe-pNa όπως έχει περιγραφεί (*Papandreou et al, 1998*). Επιγραμματικά, για την μέτρηση της ενζυματικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα Suc-Ala-Ala-Phe-PNA. Ενωρήματα εκχυλίσματος κυτταρικών μεμβρανών (30μl) που παράχθηκαν με λύση με διάλυμα CHAPS όπως περιγράφηκε παραπάνω προστέθηκαν σε ένα

μείγμα με την παρακάτω σύνθεση: 200μl 100mM Tris-HCl, pH 7.6, 10μl 20mM υποστρώματος (διαλυμένο σε δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο) και 10μl διαλύματος αμινοπεπτιδάσης M(N). Το μείγμα ετέθη σε επώαση στους 37°C για 10 λεπτά. Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη διαλύματος 10% τριχλωροοξικού οξέος και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 25000rpm για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, 250μl από το υπερκείμενο συλλέχθηκαν για ανάλυση, μετά από προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε τρυβλία 96 θέσεων. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540nm χρησιμοποιώντας μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac™. Μείγμα χωρίς προσθήκη εκχυλισμάτων κυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση της τιμής του μάρτυρα. Όλα τα πειράματα και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 4 φορές. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου σε βασική κατάσταση (baseline) μετρήθηκε σε πικογραμμομόρια του μετατραπέντος υποστρώματος ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης ανά λεπτό. Οι τιμές συγκρίθηκαν με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που δημιουργήθηκε για το συγκεκριμένο υπόστρωμα και με μια καμπύλη ενζυματικής δραστηριότητας rhNEP που δημιουργήθηκε για υπολογισμό K_m και V_{max} . Διαφορές στην ενζυματική δραστηριότητα NEP μετά από διαφορετικές επώσεις υπολογίστηκαν ως εκατοστιαίο ποσοστό αύξησης ή μείωσης από τα βασικά επίπεδα ενζυματικής δραστηριότητας.

3.6 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ (ET-1 ELISA)

Το υπερκείμενο θρεπτικό καλλιεργητικό υλικό συγκεντρώθηκαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν σε 70%-80% συρροή. Χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος που βασίζεται σε τεχνική double-sandwich, ειδική για την ανίχνευση του πεπτιδίου ET-1 (IBL International). Η ειδικότητα της μεθόδου για την ανίχνευση ενδοθηλίνης 1 είναι 100%, με διασταυρούμενες αντιδράσεις ως εξής: 0.1% για την ενδοθηλίνη 3, και $\leq 0.1\%$ για την ενδοθηλίνη 1 (1-31), την ενδοθηλίνη 2 (1-31) και την μεγάλη ανθρώπινη ενδοθηλίνη 1. Το χρωμογόνο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αντίδρασης ήταν διάλυμα TMB (υπόστρωμα υπεροξειδάσης [HRP] για ELISA).

Η απορρόφηση μετρήθηκε σε 450nm σύμφωνα με τις προδιαγραφές του πακέτου με τη χρήση μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac™, όπως πιο πάνω. Η συγκέντρωση ET-1 στο υπερκείμενο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας κυττάρων υπολογίσθηκε σε pg/ml με βάση υπολογισμένη πρότυπη καμπύλη απορρόφησης.

3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ 20S ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

Η χυμοθρυψική δραστηριότητα 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-μεθύλ-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 4 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

κεκαθαρμένου πρωτεοσώματος 20S που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι αλλαγές στην πρωτεασωματική δραστηριότητα μετά τις διάφορες επωάσεις εκφράσθηκαν ως ποσοστιαία αύξηση ή μείωση σε σχέση με τη δραστηριότητα σταθερής κατάστασης κάθε κυτταρικής σειράς.

3.8 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOTTING)

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 αντισώματα ενάντια στο CD10 (clone 56C6, mouse monoclonal, Novocastra), την υπομονάδα p65 του NFκB (F-6 μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου και C-20, πολυκλωνικό

αντίσωμα αιγός, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), στο IκB-α (C-15, πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου και H-4, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Πρωτογενές αντίσωμα ενάντια στην ακτίνη (κλώνος AC-40, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Sigma Aldrich, UK και C-2, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS/Tween.

Πίνακας 3.3 Πρωτογενή αντισώματα *Western blotting*

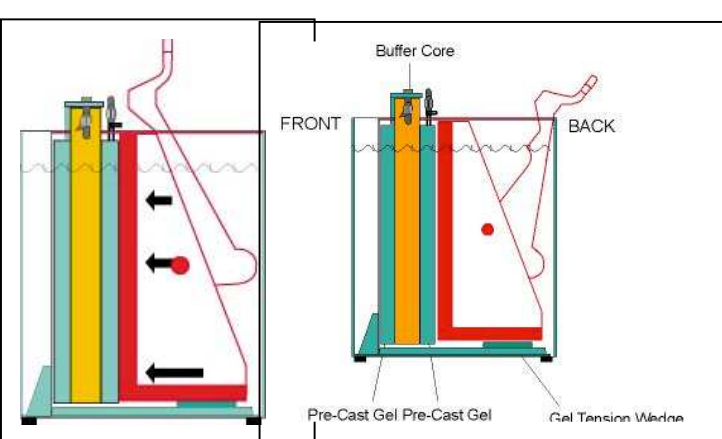
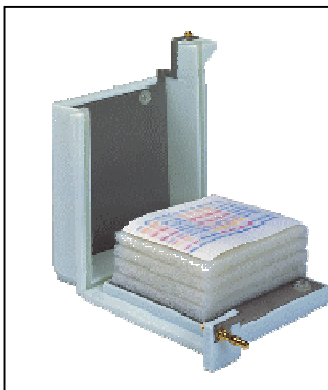
Αντίσωμα	Κλώνος	Τύπος	Κωδικός	Εταιρία
NFκB (p65)	F6	Mouse monoclonal	sc-8008	SCBT
NFκB (p65)	C-20	Goat polyclonal	sc-372	SCBT
IκB-α	C-15	Goat polyclonal	Sc-203	SCBT
IκB-α	H-4	Mouse monoclonal	sc-1843	SCBT
CD10	56C6	Mouse monoclonal	NCL-CD10- 270	Novocastra
Actin	AC-40	Mouse monoclonal	A3853	Sigma Aldrich
Actin	C-2	Mouse monoclonal	Sc-8432	SCBT



Οι επωάσεις με τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα

Εικόνα 3.2 Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς. XCell Sure Lock Mini Cell unit (πάνω αριστερά); XCell II Blot module (πάνω δεξιά); XCell Sure Lock Mini Cell & Blot unit – locked (κάτω αριστερά); XCell Sure Lock Mini Cell & Blot unit – unlocked (κάτω δεξιά)

έγιναν σε διάλυση 1:2500 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS/Tween για άλλες τρεις φορές. Χρησιμοποιήθηκε τόσο χρωματομετρική μέθοδος ανίχνευσης (Opti4CN Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Inc), όσο και ανίχνευση χημειοφωτισύγειας (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 τουλάχιστον 3 φορές.

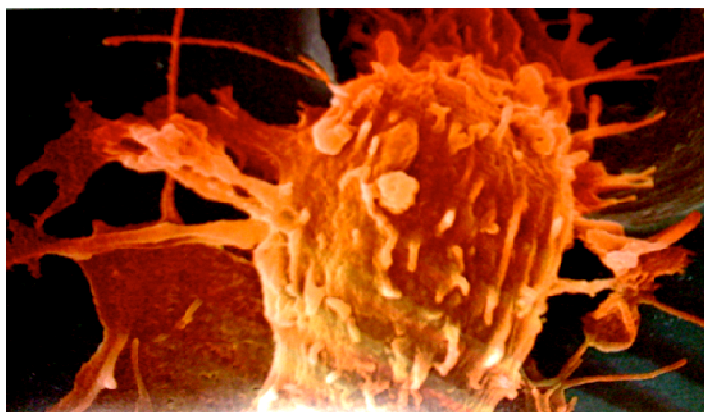


3.9 ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

Τα κύτταρα απλώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε γυάλινα κυτταρολογικά πλακίδια σε θρεπτικό υλικό όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όταν έφτασαν σε πυκνότητα κυτταρικής αύξησης 70-80%, τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν με σπρέυ στερέωσης Merckofix® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) και έγινε συμβατική ανοσοϊστοχημεία αβιδίνης-βιοτίνης. Χρησιμοποιήθηκαν το σύστημα αυτόματης χρώσης πλακιδίων Ventana NexES Automated Slide Stainer και τα σχετικά αντιδραστήρια Ventana. Τα δείγματα βυθίστηκαν σε διάλυμα κιτρικού άλατος (pH 7.3) και θερμάνθηκαν για 15 λεπτά στα 350W σε φούρνο μικροκυμάτων (τα κύτταρα LnCaP δεν υποβλήθηκαν σε θέρμανση). Στη συνέχεια επώασθησαν με 3% H₂O₂ για 4 λεπτά για να κορεσθεί η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτογενές αντίσωμα ενάντια στην υπομονάδα p65 του NFκB σε διάλυμα 1:100 (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra). Χρησιμοποιήθηκε διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο για την ανίχνευση των αντιγόνων. Έγινε επώαση με θειικό άλας χαλκού για ενίσχυση της χρωματικής αντίδρασης. Τα πλακίδια τέλος χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για εξέταση με ανάστροφο μικροσκόπηση. Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο Κυτταρολογικό Τμήμα Α.Ν.Θ. "Θεαγενείου", Θεσσαλονίκη.

3.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (EMSA)

Ως ολιγονουκλεοτίδιο αναγνώρισης NFκB χρησιμοποιήσαμε το στοιχείο PRDII (*Thanos and Maniatis, 1995*) του ενισχυτή ανθρώπινης IFN-βήτα (5'-TGGCCAACAT**GGTCAAACCCCGTTTCTACT**-3') (IMBB, Microchemistry Laboratory), σεσημασμένο με [γ -³²P]ATP με χρήση T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης. Ο ανιχνευτής (probe) διαχωρίστηκε μέσω της χρωματογραφικής στήλης G50 (Amersham Biosciences) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανάλυση. Εν συντομία, 3μg πυρηνικών εκχυλισμάτων επώασθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά με 100ng σεσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου διπλής έλικας, παρουσία 20ng Polydl-dC (PIERCE Endogen, UK) και 20μg BSA. Πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa (ECACC, UK), 6 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με τον παραμυξοϊό Sendai (στέλεχος Cantell) και μετά από επώαση με TNF α για 1 ώρα, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Για τον προσδιορισμό supershift (φαινόμενο υπερμετακίνησης), πυρηνικά εκχυλίσματα επώασθηκαν με 1μg αντι-p65 πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) για 30 λεπτά στους 4°C, πριν την προσθήκη του ανιχνευτή. Τα συμπλέγματα πρωτεΐνης-DNA απομονώθηκαν σε 7% μη-αποδιατακτική γέλη πολυακρυλαμιδίου και οι μπάντες έγιναν ορατές με Taefun Phosphor-Imager/Scanner με χρήση του λογισμικού ανάλυσης ImageQuant™ TL (Amersham Biosciences). Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.

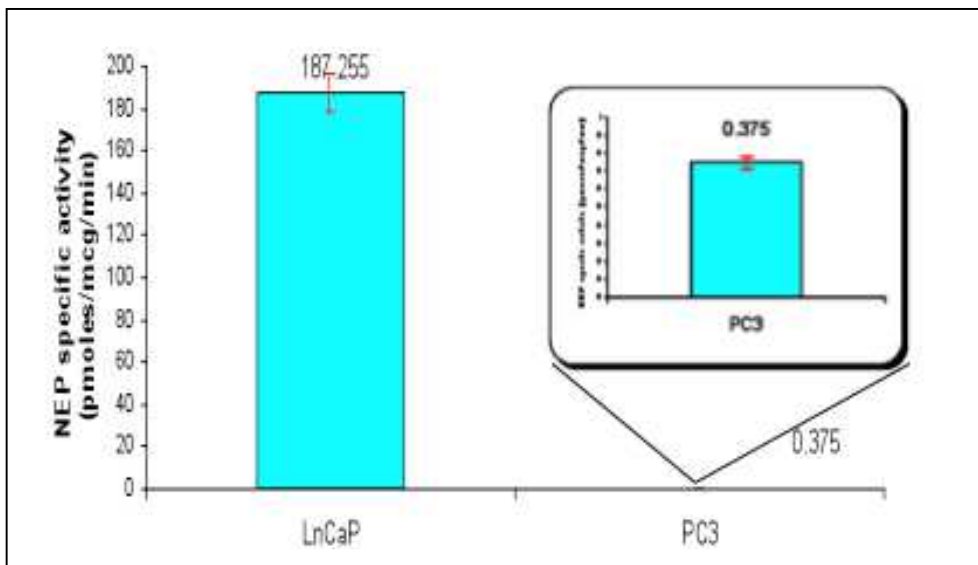


Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

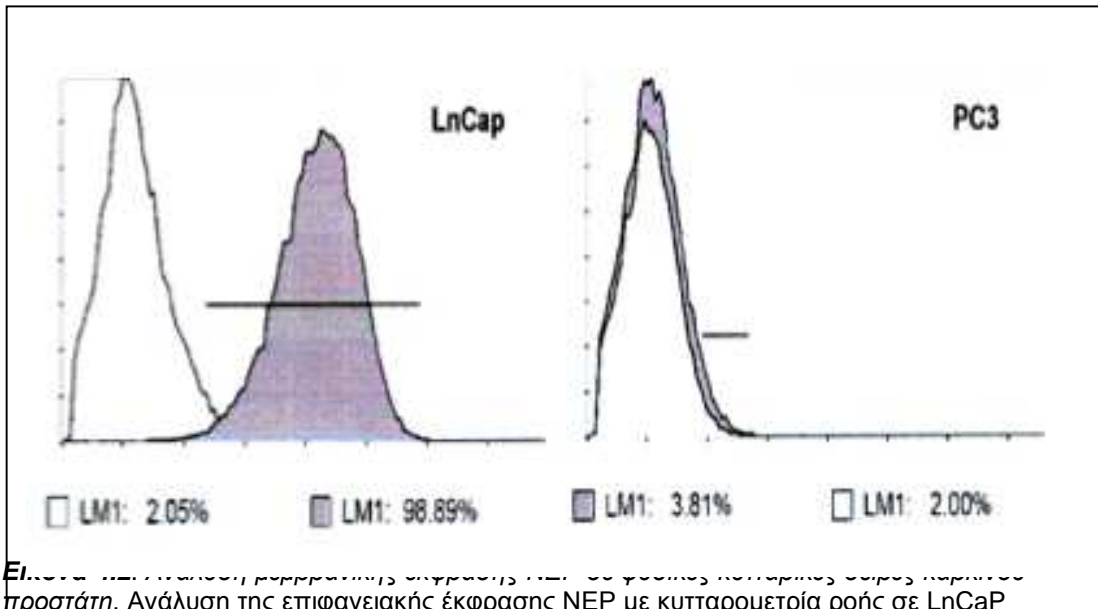
4.1 ΑΞΟΝΑΣ ΝΕΡ/ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

4.1.1 Ανάλυση Φυσικών Κυτταρικών Σειρών

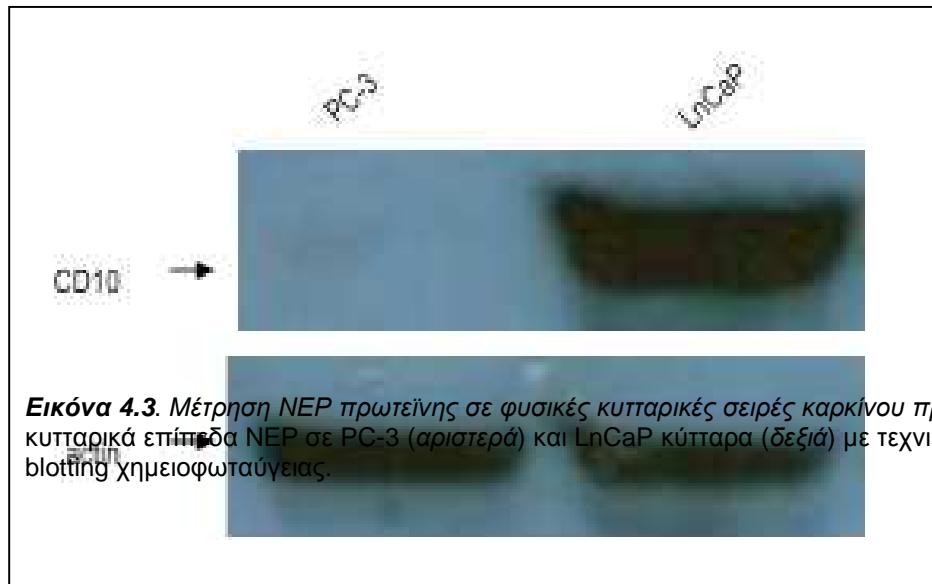
Η μεμβρανική έκφραση NEP των κυτάρων LnCaP σε σταθερή κατάσταση υπολογίσθηκε ότι ήταν σε επίπεδο 99% (MFI=30). Η ενζυματική δραστηριότητα NEP στα κύτταρα LnCaP ήταν 187 pmoles μετατραπέντος υποστρώματος ανά μικρογραμμάριο πρωτεΐνης ανά λεπτό. Τα κύτταρα PC-3 ήταν αρνητικά για έκφραση NEP στην ανάλυση FCM, ενώ παρουσίασαν αμελητέα ενζυματική δραστηριότητα NEP (0.375 pmoles/μg/λεπτό) (Εικόνες 4.1 & 4.2). Ο υπολογισμός της ποσότητας πρωτεΐνης NEP στα ολικά πρωτεϊνικά κυτταρολύματα με Western blot ήταν σύμφωνος με τα παραπάνω, παρουσιάζοντας μπάντα αυξημένης έντασης για τα κύτταρα LnCaP και απουσία μπάντας για τα κύτταρα PC-3 (Εικόνα 4.3) (Παραρτήματα ΙΧ, Χ, ΧΙ).



Εικόνα 4.1. Ανάλυση της ειδικής δραστηριότητας NEP σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Ειδική δραστηριότητα NEP (pmoles/μg/min) σε LnCaP (αριστερά, 187.255, TA: 2.84) και σε PC-3 κύτταρα (δεξιά; 0.375, TA: 0.03). Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).



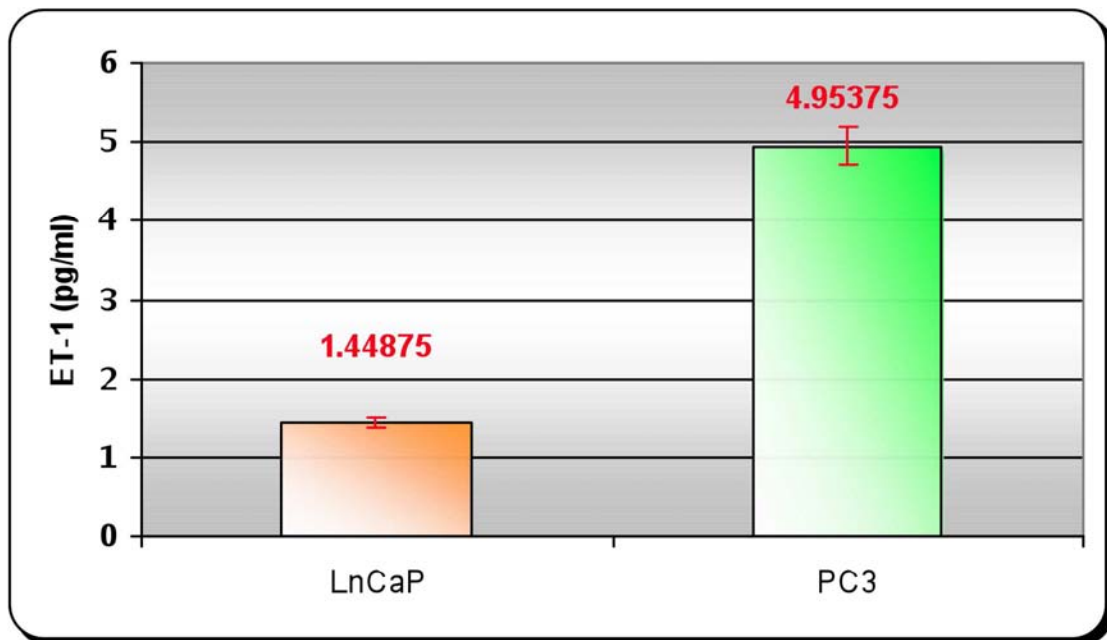
Εικόνα 4.2. Ανάλυση της επιφανειακής έκφρασης NEP σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Ανάλυση της επιφανειακής έκφρασης NEP με κυτταρομετρία ροής σε LnCaP (αριστερά) και σε PC-3 κύτταρα (δεξιά) (κλώνος ALB1, Becton Coulter). Όλες οι μετρήσεις έγιναν 3 φορές ($p < .001$).



Εικόνα 4.3. Μέτρηση NEP πρωτεΐνης σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Ολικά κυτταρικά επίπλο NEP σε PC-3 (αριστερά) και LnCaP κύτταρα (δεξιά) με τεχνική Western blotting χημιοφωταύγειας.

H

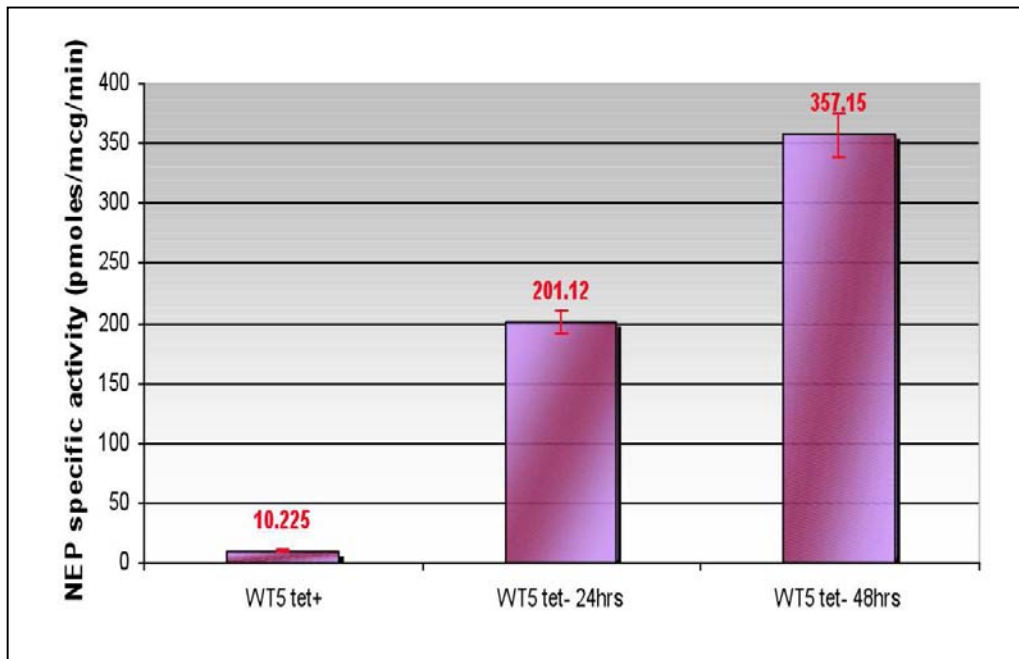
συγκέντρωση εκκρινόμενης ET-1 στο υπερκείμενο θρεπτικό υλικό κυτταρικών καλλιεργειών ήταν 1.45pg/ml για την σειρά LnCaP και 4.95 pg/mg για την σειρά PC3 (*Εικόνα 4.4*) (*Παράρτημα XII*).



Εικόνα 4.4. Μέτρηση εκκρινόμενης ET-1 σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Ανίχνευση ET-1 με ELISA σε υπερκείμενο θρεπτικό υλικό κυτταρικής καλλιέργειας σε LnCaP (αριστερά; 1.448, TA: 0.06) και σε PC-3 κύτταρα (δεξιά; 4.953, TA: 0.49). Όλες οι μετρήσεις έγιναν οκτώ φορές ($p < .001$).

4.1.2 Ανάλυση Διαμολυσμένης Κυτταρικής Σειράς

Η ανάλυση της διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς WT-5 συμβάδιζε με τα παραπάνω αποτελέσματα. Η προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας κατέστειλε την έκφραση του NEP ενθέτου όπως αναμενόταν, με αποτέλεσμα χαμηλή δραστηριότητα NEP (10.22 ± 0.44 pmoles/μg/min). Όταν αφαιρέθηκε η τετρακυκλίνη από το υγρό της καλλιέργειας, η δραστηριότητα NEP αυξήθηκε κατά 35 φορές με χρονοεξαρτώμενο τρόπο (357.15 ± 1.79 pmoles/μg/min, $p < 0.001$) (Εικόνα 4.5) (αποτελέσματα παρόμοια με προηγούμενα [*Sumitomo et al, 2000; Dai et al, 2001*]) (Παράρτημα IX).



Εικόνα 4.5. Ανάλυση ειδικής δραστηριότητας NEP σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη. Ειδική δραστηριότητα NEP (pmoles/μg/min) σε κύτταρα WT-5 που καλλιεργήθηκαν σε 1μg/ml τετρακυκλίνης (αριστερά; 10.225, TA: 0.44), και σε 24 ώρες (μέσον; 201.12, TA : 0.9) και σε 48 ώρες (δεξιά, 357.15, TA : 1.79) μετά την αφαίρεση της τετρακυκλίνης από το υγρό της καλλιέργειας. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

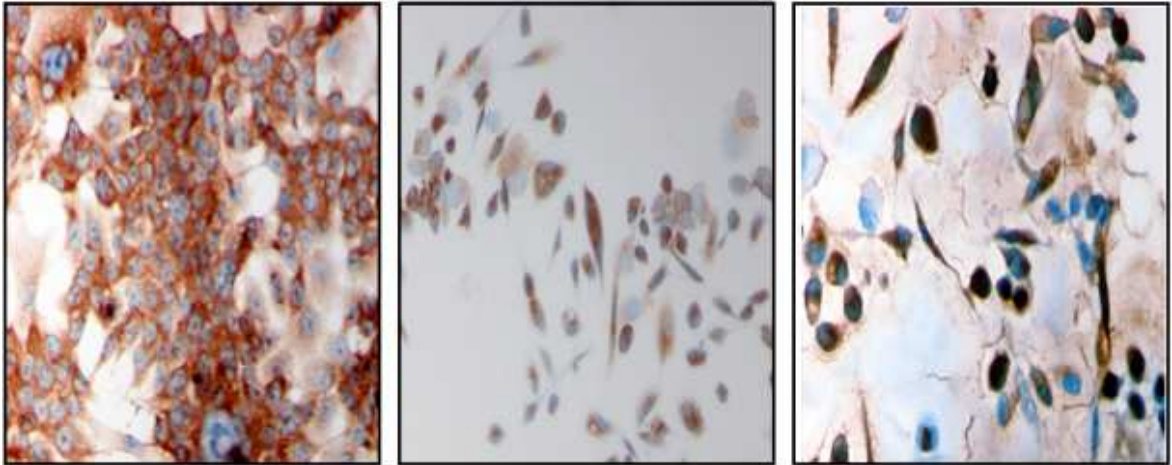
4.2 ΑΞΟΝΑΣ NFκB/UPS ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

4.2.1 Ανάλυση Φυσικών Κυτταρικών Σειρών

4.2.1.1 Υποκυτταρική εντόπιση NFκB

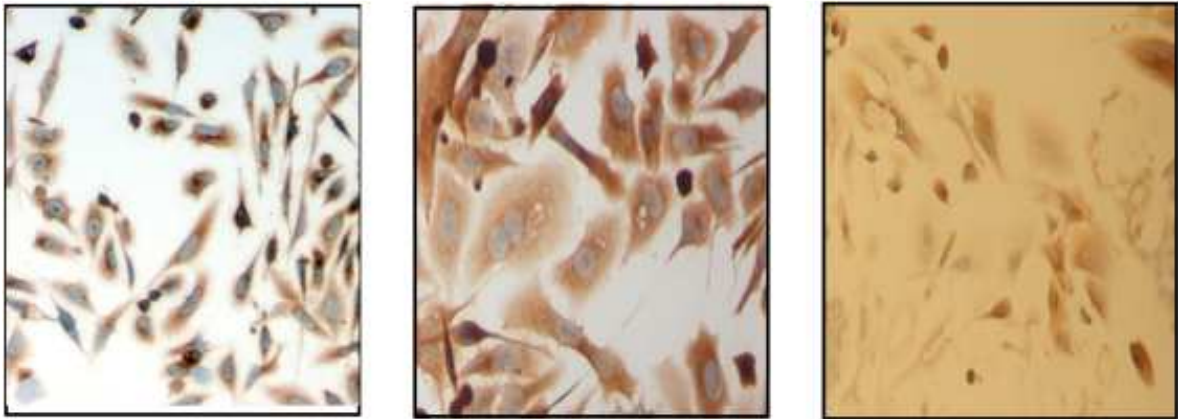
Σε ανάλυση ανοσοκυτταροχημικού ελέγχου, τα κύτταρα LnCaP παρουσίασαν σχεδόν εξ ολοκλήρου κυτταροπλασματική εντόπιση του NFκB, ενώ τα κύτταρα PC-3 παρουσίασαν μικτή πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση

(συνδυασμός κυτταροπλασματικής, μικτής ή αμιγούς πυρηνικής εντόπισης)
([Εικόνα 4.6](#)).



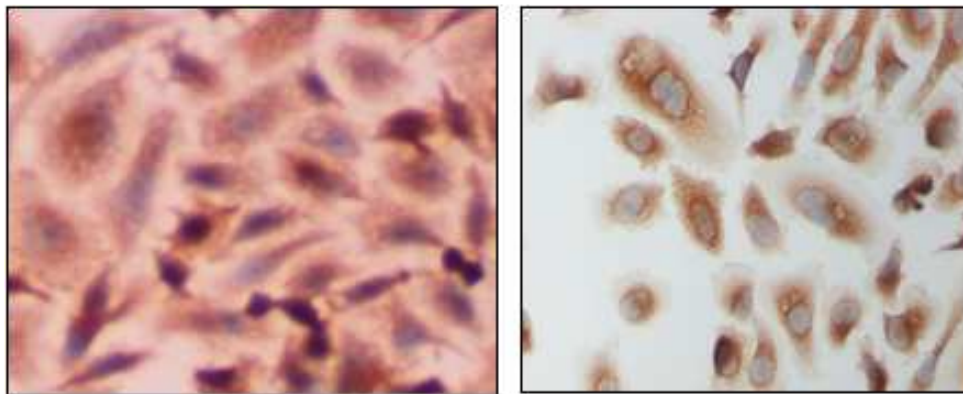
Εικόνα 4.6. Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Έκφραση NFκB με ICC. Κύτταρα LnCaP (αριστερά, x10) και PC-3 (κέντρο [x10] και δεξιά [x40]) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

Όπως αναμενόταν, η χρήση αναστολέων του UPS (αναστολείς NFκB, IKK και 20S πρωτεασώματος) μετέτρεψε τη μικτή εντόπιση του NFκB στα κύτταρα PC-3 σε κυτταροπλασματική ([Εικόνα 4.7](#)). Η χρήση αναστολέων του UPS, όπως αναμενόταν, δεν είχε επίδραση στη υποκυτταρική εντόπιση του NFκB στα κύτταρα LnCaP που παρέμεινε κυτταροπλασματική ([Παράρτημα IV](#)). Η υψηλότερη συγκέντρωση ή μεγαλύτερης διάρκειας επώαση με δύο από αυτούς τους αναστολείς (αναστολέας NFκB BAY-7082 50μM για 16 ώρες, αναστολέας IKK wedelolactone 50μM για 5 ώρες) και στις δυο σειρές οδήγησε σε αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων (αποστρογγυλεμένα, αποπτωτικής μορφολογίας).



Εικόνα 4.7. Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του *NFκB* με χρήση αναστολέων *UPS* σε κύτταρα *PC-3*. Έκφραση *NFκB* με ICC, κύτταρα *PC-3*. Επώσεις με βορτεζομίμη 1μM (60 λεπτά) (αριστερά, x10); wedelolactone 50μM (90 λεπτά) (κέντρο, x40); Bay-7082 20μM (16 ώρες) (δεξιά, x10) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

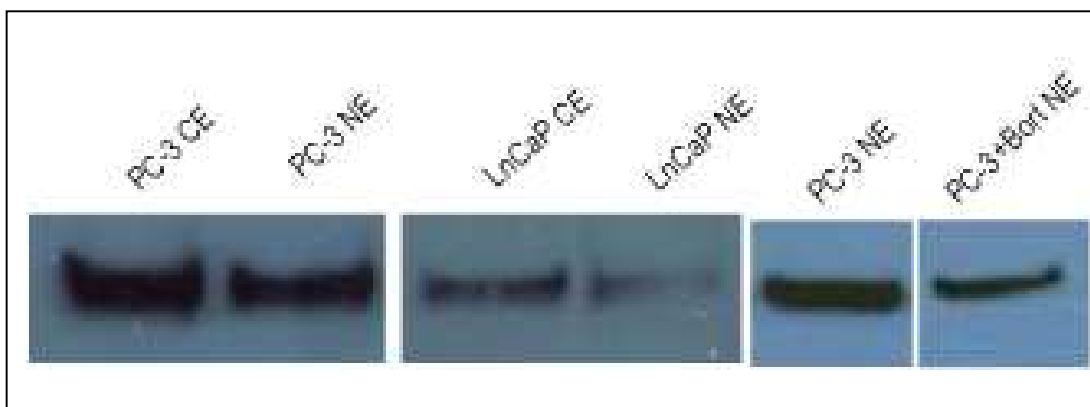
Επώαση της σειράς *PC-3* (που δεν εκφράζει *NEP*) με *rhNEP* ελεγχθείσας υψηλής ενζυματικής δραστηριότητας (50μg/ml για 72 ώρες) μετέτρεψε την μικτή εντόπιση του *NFκB* σε αμιγώς κυτταροπλασματική (**Εικόνα 4.8**).



Εικόνα 4.8. Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του *NFκB* με χρήση *rhNEP* σε κύτταρα *PC-3*. Έκφραση *NFκB* με ICC, κύτταρα *PC-3*. Αριστερά: Σταθερή κατάσταση (x40); Δεξιά: επώαση με *rhNEP* 50μg/ml (72 ώρες) (x40) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

4.2.1.2 Πυρηνική & κυτταροπλασματική πρωτεΐνη NFκB

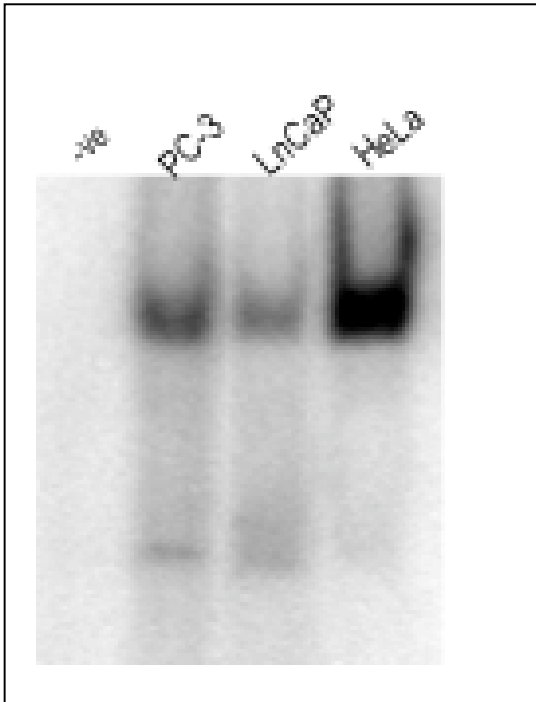
Η ανάλυση western blot των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων σε κύτταρα LnCaP έδειξε λιγότερη πυρηνική πρωτεΐνη NFκB και μικρότερη ποσότητα κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης σε σύγκριση με κύτταρα PC-3, τα οποία εμφάνιζαν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα τόσο πυρηνικής όσο και κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης NFκB. Η επώαση βορτεζομίμπης, όπως προβλεπόταν, οδήγησε σε μειωμένη ποσότητα πυρηνικού NFκB στα κύτταρα PC-3 (Διάγραμμα 4.9) (Παράρτημα V).



Εικόνα 4.9. Ανάλυση πυρηνικής & κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης NFκB σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Αριστερά και κέντρο: Κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα σε PC-3 και LnCaP κύτταρα; Δεξιά: κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα PC-3 κυττάρων σε σταθερή κατάσταση και μετά από επώαση με βορτεζομίμπη 1μM (90 λεπτά). Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου έναντι της υπομονάδας p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

4.2.1.3 Ανίχνευση δέσμησης NFκB/DNA

Η χρήση μιας πιο ευαίσθητης τεχνικής, όπως η EMSA, ανίχνευσε σήμα σύνδεσης του NF-κB με το DNA στα κύτταρα LnCaP, ασθενέστερο όμως σε σύγκριση με τα κύτταρα PC-3 (*Εικόνα 4.10*). Η χρήση αναστολέα IKK, όπως αναμενόταν, μείωσε ιδιαίτερως αισθητά την ένταση του σήματος δέσμευσης (*Παράρτημα VI*).

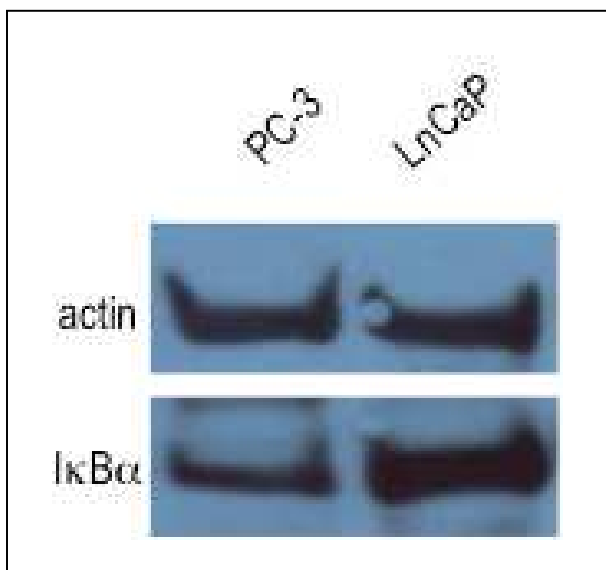


Εικόνα 4.10. Ανίχνευση δέσμευσης NFκB/DNA σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. Ανάλυση με τεχνική EMSA. Στήλη 1: μάρτυρας, Στήλη 2: κύτταρα PC-3, Στήλη 3: κύτταρα LnCaP, Στήλη 4: κύτταρα HeLa (6 ώρες μετά τη μόλυνση με παραμυξοϊό Sentai) (αντι-p65, πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

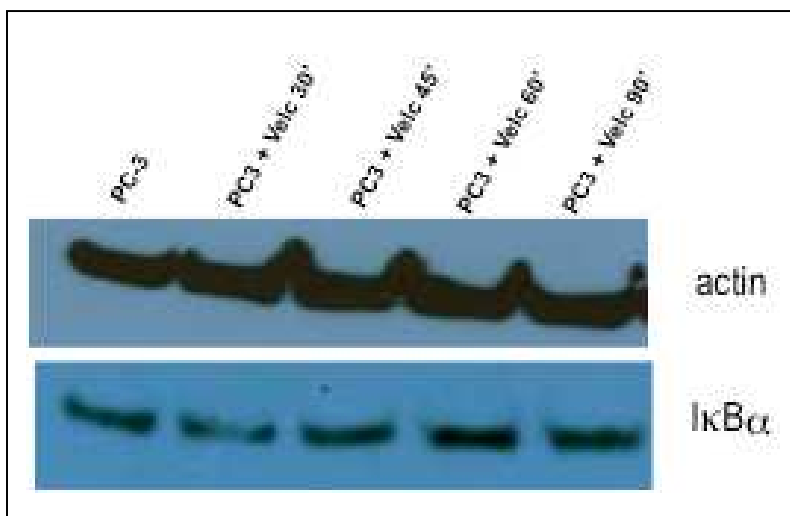
4.2.1.4 Κυτταρικά επίπεδα IκB-α

Τα κύτταρα LnCaP έδειξαν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα ολικής πρωτεΐνης IκB-α, σε σύγκριση με τα κύτταρα PC-3 (*Εικόνα 4.11*). Η επίδραση του αναστολέα πρωτεασώματος στα επίπεδα του IκB-α, που έχει καταδειχθεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία, επίσης αποδείχθηκε σε σειρά επωάσεων της βορτεζομίμπης μόνο σε κύτταρα PC-3. Καταγράφηκε μια σταδιακή χρονοεξαρτώμενη αύξηση της

συνολικής ποσότητας IκB-α, με μέγιστη τιμή στην επώαση των 60 λεπτών. Στην επώαση των 90' η ποσότητα IκBα παρουσίασε μικρή μείωση, σε σχέση με τη μέγιστη ποσότητα, γεγονός που συμβαδίζει με την αναστρέψιμη φύση της αναστολής της βορτεζομίμπης (*Papandreou et al, 2004*) (*Εικόνα 4.12*) (*Παράρτημα VII*).



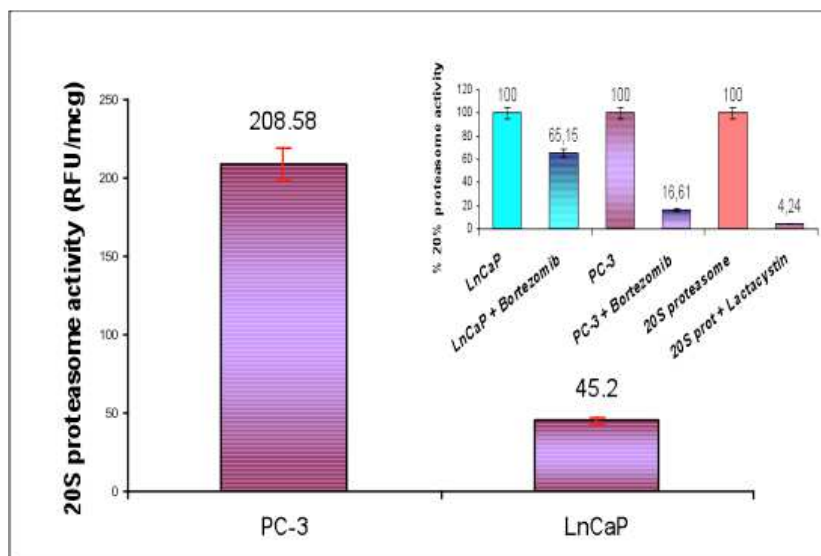
Εικόνα 4.11. Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη. PC-3 (αριστερά) και LnCaP κύτταρα (δεξιά). Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).



Εικόνα 4.12 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 μετά από διαδοχικές επωάσεις με αναστολέα πρωτεασώματος (VELCADE®). Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

4.2.1.5 Ενζυματική δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος

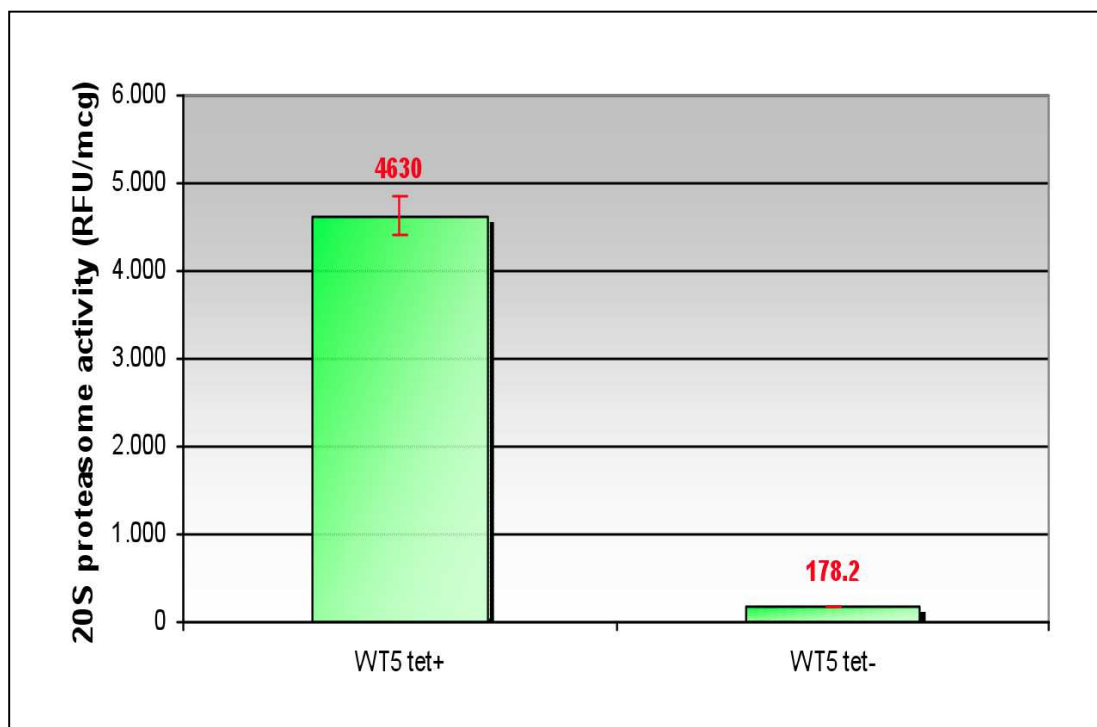
Η μέτρηση της δραστηριότητας της υπομονάδας 20S του πρωτεασώματος έδειξε την αντίστροφη σχέση ανάμεσα στα LnCaP και στα κύτταρα PC-3, σε σύγκριση με τη δραστηριότητα NEP. Τα κύτταρα LnCaP παρουσίασαν χαμηλή δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος (45.2 RFU/μg πρωτεΐνης), ενώ τα κύτταρα PC-3 είχαν πολύ εντονότερη δραστηριότητα (208.6 RFU/μg πρωτεΐνης, $p < 0.001$). Η επώαση με τον αναστολέα του πρωτεασώματος βορτεζομίμπη (1μM για 60 λεπτά) επέφερε σημαντική αναστολή του πρωτεασώματος στα κύτταρα PC-3 (17% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης) και μέτρια αναστολή στα κύτταρα LnCaP (65% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης). Η αναστολή των κυττάρων PC-3 ήταν παρόμοια με την αναστολή που επέφερε η λακτακυστίνη στην πρωτεΐνη μάρτυρα πρωτεασώματος 20S (Εικόνα 4.13).



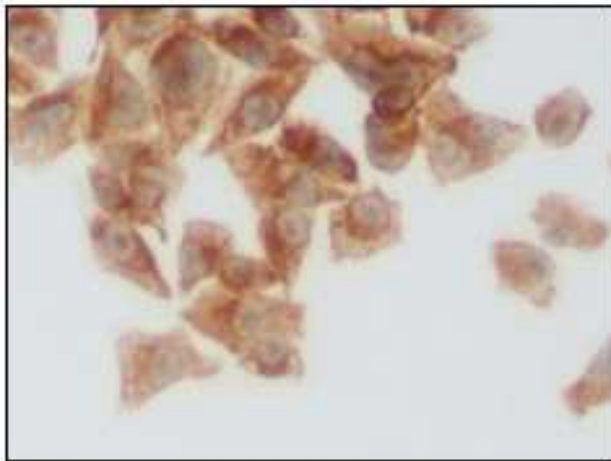
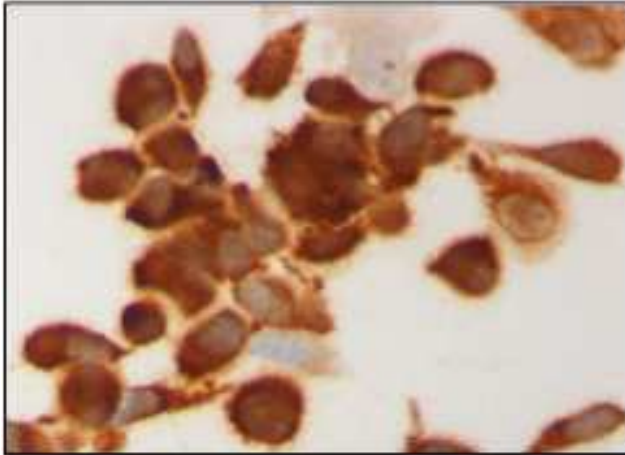
Εικόνα 4.13 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη (RFU/μg). Κύτταρα PC-3 (αριστερά, 208.58, TA: 3.24) και LnCaP (δεξιά, 45.2, TA: 0.2). Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$). Μικρό γράφημα: % αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος 20S μετά από επώαση με βορτεζομίμπη στα κύτταρα LnCaP (αριστερά) και στα κύτταρα PC-3 (κέντρο), % αναστολή δραστηριότητας του μάρτυρα 20S πρωτεασώματος από τη λακτακυστίνη (δεξιά). Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

4.2.2 Ανάλυση Διαμολυσμένης Κυτταρικής Σειράς

Η ανάλυση της σειράς WT-5 έδειξε ότι, σε καλλιέργεια σε περιβάλλον τετρακυκλίνης, τα κύτταρα έδειξαν πολύ μεγάλη πρωτεασωματική δραστηριότητα (4.630 RFU/μg) και μικτή πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση NFκB. Όταν αφαιρέθηκε η τετρακυκλίνη από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, η πρωτεασωματική δραστηριότητα μειώθηκε σημαντικά κατά 26 φορές σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε παρουσία τετρακυκλίνης (178.2 RFU/μg, $p < 0.001$), ενώ τα κύτταρα παρουσίασαν κυρίως κυτταροπλασματική εντόπιση NFκB (Εικόνες 4.14 & 4.15) (Παραρτήματα IV & VIII).



Εικόνα 4.14 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη. Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος (RFU/μg) σε κύτταρα WT-5 που καλλιεργήθηκαν σε 1 μg/ml τετρακυκλίνης (αριστερά; 4630, TA: 109.73), και σε 48 ώρες (δεξιά, 178.2, TA: 12.62) μετά την αφαίρεση της τετρακυκλίνης από το υγρό της καλλιέργειας. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).



Εικόνα 4.15 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης $NF\kappa B$ σε διαμολυσμένη κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη. Έκφραση $NF\kappa B$ με ICC. Πάνω: κύτταρα WT-5 σε καλλιέργεια σε $1\mu g/ml$ τετρακυκλίνης τετρακυκλίνης ($\times 40$), Κάτω: κύτταρα WT-5 48 ώρες αφού αφαιρέθηκε η τετρακυκλίνη ($\times 40$) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

Συνολικά, το προφίλ των αναλυθέντων κυτταρικών σειρών αναφορικά με συνιστώσες του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού $NF\kappa B/UPS$ φαίνεται στον [Πίνακα 4.1](#).

Πίνακας 4.1 Ανάλυση του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων και της οδού NFκB/UPS σε σταθερή κατάσταση

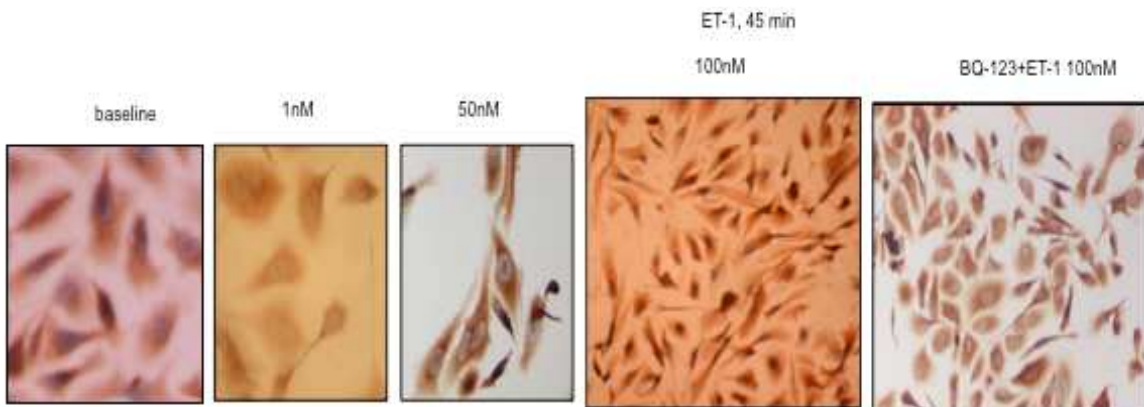
	AD		AI	
	LnCaP	WT-5 tet- (48hrs)	PC-3	WT-5 tet+
Ειδική δραστηριότητα NEP (pmoles/μg/min)	187.25	357.15	0.375	10.225
Επιφανειακή έκφραση NEP (%)	98.89	-	3.81	-
Επίπεδα NEP πρωτεΐνης	Υψηλά	-	Αμελητέα	-
Επίπεδα εκκρινόμενης ET-1 (pg/ml)	1.44	-	4.95	-
Υποκυτταρική εντόπιση NFκB	Κυτταροπλασματική	Κυτταροπλασματική	Μικτή	Μικτή
Επίπεδα πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB	Χαμηλά	-	Υψηλά	-
Σύνδεση NFκB-DNA	Χαμηλή	-	Έντονη	-
Ολικά κυτταρικά επίπεδα πρωτεΐνης IκBα	Υψηλά	-	Χαμηλά	-
Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος (RFU/μg)	45.2	178.2	208.58	4630

4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η βιωσιμότητα των κυττάρων LnCaP σε σταθερή κατάσταση υπολογίσθηκε ότι ήταν 87.5% με την μέθοδο χρώσης με κυανό του τρυπανίου, και 82% στον αποκλεισμό FW-SS. Η βιωσιμότητα των κυττάρων PC-3 υπολογίσθηκε ότι ήταν 100% και 85% αντίστοιχα. Η επώαση με ET-1 (100nM για 45 λεπτά) αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων LnCaP σε 90% και 97% αντίστοιχα. Η επώαση με BBS (100nM για 45 λεπτά) οδήγησε σε βιωσιμότητα 95% και 98% αντίστοιχα. Μεγαλύτερης διάρκειας επώαση με ET-1 (100nM για 72 ώρες) αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων LnCaP σε 97% και 98% αντίστοιχα.

4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ NFκB

Καθώς δεν υπήρχε προηγούμενη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της ενδοθηλίνης στη υποκυτταρική εντόπιση του NFκB σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, σχεδιάσθηκε μια σειρά επώσεων αυξανόμενου χρόνου και συγκέντρωσης. Η επώση των κυτάρων PC-3 με διαφορετικές συγκεντρώσεις ET-1 δεν έδειξε σαφή επίδραση στην υποκυτταρική εντόπιση του



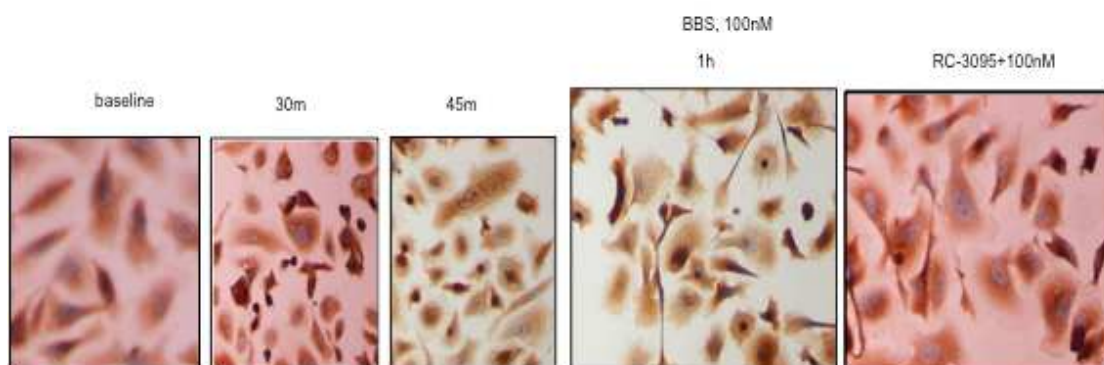
NFκB σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1nM ή 50nM). Όμως, υψηλότερη συγκέντρωση ET-1 (100nM) οδήγησε σε πυρηνική μετακίνηση του NFκB στη μεγάλη πλειονότητα των κυττάρων. Αυτή η επίδραση ήταν χρονοεξαρτώμενη, αρχόμενη από την επώση των 30 λεπτών, ενώ σταδιακά εντεινόταν στις επώσεις των 45 και των 60 λεπτών. Αυτή η επίδραση εμποδίσθηκε απόλυτα με την προ-επώση με έναν επιλεκτικό ανταγωνιστή του υποδοχέα ET_A (1μM για 30 λεπτά) (*Εικόνα 4.16*).

Εικόνα 4.16 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1.

Έκφραση NFκB από ICC, κύτταρα PC-3. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση (x40); επώση με ET-1 1nM x45min (x40); επώση με ET-1 50nM x 45min (x20); επώση με ET-1 100nM x45min (x40); επώση με BQ-123 1μM x30min ακολουθούμενο από επώση με ET-1 100nM x45min (x10) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

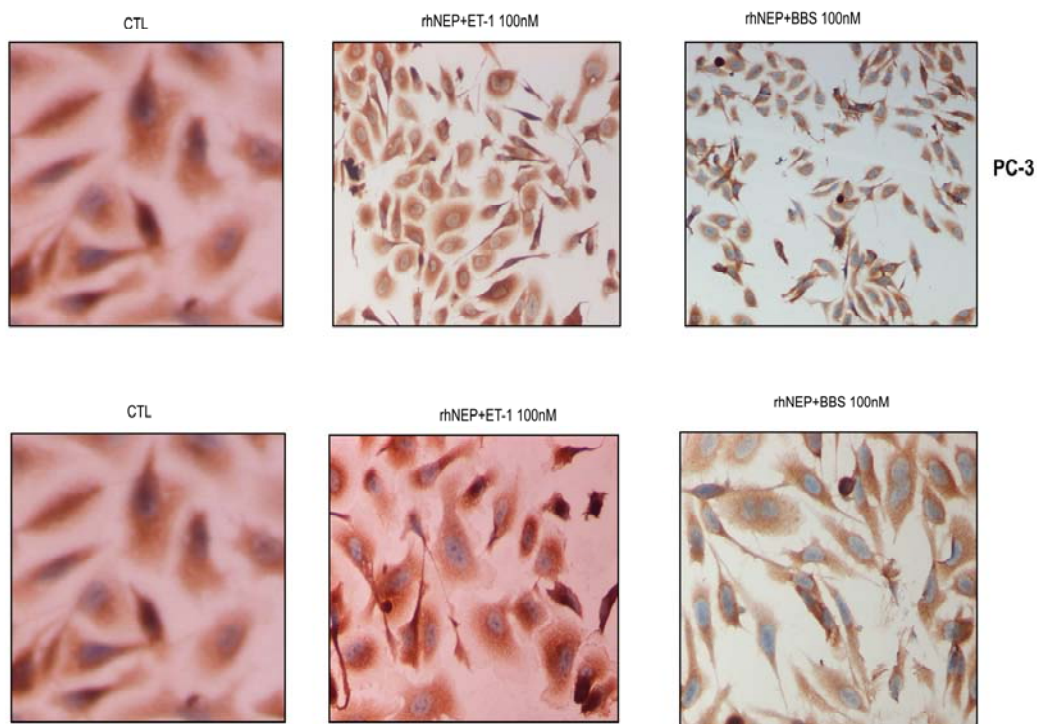
Η πυρηνική μετακίνηση σε κύτταρα PC-3 επετεύχθη επίσης με τη χρήση βομβεσίνης. Καθώς η βομβεσίνη χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν από άλλους ([Levine et al, 2003](#)) για να επιτευχθεί πυρηνική μετακίνηση σε κύτταρα PC-3 με ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο επώασης (100nM για 30 λεπτά), σχεδιάσαμε μια χρονική σειρά επώασεων (30, 45, 60, 120 λεπτά) για την ίδια συγκέντρωση BBS (100nM). Όμοια με την ενδοθελίνη, η BBS επέφερε χρονοεξαρτώμενη πυρηνική μετακίνηση του NFκB που ξεκίνησε στα 30 λεπτά, εντάθηκε στα 45 λεπτά και κορυφώθηκε στη 1 ώρα ([Εικόνα 4.17](#)). Στην επώαση 2 ωρών, το ποσοστό των κυττάρων που παρουσίασαν πυρηνική μετακίνηση μειώθηκε (συγκριτικά με τις επώσεις 45 και 60 λεπτών).

Η προαναφερθείσα πυρηνική μετακίνηση εμποδίσθηκε εν μέρει από την επώαση με αναστολέα του υποδοχέα BB₂ (10nM για 1 ώρα) ([Εικόνα 4.17](#)). Η πρόληψη της μετακίνησης ήταν πιο αποτελεσματική με την επώαση με BBS 45 λεπτών και λιγότερο αποτελεσματική με την επώαση με BBS 1 ώρας. Στα 120 λεπτά, μειώθηκε η πυρηνική μετακίνηση, αλλά αυτό το γεγονός ήταν παρόμοιο με τη μείωση που παρατηρήθηκε με την επώαση με BBS μόνο, στις 2 ώρες.



Εικόνα 4.17 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του $NF\kappa B$ σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS. Έκφραση $NF\kappa B$ από ICC, κύτταρα PC-3. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση (x40); επώαση με BBS 100nM x30min (x20); επώαση με BBS 100nM x 45min (x20); επώαση με BBS 100nM x60min (x40); επώαση με RC-3095 10nM x30min ακολουθούμενο από επώαση με BBS 100nM x60min (x40) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

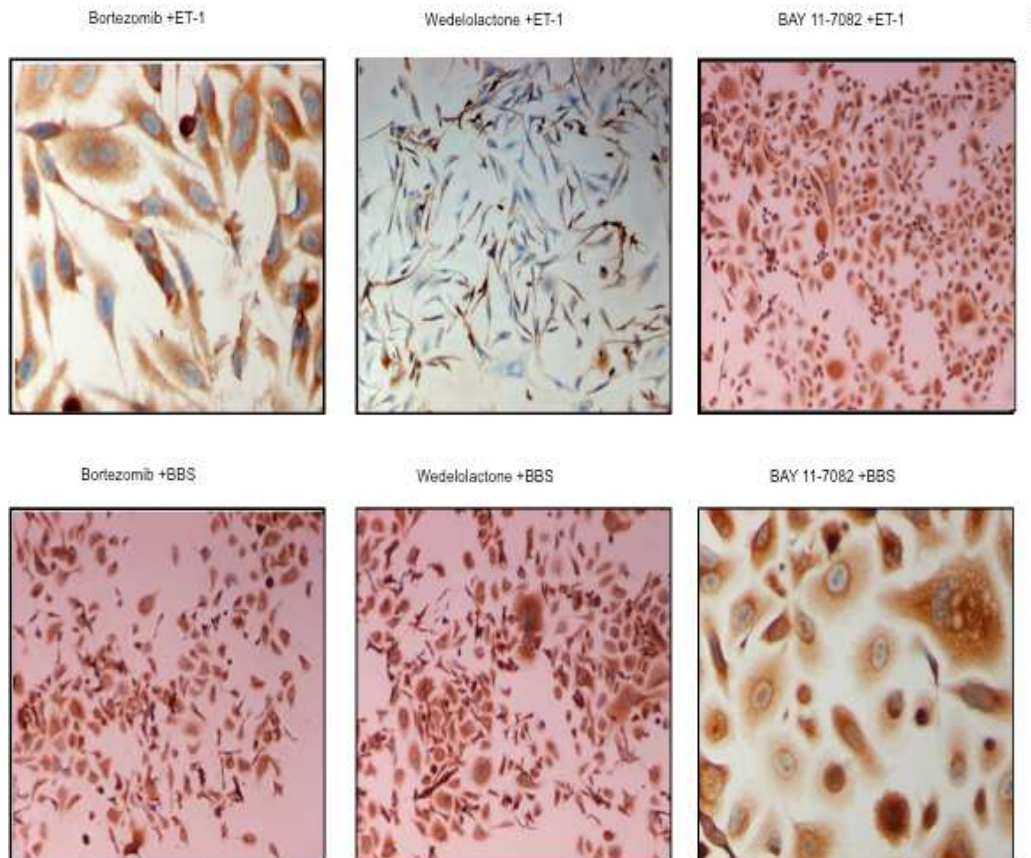
Όταν κύτταρα PC-3 προ-επώασθησαν με rhNEP ελεγχθείσας υψηλής ενζυματικής δραστηριότητας (50μg/ml για 72 ώρες), η επακόλουθη επώαση με ενδοθηλίνη ή βομβεσίνη με τις παραπάνω συνθήκες δεν οδήγησε σε ορατή πυρηνική μετακίνηση ([Εικόνα 4.18](#)).



Εικόνα 4.18 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του $NF\kappa B$ σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP. Έκφραση $NF\kappa B$ από ICC, κύτταρα PC-3. Πάνω σειρά: σταθερή κατάσταση (αριστερά, x40); επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs (κέντρο, x20); επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs και ET-1 100nM x 45min (δεξιά, x10). Κάτω σειρά: σταθερή κατάσταση (αριστερά, x40); επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs (κέντρο, x40); επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs και BBS 100nM x 60min (δεξιά, x40) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

Η χρήση αναστολέων UPS επίσης εμπόδισε την πυρηνική μετακίνηση $NF\kappa B$ που θα επέφεραν η βομβεσίνη και η ενδοθηλίνη σε κύτταρα PC-3. Πιο συγκεκριμένα, η προ-επώαση με αναστολέα IKK (50 μ M για 90 λεπτά) και αναστολέα πρωτεασώματος (1 μ M για 60 λεπτά) εμπόδισε με επιτυχία την πυρηνική μετακίνηση, όπως και η προ-επώαση με τον αναστολέα $NF\kappa B$ (20 μ M για 16 ώρες) (*Εικόνα 4.19*). Το δεύτερο είχε επίσης ορατή επίδραση στην κυτταρική

μορφολογία (διάσπαρτα, αποστρογγυλεμένα, με αποπτωτική μορφολογία), όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενες επώσεις.

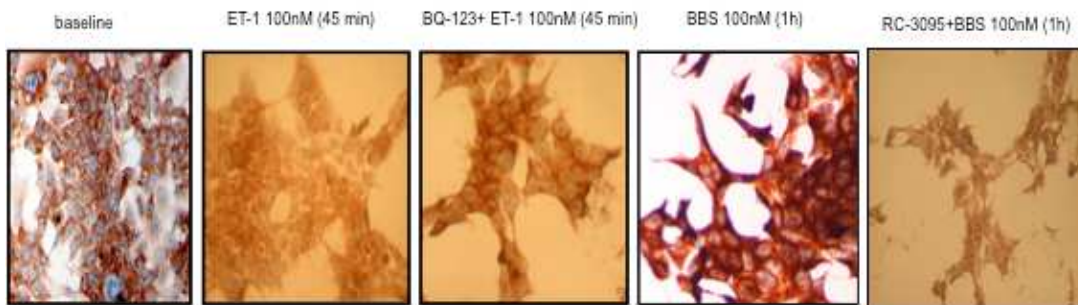


Εικόνα 4.19 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του $NF\kappa B$ σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων UPS. Έκφραση $NF\kappa B$ από ICC, κύτταρα PC-3. Πάνω σειρά: επώαση με βορτεζομίμη 1μM x60min και ET-1 100nM x45min (αριστερά, x40); επώαση με wedelolactone 50μM x30min και ET-1 100nM x45min (κέντρο, x10); επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και ET-1 100nM x 45min (δεξιά, x10). Κάτω σειρά: επώαση με βορτεζομίμη 1μM x60min και BBS 100nM x60min (αριστερά, x10); επώαση με wedelolactone 50μM x30min και BBS 100nM x60min (κέντρο, x10); επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και BBS 100nM x 60min (δεξιά, x40). (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η δυνατότητα αποκλεισμού της πυρηνικής μετακίνησης από το αναστολέα πρωτεασώματος αντεστράφη σε μεγαλύτερης

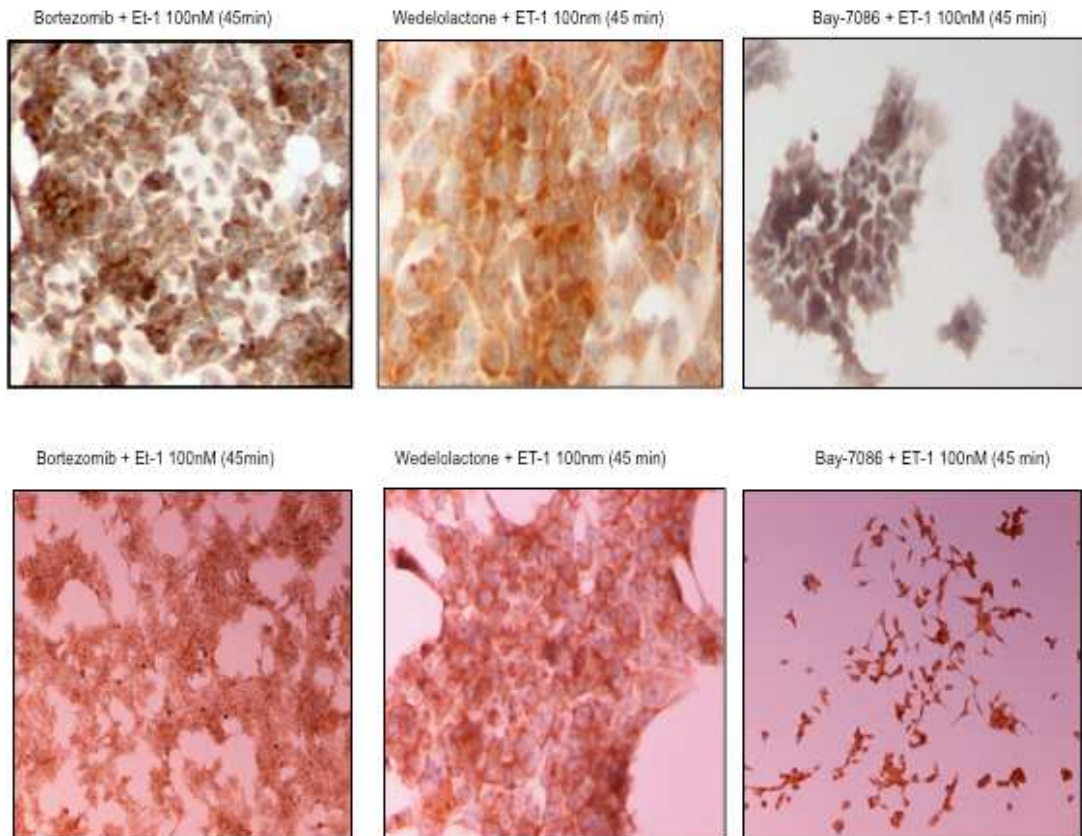
διάρκειας επώασης (πχ. προ-επώαση με βορτεζομίμη για 60 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη νευροπεπτιδίου για άλλα 45 ή 60 λεπτά χωρίς αλλαγή θρεπτικού υλικού), γεγονός που συμβαδίζει με την αναστρέψιμη φύση της επώασης. Το χρονικό πλαίσιο για αυτή την *in vitro* αναστολή ήταν παρόμοιο με αυτό που αναφέρθηκε σε μελέτη Φάσης Ι μετά από ενδοφλέβια χορήγηση βορτεζομίμης σε ανθρώπους, ενώ η μέγιστη αναστολή της δραστηριότητας του 20S πρωτεασώματος που αναφέρθηκε σε μονοκύτταρα κύτταρα του αίματος ήταν στην 1 ώρα (*Papandreou et al, 2004*).

Η επώαση νευροπεπτιδίων χρησιμοποιώντας τα ίδια πρωτόκολλα χρόνου και συγκέντρωσης δεν είχαν επίδραση στην υποκυτταρική εντόπιση του NFκB σε κύτταρα LnCaP, που παρέμεινε κυτταροπλασματική, με ή χωρίς χρήση ανταγωνιστών υποδοχέων (*Εικόνα 4.20*).



Εικόνα 4.20 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων. Έκφραση NFκB από ICC, κύτταρα LnCaP. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση (x10); επώαση ET-1 100nM x45min (x10); επώαση BQ-123 1μM x30min +ET-1 100nM x 45min (x10); επώαση BBS 100nM x 60min (x20); επώαση RC-3095 10nM x30min +BBS 100nM x 60min (x10) (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

Η εντόπιση παρέμεινε κυτταροπλασματική με τη χρήση ανταγωνιστών, όπως παραπάνω ([Εικόνα 4.21](#)). Υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστολέων της οδού NFκB/UPS οδήγησαν σε αλλοιωμένη κυτταρική μορφολογία, όπως με τα κύτταρα PC-3.

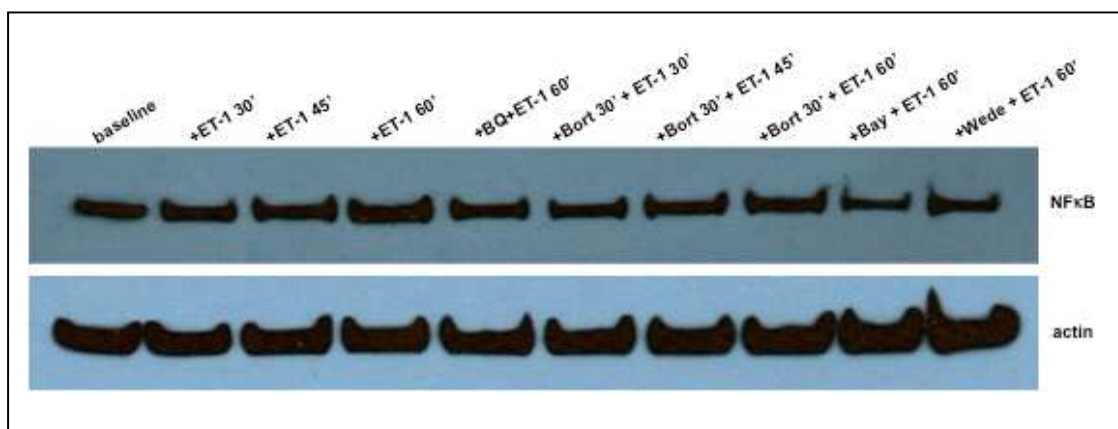


Εικόνα 4.21 Ανάλυση υποκυτταρικής εντόπισης του NFκB σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων UPS. Έκφραση NFκB από ICC, κύτταρα LnCaP. Πάνω σειρά: επώαση με βορτεζομίμη 1μM x60min και ET-1 100nM x45min (αριστερά, x10); επώαση με wedelolactone 50μM x30min και ET-1 100nM x45min (κέντρο, x10); επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και ET-1 100nM x 45min (δεξιά, x10). Κάτω σειρά: επώαση με βορτεζομίμη 1μM x60min και BBS 100nM x60min (αριστερά, x10); επώαση με wedelolactone 50μM x30min και BBS 100nM x60min (κέντρο, x10); επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και BBS 100nM x 60min (δεξιά, x10). (κλώνος 56C6, μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου, Novocastra).

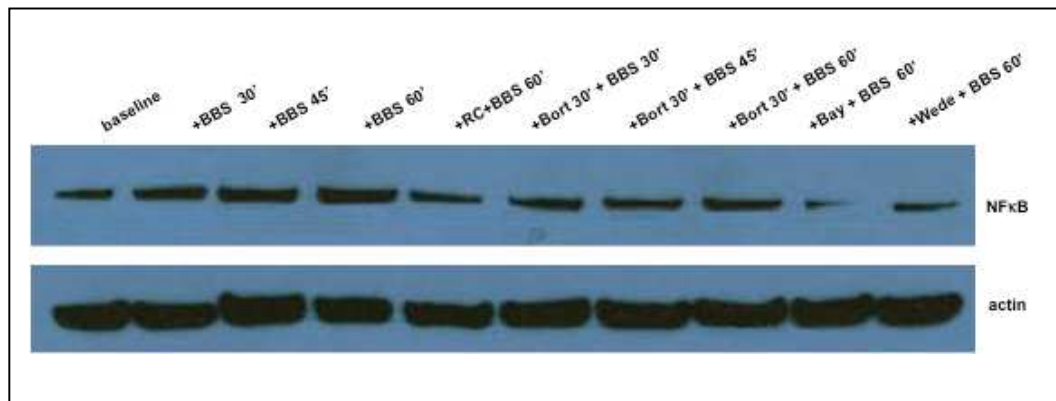
Το σύνολο των πειραμάτων αυτής της ενότητας παρουσιάζονται στο [Παράρτημα IV](#).

4.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ NFκB

Η ανάλυση western blot των πυρηνικών εκχυλισμάτων έδειξε υψηλότερη ποσότητα NFκB στους πυρήνες κυττάρων PC-3 μετά τη διέγερση με ET-1 και βομβεσίνη, σταδιακά αυξανόμενη και ιδιαίτερα εμφανή στις επώσεις των 60 λεπτών (Εικόνα 4.22 & 4.23). Η επίδραση στα κύτταρα PC-3 εμποδίσθηκε σε κάποιο βαθμό από τη χρήση αναστολέων των ανίστοιχων υποδοχέων, όπως και με προ-επώαση με αναστολείς της οδού NFκB/UPS, κυρίως στην περίπτωση του άμεσου αναστολέα NFκB (Εικόνα 4.22 & 4.23).



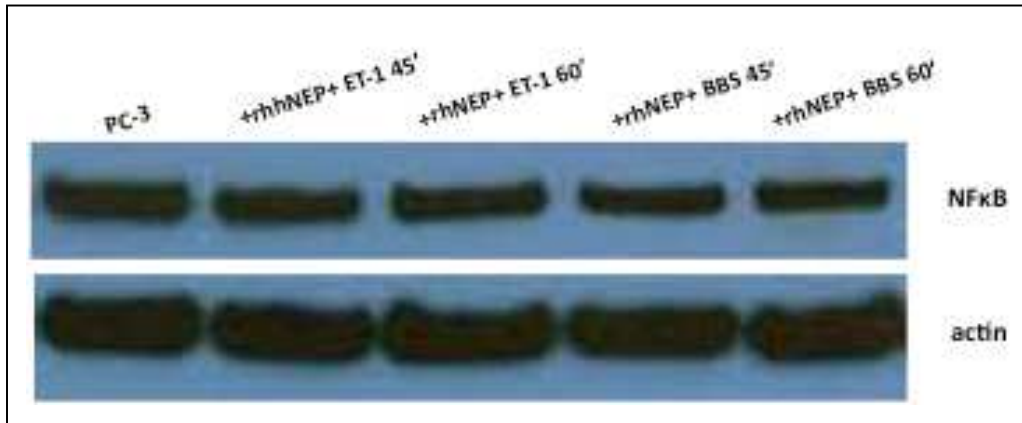
Εικόνα 4.22 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1 και αναστολέων. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση; επώαση με ET-1 100nM x 30min; επώαση με ET-1 100nM x 45min; επώαση με ET-1 100nM x 60min; επώαση με BQ-123 1μM x30min +ET-1 100nM x 60min; επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min + ET-1 100nM x 30min ; επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min + ET-1 100nM x 45min; επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min + ET-1 100nM x 60min; επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και ET-1 100nM x 60min; επώαση με wedelolactone 50μM x30min και ET-1 100nM x60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου έναντι της υπομονάδας p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).



Εικόνα 4.23 Ανάλυση της πυρηνικής πρωτεΐνης $NF\kappa B$ σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS και αναστολέων. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση; επώαση με BBS 100nM x 30min; επώαση με BBS 100nM x 45min; επώαση με BBS 100nM x 60min; επώαση με RC-3095 10nM x30min +BBS 100nM x 60min; επώαση με βορτεζομίμπη 1μM x30min + BBS 100nM x 30min ; επώαση με βορτεζομίμπη 1μM x30min + BBS 100nM x 45min; επώαση με βορτεζομίμπη 1μM x30min + BBS 100nM x 60min; επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs και BBS 100nM x 60min; επώαση με wedelolactone 50μM x30min και BBS 100nM x60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου έναντι της υπομονάδας p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

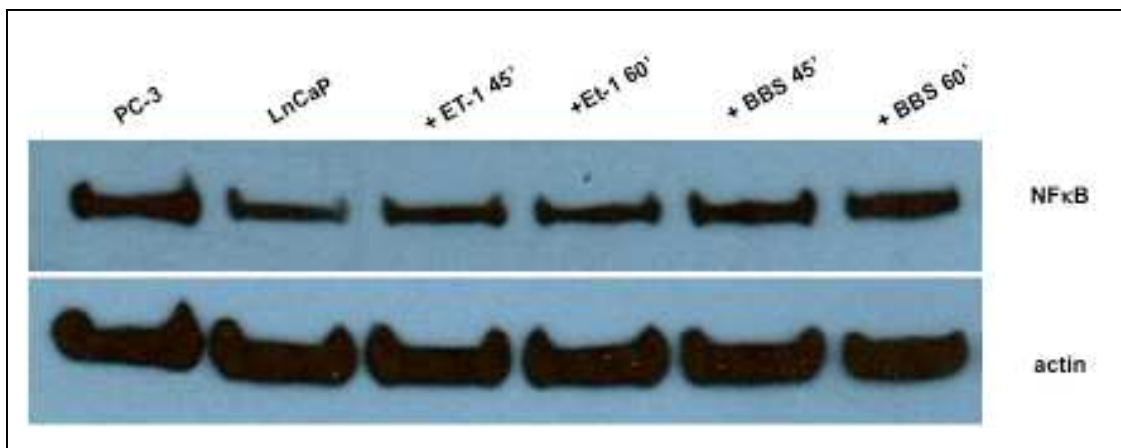
Όπως προηγουμένως, η αποτελεσματικότερη αναστολή με προ-επώαση με βορτεζομίμπη αποδείχθηκε ότι ήταν σε συνολικό χρόνο επώασης 60 λεπτών (Εικόνα 4.22 & 4.23).

Η επώαση κυττάρων PC-3 με rhNEP (με ελεγχθείσα υψηλή ενζυματική δραστηριότητα) πριν τη διέγερση με νευροπεπτίδια απέτρεψε την αύξηση του $NF\kappa B$ στον πυρήνα που καταγράφηκε με την επώαση με νευροπεπτίδια μόνο (Εικόνα 4.24).



Εικόνα 4.24 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης $NF\kappa B$ σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP. Από αριστερά: σταθερή κατάσταση; επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs +ET-1 100nM x 45min; επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs +ET-1 100nM x 60min; επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs + BBS 100nM x 45min; επώαση με rhNEP 50 μ g/ml x72hrs +BBS 100nM x 60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου έναντι της υπομονάδας p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Τα κύτταρα LnCaP δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση της ποσότητας $NF\kappa B$ στον πυρήνα με τη διέγερση με νευροπεπτίδια ([Εικόνα 4.25](#)).



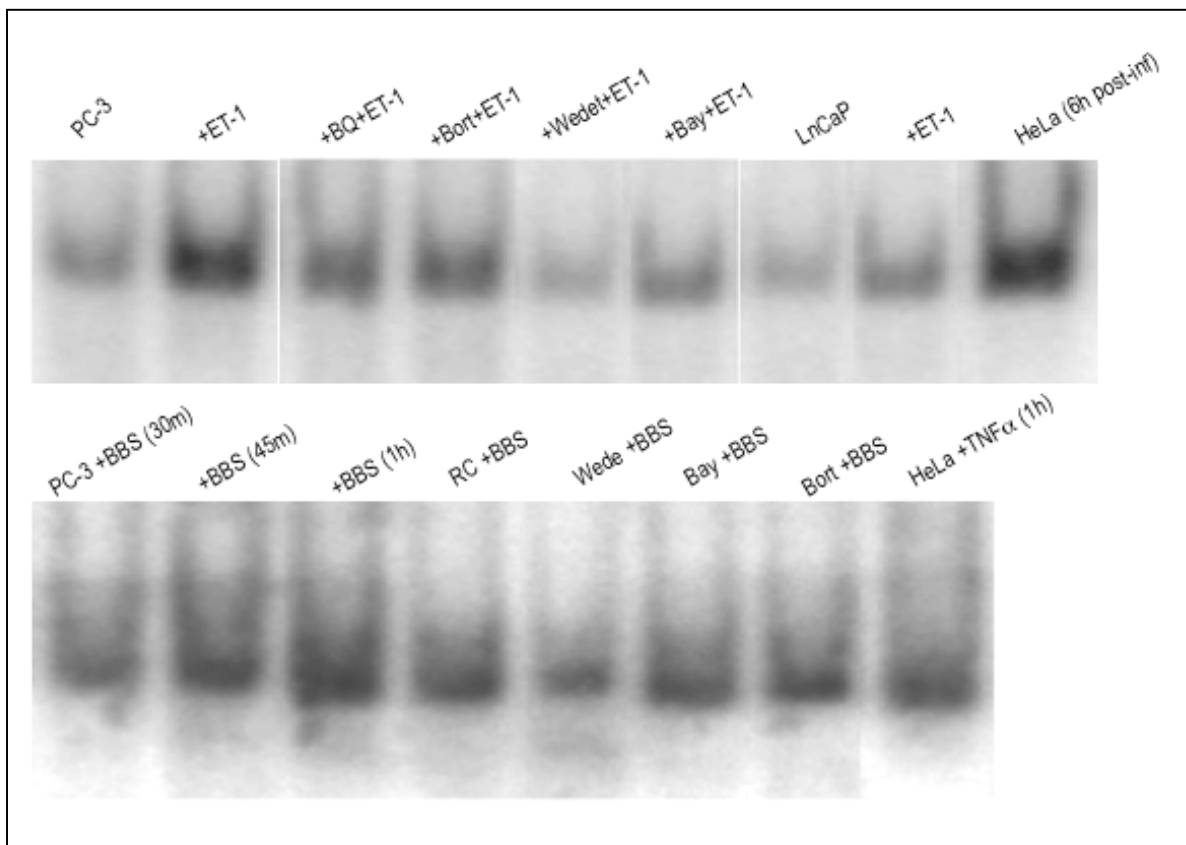
Εικόνα 4.25 Ανάλυση πυρηνικής πρωτεΐνης $NF\kappa B$ σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων. Από αριστερά: PC-3 κύτταρα, σταθερή κατάσταση; LnCaP κύτταρα, επώαση με ET-1 100nM x 45min; LnCaP κύτταρα, επώαση με +ET-1 100nM x 60min; LnCaP κύτταρα, επώαση με BBS 100nM x 45min; LnCaP κύτταρα, επώαση με BBS 100nM x 60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (μονοκλωνικό αντίσωμα ινδικού χοιριδίου έναντι της υπομονάδας p65, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Το σύνολο των πειραμάτων αυτής της ενότητας παρουσιάζονται στο [Παράρτημα V](#).

4.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΣΥΝΔΕΣΗ NFκB/DNA

Η επώαση με ενδοθελίνη 1 ή βομβεσίνη (100nM και για τις δύο) αύξησε την ένταση του σήματος με χρονοεξαρτώμενο τρόπο όμοιο με αυτόν που παρατηρήθηκε στον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο, ξεκινώντας στα 30 λεπτά και με την κορύφωση να σημειώνεται στη 1 ώρα. Η μέγιστη ένταση σήματος ήταν παρόμοια με την ένταση του σήματος των κυττάρων PC-3 που έλαβαν θεραπεία με TNF α (10 μ M για 30 λεπτά), έναν πολύ γνωστό ενεργοποιητή του NFκB, όπως και την ένταση του σήματος που παρουσίασαν τα κύτταρα HeLa μετά από επώαση με TNF α (1 ώρα) ή από ιογενή λοίμωξη, όπως παραπάνω (*Εικόνα 4.26 & 4.27*). Αυτή η αύξηση στη σύνδεση με το DNA στα κύτταρα PC-3 εμποδίσθηκε εν μέρει με προ-επώαση με τον ανταγωνιστή υποδοχέα ET_A ή το ανταγωνιστή του υποδοχέα BB₂ για την ET-1 και τη BBS αντίστοιχα (*Εικόνα 4.26*). Το ίδιο παρατηρήθηκε με προ-επώσεις με αναστολείς IKK, NFκB και πρωτεασώματος και για τα δύο νευροπεπτίδια. Η πιο αποτελεσματική αναστολή αύξησης σήματος επιτεύχθηκε με προ-επώαση με αναστολέα της IKK, η οποία οδήγησε σε πολύ χαμηλό σήμα σύνδεσης με το DNA, εμποδίζοντας απόλυτα κάθε διεγερτική επίδραση και των δύο νευροπεπτιδίων (*Εικόνα 4.26*).

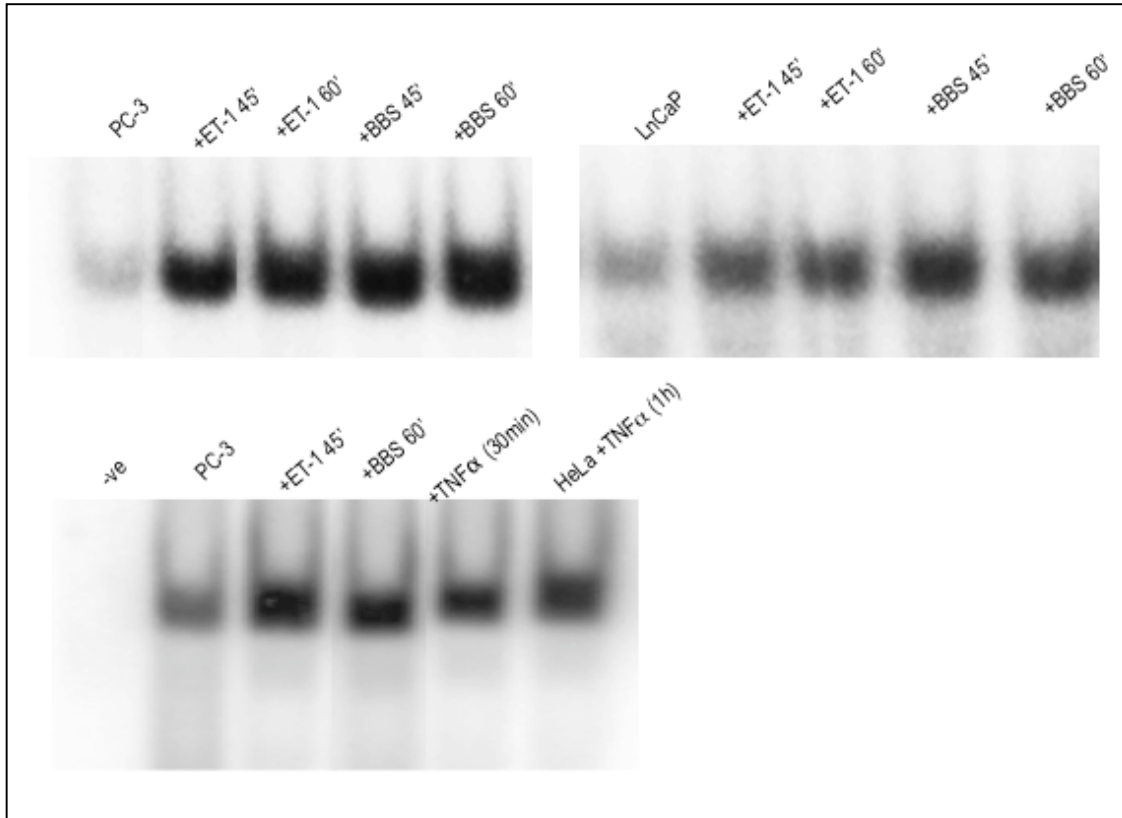
Ενισχυμένο σήμα σύνδεσης με το DNA ανιχνεύθηκε επίσης σε κύτταρα LnCaP μετά από επώσεις με ET-1 και BBS, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό, σε σύγκριση με τα κύτταρα PC-3 (*Εικόνα 4.26 & 4.27*).



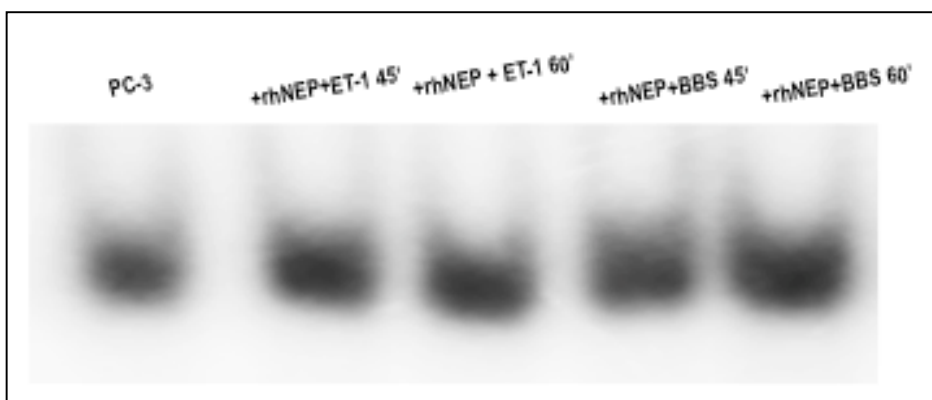
Εικόνα 4.26 Ανίχνευση δέσμευσης *NFκB*/DNA σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων (A). Ανάλυση με τεχνική EMSA. Πάνω σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BQ-123 1μM x30min +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμπη 1μM x30min +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με wedelolactone 50μM x30min + ET-1 100nM x45min; επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα LnCaP, σταθερή κατάσταση; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα HeLa (6 ώρες μετά τη μόλυνση με παραμυξοϊό Sentali). Κάτω σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 30min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με RC-3095 10nM x 30min +BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με wedelolactone 50μM x30min + BBS 100nM x60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs +BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμπη 1μM x30min +BBS 100nM x 60min; κύτταρα HeLa (1 ώρα μετά την επώαση με rhTNFα (αντι-p65, πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Ομοίως, όταν κύτταρα PC-3 προ-επώασθησαν με rhNEP πριν την επώαση με νευροπεπτιδία, το αυξημένο σήμα σύνδεσης με DNA το οποίο επέφεραν πριν τα νευροπεπτιδία είχε μειωθεί σημαντικά. Αυτή η επίδραση παρατηρήθηκε τόσο

στην επώαση των 45', όσο και σε αυτή των 60', που προηγουμένως είχε παρουσιάσει τη μέγιστη ένταση σήματος (*Εικόνα 4.28*)



Εικόνα 4.27 Ανίχνευση δέσμευσης $NF\kappa B/DNA$ σε φυσικές κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη με χρήση νευροπεπτιδίων και αναστολέων (B). Ανάλυση με τεχνική EMSA. Πάνω σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα LnCaP, σταθερή κατάσταση; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 60min; κύτταρα LnCaP, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα LnCaP, επώαση με BBS 100nM x 60min. Κάτω σειρά, από αριστερά: αρνητικός μάρτυρας; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 45min; επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3 επώαση με rhTNF α x 30min, κύτταρα HeLa, επώαση με rhTNF α x1hr (αντι-p65, πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)



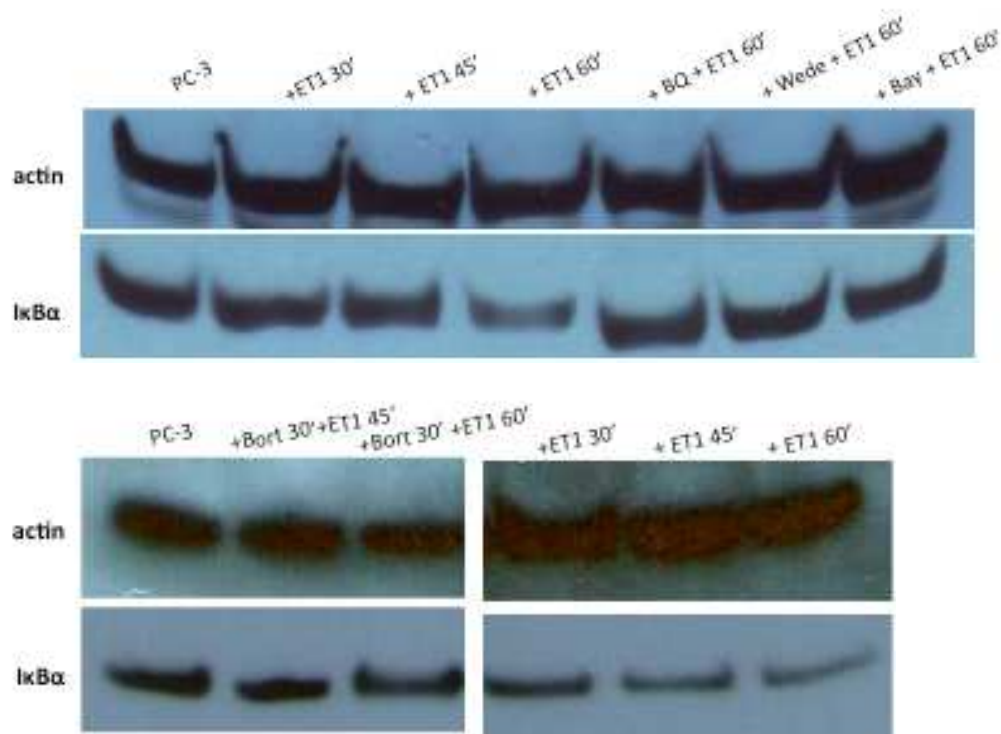
Εικόνα 4.28 Ανίχνευση δέσμευσης NFκB/DNA σε κύτταρα PC-3 και χρήση rhNEP. Ανάλυση με τεχνική EMSA. Από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x 72hrs) +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x 72hrs) +ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x 72hrs) +BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x 72hrs) +BBS 100nM x 60min (αντι-p65, πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Το σύνολο των πειραμάτων αυτής της ενότητας παρουσιάζονται στο [Παράρτημα](#)

[VI](#).

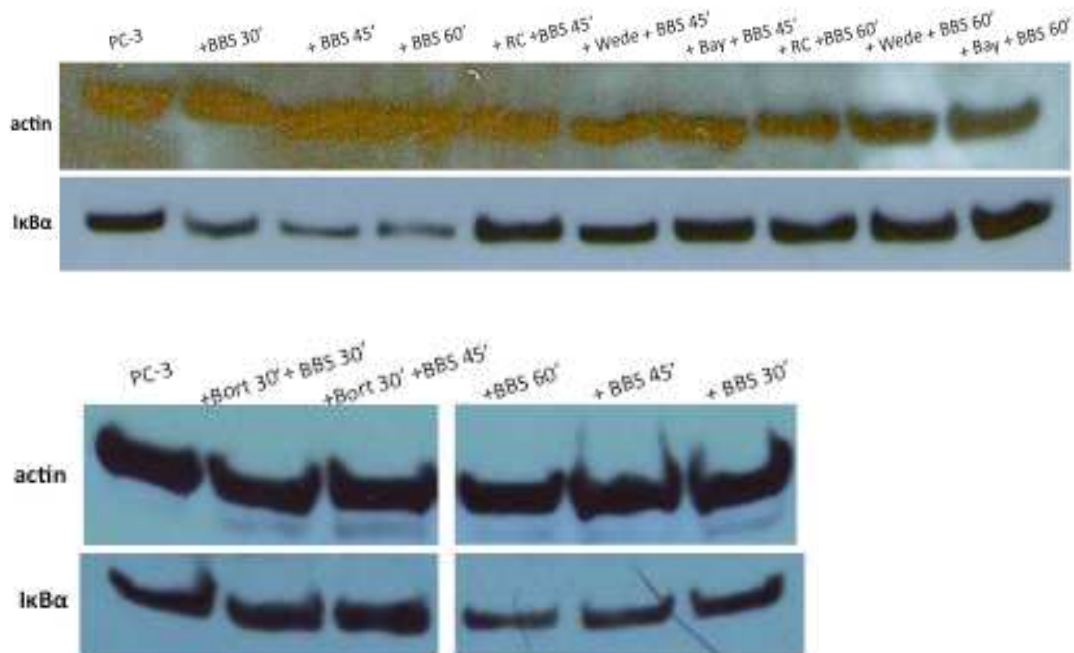
4.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΟ IκB-α

Η επώαση των κυττάρων PC-3 με ενδοθηλίνη ή βομβεσίνη (100nM και για τα δύο νευροπεπτίδια) οδήγησε σε χρονοεξαρτώμενη αλλαγή στο συνολικό IκB-α. Στην επώαση 30 λεπτών ξεκίνησε μια παρατηρούμενη μείωση της ολικής ποσότητας IκB-α. Αυτή η μείωση ήταν πιο εμφανής με την διέγερση με βομβεσίνη, συγκρίσιμη με αυτή που είχε δείξει η ομάδα του Levine ([Levine et al, 2003](#)). Η μείωση του IκB-α συνεχίστηκε στις μεγαλύτερης διάρκειας επωάσεις ([Εικόνα 4.29 & 4.30](#)).



Εικόνα 4.29 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1 και αναστολέων. Πρώτη σειρά: ακτίνη (μάρτυρας). Δεύτερη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 30min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BQ-123 1μM x30min +ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με wedelolactone 50μM x30min +ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs + ET-1 100nM x 60min. Τρίτη σειρά: ακτίνη (μάρτυρας). Τέταρτη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min +ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 30min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

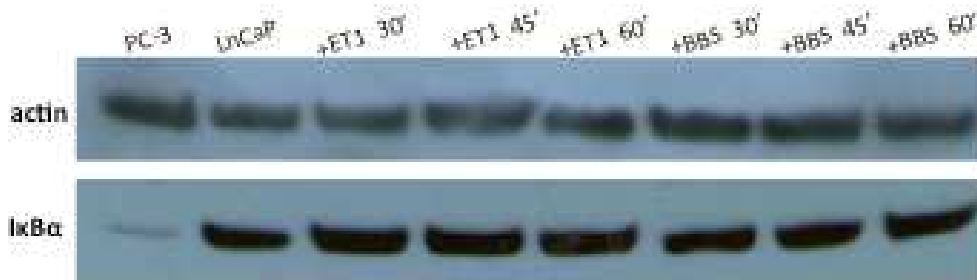
Η προ-επώαση με τους αντίστοιχους αναστολείς υποδοχέων των νευροπεπτιδίων απέτρεψε αυτή τη μείωση της ποσότητας IκB-α. Το ίδιο καταγράφηκε με την προ-επώαση με αναστολείς IKK και NFκB (Εικόνα 4.29 & 4.30).



Εικόνα 4.30 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS και αναστολέων. Πρώτη σειρά: ακίνη (μάρτυρας). Δεύτερη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 30min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με RC-3095 10nM x30min +BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με wedelolactone 50μM x30min +BBS 100nM x45min; επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs +BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με RC-3095 10nM x30min +BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με wedelolactone 50μM x30min +BBS 100nM x60min; Κύτταρα PC-3, επώαση με BAY 11-7082 20μM x16hrs + BBS 100nM x 60min. Τρίτη σειρά: ακίνη (μάρτυρας). Τέταρτη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min +BBS 100nM x 30min; κύτταρα PC-3, επώαση με βορτεζομίμη 1μM x30min +BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 30min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Η προ-επώαση με βορτεζομίμη ανέστειλε επίσης τη μείωση της ποσότητας IκB-α, όμως αυτή η επίδραση δεν ήταν τόσο μεγάλη όταν η συνολική επώαση με βορτεζομίμη υπερέβη κατά πολύ τα 60' (Εικόνα 4.29. & 4.30), σύμφωνα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα ICC και WB (Βλέπε Ενότητες 4.4 και 4.5).

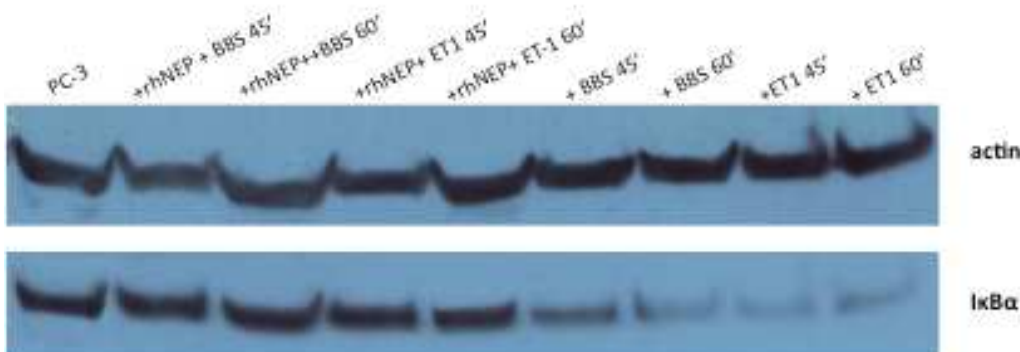
Η επώαση των κυττάρων LnCaP με νευροπεπτίδια (100nM ET-1 ή BBS) δεν οδήγησε σε σαφή αύξηση της συνολικής ποσότητας IκB-α σε οποιονδήποτε χρόνο επώασης (*Εικόνα 4.31*).



Εικόνα 4.31 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων. Πρώτη σειρά: ακτίνη (μάρτυρας). Δεύτερη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα LnCaP, σταθερή κατάσταση; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 30min; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 45min; κύτταρα LnCaP, επώαση με ET-1 100nM x 60min; κύτταρα LnCaP, επώαση με BBS 100nM x 30min; κύτταρα LnCaP, επώαση με BBS 100nM x 45min; κύτταρα LnCaP, επώαση με BBS 100nM x 60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Αντίστοιχα, η προ-επώαση των κυττάρων PC-3 με rhNEP ακολουθούμενη από επώαση με νευροπεπτίδια απέτρεψε την αύξηση της συνολικής ποσότητας IκB-α που αναμενόταν από την νευροπεπτιδιακή διέγερση (*Εικόνα 4.32*).

Το σύνολο των πειραμάτων αυτής της ενότητας παρουσιάζονται στο [Παράρτημα VII](#).



Εικόνα 4.32 Μέτρηση κυτταρικών επιπέδων IκB-α σε κύτταρα PC-3 με χρήση νευροπεπτιδίων και rhNEP. Πρώτη σειρά: ακίνη (μάρτυρας). Δεύτερη σειρά, από αριστερά: κύτταρα PC-3, σταθερή κατάσταση; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x72hrs) +BBS 100nM x 45min; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x72hrs) +BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με rhNEP (50μg/ml x72hrs) +ET-1 100nM x 45min; κύτταρα PC-3 επώαση με rhNEP (50μg/ml x72hrs) +ET-1 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x45min; κύτταρα PC-3, επώαση με BBS 100nM x 60min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x45min; κύτταρα PC-3, επώαση με ET-1 100nM x 60min. Ανάλυση με τεχνική Western blotting χημειοφωταύγειας (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Santa Cruz Biotechnology, Inc)..

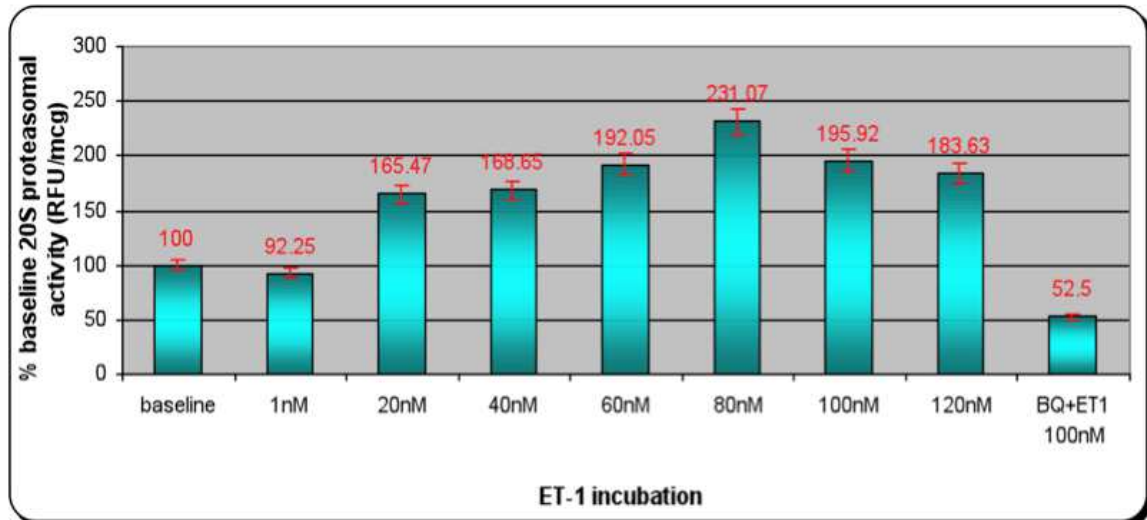
4.8 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ 20S

ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

Για να διαλευκανθεί η εμπλοκή του πρωτεασώματος στην νευροπεπτιδική διέγερση του NFκB σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων επώασεων νευροπεπτιδίων χρόνου και συγκεντρώσεων.

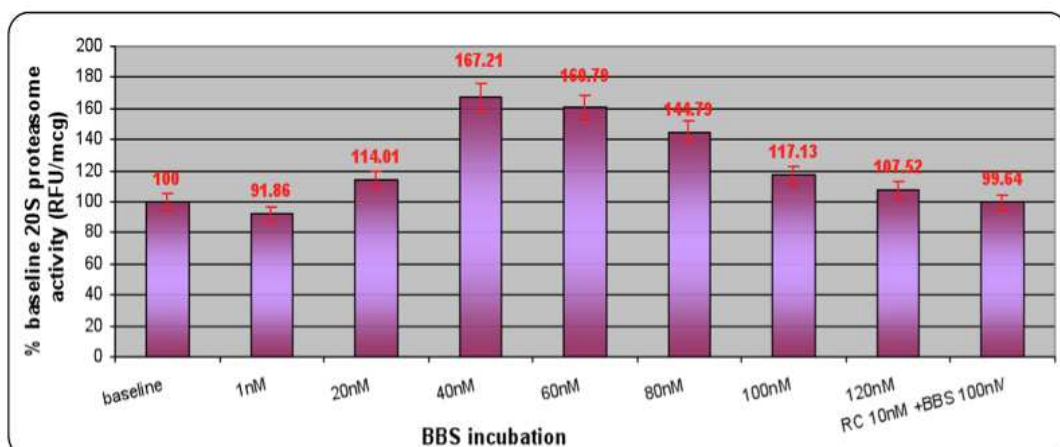
Επώαση των κυττάρων PC-3 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ET-1 επέφερε μια σταδιακή αύξηση στην δραστηριότητα της υπομονάδας 20S του πρωτεασώματος. Η δραστηριότητα δεν άλλαξε ιδιαίτερα στην επώαση του 1nM (92.25% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης), αλλά αύξανε σταδιακά στις επώσεις υψηλότερων συγκεντρώσεων, σημειώνοντας την μεγαλύτερη αύξηση

στην επώαση των 80nM (230% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης). Σε ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε καμπύλη μείωσης της πρωτεασωματικής δραστηριότητας (*Εικόνα 4.33*).



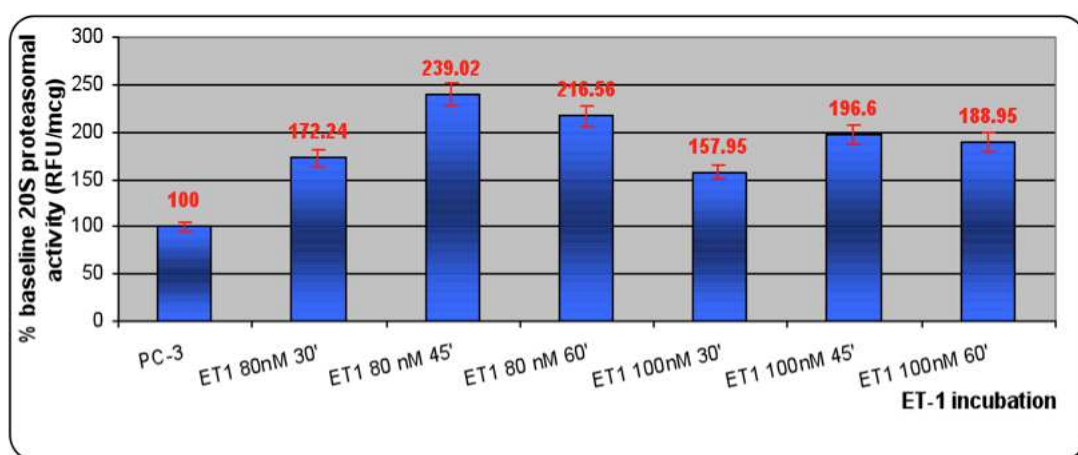
Εικόνα 4.33 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1: επωάσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και υπολογίστηκε η επί της εκατό ποσοστιαία διαφορά από την δραστηριότητα σταθερής κατάστασης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

Οι επωάσεις με βομβεσίνη επίσης επέφεραν μια αύξηση πρωτεασωματικής δραστηριότητας που εξαρτώταν από την συγκέντρωση του νευροπεπτιδίου στα κύτταρα PC-3. Όμως, η μέγιστη αύξηση πρωτεασωματικής δραστηριότητας επετεύχθη στην επώαση των 40nM (έως και 167% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης) (*Εικόνα 4.34*).

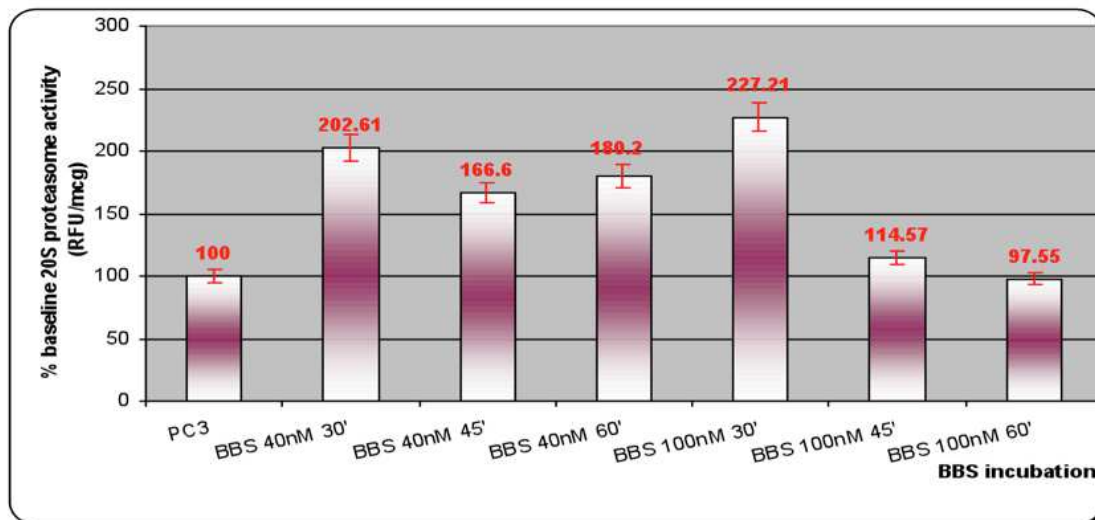


Εικόνα 4.34 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS: επώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και υπολογίστηκε η επί της εκατό ποσοστιαία διαφορά από την δραστηριότητα σταθερής κατάστασης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

Χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις νευροπεπτιδίων που απέδωσαν τις μεγαλύτερες αυξήσεις πρωτεασωμικής δραστηριότητας (40nM για την BBS και 80nM για την ET-1), καθώς επίσης και την συγκέντρωση των 100nM, πραγματοποιήθηκαν επώσεις αυξανόμενου χρόνου στα PC3 κύτταρα. Οι επώσεις ενδοθελίνης επέφεραν μέγιστες αυξήσεις πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα 45 λεπτά (*Εικόνα 4.35*), ενώ οι επώσεις βομβεσίνης στα 30 λεπτά (*Εικόνα 4.36*).



Εικόνα 4.35 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση ET-1: επώσεις αυξανόμενου χρόνου. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και υπολογίστηκε η επί της εκατό ποσοστιαία διαφορά από την δραστηριότητα σταθερής κατάστασης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

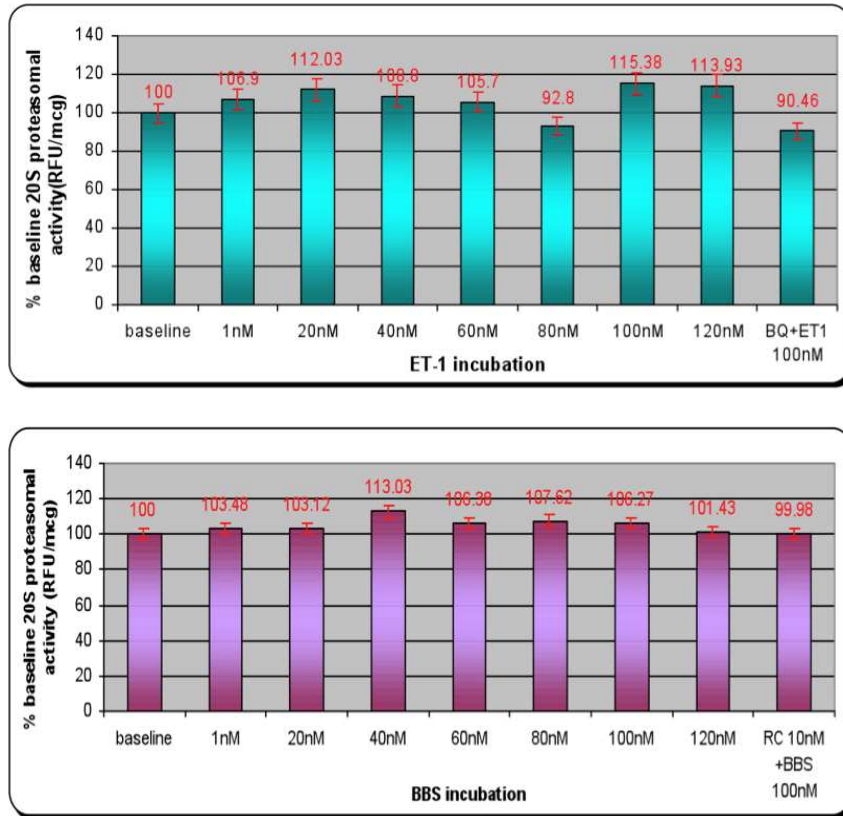


Εικόνα 4.36 Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος σε κύτταρα PC-3 με χρήση BBS: επώσεις αυξανόμενου χρόνου. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και υπολογίστηκε η επί της εκατό ποσοστιαία διαφορά από την δραστηριότητα σταθερής κατάστασης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

Προ-επώαση των κυττάρων PC-3 με ανταγωνιστή υποδοχέα ET_A όχι μόνο απέτρεψε την αύξηση στην πρωτεασωματική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε με τις επώσεις ενδοθηλίνης, αλλά επιπλέον επέφερε μια σημαντική μείωση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος (52.5% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης) (Εικόνα 4.35). Προ-επώαση με αναστολέα του υποδοχέα BB_2 είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη αποτροπή της αύξησης πρωτεασωματικής δραστηριότητας που θσ επέφερε η βομβεσίνη, αλλά δεν παρατηρήθηκε μείωση δραστηριότητας συγκριτικά με την σταθερή κατάσταση, όπως είχε παρατηρηθεί με τον συνδυασμό ανταγωνιστή ET_A R & ET-1 (Εικόνα 4.36).

Τα κύτταρα LnCaP επέδειξαν ελάχιστη ανταπόκριση στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις νευροπεπτιδίων. Η μέγιστη παρατηρηθείσα αύξηση στην δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος ήταν 15% πάνω από την δραστηριότητα

σταθερής κατάστασης και για τα δύο νευροπεπτίδια, και δεν καταγράφηκε τάση αύξησης στις επώσεις υψηλότερων συγκεντρώσεων (Εικόνα 4.37).



Εικόνα 4.37 Δραστηριότητα 20S πρωτασώματος σε κύτταρα LnCaP με χρήση νευροπεπτιδίων: επώσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε RFU/μg και υπολογίστηκε η επί της εκατό ποσοστιαία διαφορά από την δραστηριότητα σταθερής κατάστασης. Όλες οι μετρήσεις έγιναν 4 φορές ($p < .001$).

Στα κύτταρα LnCaP, η διέγερση με BBS μετά από προ-επώαση με ανταγωνιστή του υποδοχέα BB_2 δεν επέφερε αλλαγή σε σχέση με τη δραστηριότητα σταθερής κατάστασης, ενώ η προ-επώαση με ανταγωνιστή ET_A R απέτρεψε ακόμη και του μικρού βαθμού αύξηση πρωτεασωμικής δραστηριότητας που προκαλεί η

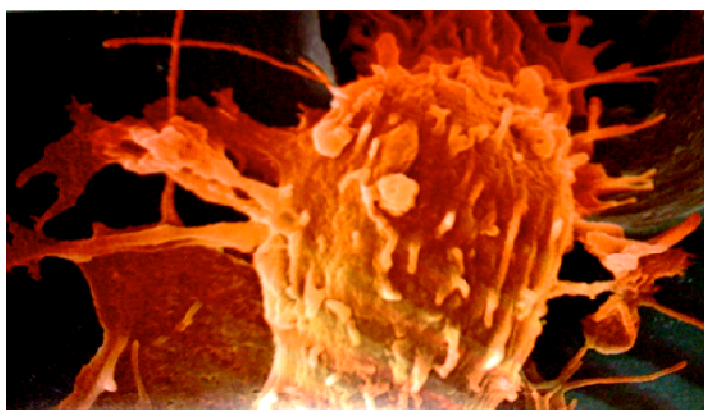
παρακρινώς δρώσα ενδοθελίνη (90.5% της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης) (*Εικόνα 4.37*).

Το σύνολο των πειραμάτων αυτής της ενότητας παρουσιάζονται στο *Παράρτημα VIII*.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της επίδρασης των επωάσεων νευροπεπτιδίων στην οδό NFκB/UPS παρουσιάζονται στον *Πίνακα 4.2*.

Πίνακας 4.2 Ανάλυση της επίδρασης του άξονα NEP/νευροπεπτιδίων στην οδό NFκB/UPS

	AI	AD
	PC-3	LnCaP
Υποκυτταρική εντόπιση NFκB	Πυρηνική μετακίνηση	Παρέμεινε κυτταροπλασματική
Επίπεδα πυρηνικής πρωτεΐνης NFκB	Αύξηση	Παρέμειναν χαμηλά
Σύνδεση NFκB-DNA	Αύξηση έντασης	Παρέμεινε χαμηλή
Ολικά κυτταρικά επίπεδα πρωτεΐνης IκBα	Μείωση	Παρένειναν υψηλά
Δραστηριότητα 20S πρωτεασώματος (RFU/μg)	Αύξηση	Παρέμεινε χαμηλή



Κεφάλαιο 5: Συζήτηση

5.1 ΣΧΕΣΗ ΑΞΟΝΑ ΝΕΡ/ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΟΔΟΥ NFκB/UPS ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν ενδείξεις ότι στην σταθερή κατάσταση υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ των οδών ΝΕΡ/νευροπεπτιδίων και των οδών NFκB/UPS. Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, αυτές οι δύο οδοί είχαν στο παρελθόν εμπλακεί χωριστά στον καρκίνο του προστάτη και στην εξέλιξη προς τη μη ανδρογόνου-εξάρτηση. Αποδείξαμε τώρα ότι τα κύτταρα LnCaP, που λειτουργούν ως μοντέλο AD και είναι γνωστό ότι εκφράζουν ΝΕΡ (επομένως διασπούν ενδογενή/παρακρινή νευροπεπτιδία, όπως καταδεικνύεται από την μειωμένη έκκριση ET-1 που καταδείξαμε), παρουσιάζουν επίσης χαμηλή πρωτεασωμική δραστηριότητα. Αυτό μεταφράζεται σε χαμηλό ποσοστό αποδόμησης και συνεπαγόμενα χαμηλά επίπεδα ολικού IκB. Έτσι, αυτά τα κύτταρα έχουν χαμηλό επίπεδο ενεργοποίησης NFκB, που υποδηλώνεται από την κυτταροπλασματική του εντόπιση και το χαμηλό μήνυμα σύνδεσης με το DNA.

Τα κύτταρα PC-3, που δρουν ως μοντέλο της εξέλιξης μη ανδρογόνου-εξάρτησης, δεν έχουν ενδογενή έκφραση ΝΕΡ (*Papandreou et al, 1998; Usmani et al, 2000*) και έτσι έχουν σημαντικά επίπεδα αυτοκρινών και παρακρινών νευροπεπτιδίων που είναι διαθέσιμα για κυτταρική διέγερση, όπως αποδεικνύουν τα αποτελέσματά μας. Αποδείξαμε επίσης ότι παρουσιάζουν υψηλή πρωτεασωμική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα αυξημένη ενεργοποίηση NFκB. Τα κύτταρα PC-

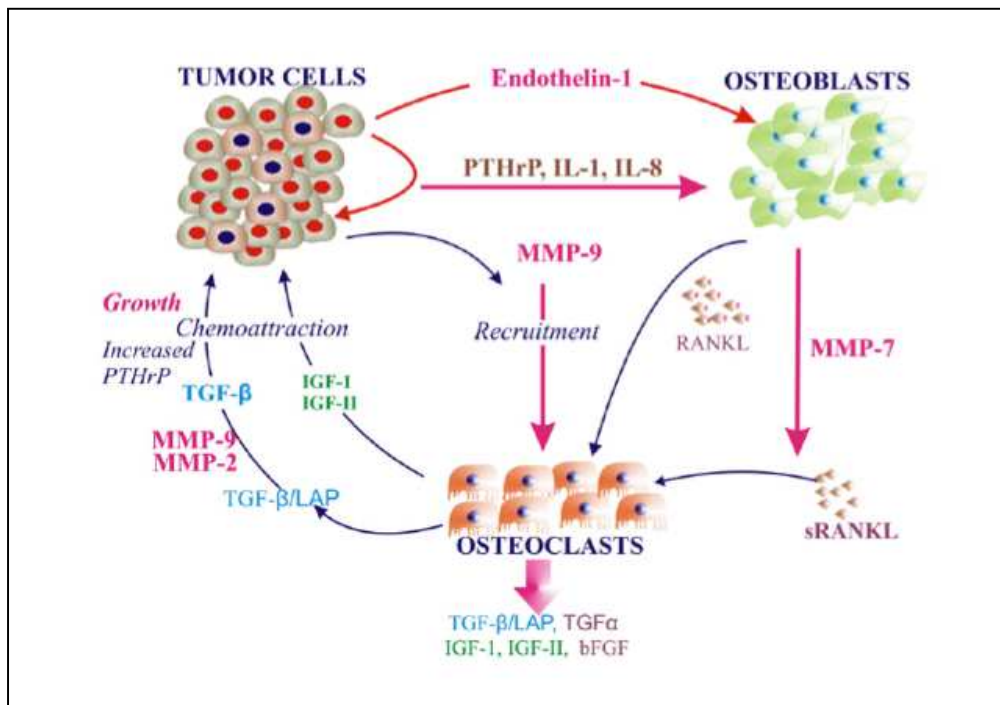
3, αναμενόμενα, παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρωτεασωμική αναστολή, σε σύγκριση με τα κύτταρα LnCaP.

Έτσι, είναι πολύ πιθανό, στην εξέλιξη προς τη μη ανδρογono-εξάρτηση, τα κύτταρα μέσω της απώλειας της δραστηριότητας NEP της μεμβράνης τους, όπως παρουσιάστηκε νωρίτερα (*Papandreou et al, 1998*), να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται σε ένα περιβάλλον αυξημένης παρακρινούς νευροπεπτιδικής διέγερσης. Μάλιστα, τα αποτελέσματα μας αναφορικά με το *in vitro* μοντέλο AD, καταδεικνύουν ότι αυτά έχουν χαμηλότερα επίπεδα απεκκρινόμενης ET-1, γεγονός που μπορεί να αποτελεί το συνδυαστικό αποτέλεσμα τόσο της πεπτιδικής διάσπασης που επιφέρει το NEP, όσο και της μειωμένης παραγωγής ET-1 λόγω της αναφερόμενης μειωμένης έκφρασης ECE-1 (*Usmani et al, 2002*). Παράλληλα, το μοντέλο AI *in vitro* επίσης παρουσιάζει ενεργοποίηση της οδού σήμανσης NFκB, με αυξημένη δραστηριότητας του κυτταρικού πρωτεασώματος.

Το ενδιαφέρον για τον ρόλο των νευροπεπτιδίων στην εμφάνιση κλώνων καρκίνου του προστάτη που είναι ανθεκτικοί στον ευνουχισμό και με μεταστατική δυνατότητα αναζωπυρώθηκε τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με τις σύγχρονες γνώσεις σχετικά με τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις όγκου-μικροπεριβάλλοντος. Ο άξονας της ενδοθηλίνης είναι πράγματι ένα σημαντικό στοιχείο αυτών των αλληλεπιδράσεων και αυτό έχει καταδειχθεί στην διήθηση του όγκου και στο μικροπεριβάλλον της οστικής μετάστασης στον καρκίνο του προστάτη (*Wilson & Singh 2008*). Ο άξονας ET-1 σταθερά επιφέρει αύξηση της δραστηριότητα των δύο οικογενειών πρωτεϊνών που συνδέονται με μετάσταση,

των μεταλλοπρωτεϊνών θεμέλιας ουσίας (MMPs) και του συστήματος ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA), αλλά και διεγείρει την κυτταρική σήμανση μέσω της κινάσης συγκόλλησης (FAK) (όπως κάνει και η βομβεσίνη) και τη φωσφορυλίωση της παξιλλίνης, διαδικασίες που συμβάλλουν επίσης στην εισβολή και στη μετάσταση (*Hanson & Abrahamson, 2001; Bagnato et al, 2008*). Μάλιστα, τόσο η ET-1, όσο και η βομβεσίνη έχει βρεθεί ότι ευνοούν τη μετανάστευση κυττάρων καρκίνου του προστάτη *in vitro*, ενώ το NEP έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει αυτή τη μετανάστευση εμποδίζοντας τη σήμανση FAK (*Aprikian et al, 1997, Sumitomo et al 2000*).

Στο οστικό μικροπεριβάλλον στον καρκίνο του προστάτη, η ET-1 που παράγει ο όγκος διεγείρει τους οστεοβλάστες ώστε να διαιρεθούν, προκαλώντας οστεοβλαστικές μεταστάσεις, αλλά προσφέρει επίσης αυτοκρινείς επιδράσεις που υποστηρίζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνουν τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τους οστεοβλάστες ώστε να εκφράσουν το μόριο του προσδέτη του ενεργοποιητή υποδοχέα του NF-κΒ (Receptor Activator for the NFκΒ Ligand; RANKL) που ενεργοποιεί τους νεοεπιστρατευθέντες οστεοκλάστες, διευκολύνοντας έτσι την εκμετάλλευση της φυσιολογικής ομοιοστατικής διαδικασίας του ανασχηματισμού των οστών προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και τον σχηματισμό μεταστάσεων (*Armstrong et al, 2008; Wilson & Singh, 2008*).



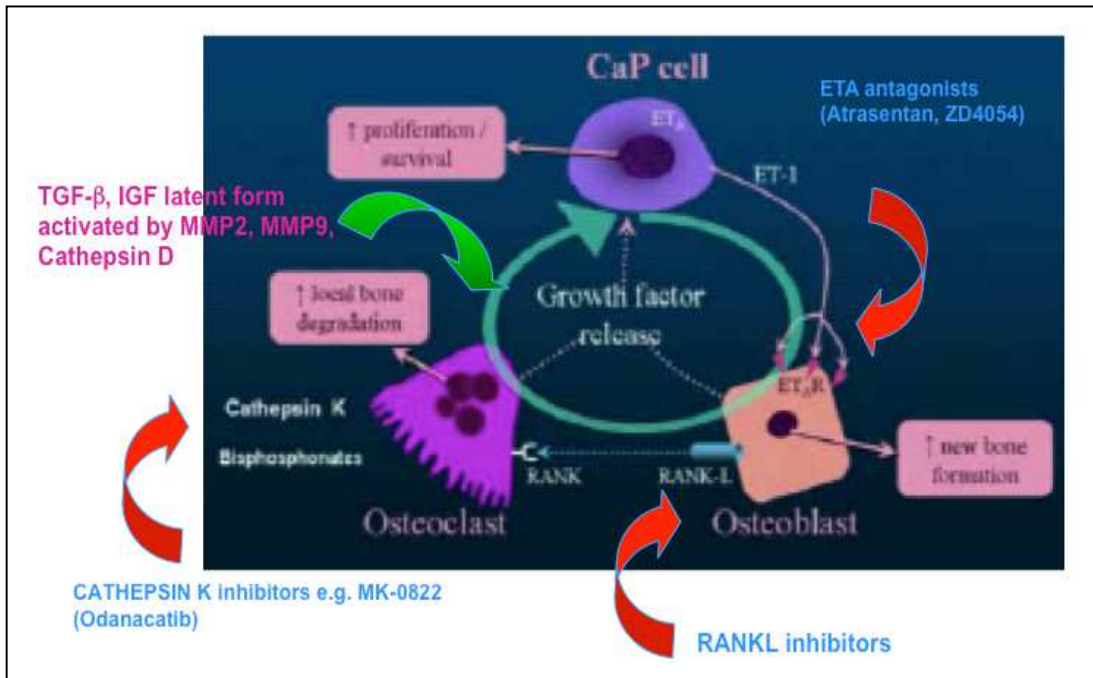
Εικόνα 5.1 Ρόλος ET-1 στο οστικό μικροπεριβάλλον μεταστάσεων στον καρκίνο προστάτη. Επίδραση ET-1 και MMPs παραγόμενων από τα καρκινικά κύτταρα σε οστεοκλάστες και οστεοβλάστες. (από Wilson & Singh, 2008).

Το εύρημα ότι τα νευροπεπτίδια μπορεί να ενεργοποιούν το AR μέσω ενδοκυττάριας φωσφορυλίωσης (Nazareth & Weigel, 1996) υποστηρίζει την έννοια της εμπλοκής των νευροπεπτιδίων στην επιβίωση των κυττάρων στον καρκίνο του προστάτη υπό συνθήκες στέρσης ανδρογόνων. Μάλιστα, η βομβεσίνη μπορεί *in vitro* να λειτουργήσει σε συνέργεια με χαμηλά επίπεδα DHT (ευνουχισμός) για να επιφέρει μεταγραφική δραστηριότητα μέσω του AR (Dai et al, 2002), υποδηλώνοντας ότι ένας από τους μηχανισμούς ανώμαλης επανενεργοποίησης του AR που έχει βρεθεί ότι συμβαίνει στον μη ανδρογονο-εξαρτώμενο καρκίνο μπορεί να διαμεσολαβείται από τα νευροπεπτίδια.

Επιπλέον, τα νευροπεπτίδια μπορεί να εμπλέκονται σε οδούς που δεν είχαμε εκμεταλλευθεί πλήρως στο παρελθόν αναφορικά με τη βιολογία του καρκίνου του προστάτη. Η νευροενδοκρινής διαφοροποίηση φαίνεται ότι περιλαμβάνει την προς τα πάνω ρύθμιση της δραστηριότητας της οικογένειας EGFR, με άμεση επίδραση στην αγγειογένεση και στην μη εξαρτώμενη από τα ανδρογόνα κυτταρική ανάπτυξη (*Hanson & Abrahamsson, 2001; Sherwood & Lee, 1995; Iwamura et al, 1994*). Η ενδοθηλίνη και η βομβεσίνη έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν χιαστί τους υποδοχείς EGF όταν ενεργοποιούν τους δικούς τους - ειδικούς για τους συγκεκριμένους προσδέτες- υποδοχείς (*Prenzel et al, 1999*), ενώ η εξωγενώς προστιθέμενη ET-1 προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό του καρκίνου του προστάτη και ενισχύει τις αγγειογενείς επιδράσεις στρωματικών παραγόντων όπως οι EGF, IFG-1 και FGF (*Nelson et al, 1995; Nelson et al 2003*). Με αυτές τις ενδείξεις συνάδει η σαφής αρνητική επίδραση των ανταγωνιστών της βομβεσίνης στην ρύθμιση της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης ErbB-2/Her-2 (*Bajo et al, 2002*).

Η χρήση αναστολέων του άξονα της ενδοθηλίνης (όπως των αναστολέων των υποδοχέων RANK και ET_AR) βρίσκονται αυτή την εποχή στο επίκεντρο μελετών προκλινικής και κλινικής εφαρμογής, όπως και η αναστολή του πρωτεασώματος και η αναστολή των HDAC που στοχεύουν την οδό UPS/NFκB (*Carducci & Jimeno, 2006; Nelson et al, 2008; James et al, 2009; Yu et al, 2009; Munster et al, 2009*). Η χρήση ενός συγκεκριμένου ανταγωνιστή ET_AR, του Atrasentan, έδειξε όφελος αναφορικά με την εξέλιξη του PSA και το οστικό άλγος (δείκτη οστικής δραστηριότητας), αλλά όχι σημαντική βελτίωση στην επιβίωση (*Carducci*

et al, 2007). Ένας άλλος ανταγωνιστής υποδοχέα, ο ZD4054, βελτιώνει τη συνολική επιβίωση στους ασθενείς με μεταστατικό, ορμονο-άντοχο καρκίνο, χωρίς όμως να βελτιώνει το διάμεσο χρόνο ως την πρόοδο της νόσου (*James et al, 2009*). Πρόσφατα, το ενδιαφέρον μετατοπίστηκε στη συνδυαστική χρήση τέτοιων παραγόντων με σχήματα τυπικής χημειοθεραπείας κατά του καρκίνου του προστάτη, όπως το taxotere, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (*Banerjee et al 2007, Miller et al 2008*).



Εικόνα 5.2 Ανταγωνιστές άξονα ενδοθελίνης υπό κλινικής διερεύνηση στον καρκίνο προστάτη. Ανταγωνιστές ETAR, RANKL, καθεψίνης K.

Η μελέτη μας παρέχει ενδείξεις ενός μοριακού μοτίβου μεταξύ των οδών νευροπεπτιδίων/NEP και NFκB/UPS που αντιστρέφεται κατά την εξέλιξη από τον ορμονο-εξαρτώμενο στον ορμονο-άντοχο καρκίνο του προστάτη. Αυτή η

βιολογική έννοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σχεδιασθούν συνδυαστικές κλινικές εφαρμογές ανταγωνιστών/αναστολέων που θα περιλαμβάνουν αυτούς τους δύο μηχανισμούς, πιθανώς σε συνδυασμό με την τυπική χημειοθεραπεία, αποκλείοντας έτσι, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα οδούς που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την επιβίωση των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη.

5.2 ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΞΟΝΑ ΝΕΡ/ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΟΔΟΥ NFκB/UPS

5.2.1 Ενεργοποίηση της Οδού NFκB/UPS από τα Νευροπεπτίδια

Στην παρούσα εργασία ερευνήσαμε περαιτέρω αν αυτή η σαφής σχέση των δύο μηχανισμών σε σταθερή κατάσταση μεταφράζεται επίσης σε μια δυναμική σχέση, μετά τη διέγερση ή τον αποκλεισμό της οδού ΝΕΡ/NPs. Αυτό στην πραγματικότητα θα σήμαινε ότι τα νευροπεπτίδια θα μπορούσαν να δράσουν ως ενεργοποιητές του NFκB στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη, όπως κάνουν άλλοι γνωστοί εξωγενείς τέτοιοι παράγοντες. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα νευροπεπτίδια όπως η ενδοθελίνη 1 και η βομβεσίνη προκαλούν την μετακίνηση του NFκB στον πυρήνα των κυττάρων PC-3 (που δεν εκφράζουν ΝΕΡ), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NFκB ως μεταγραφικού παράγοντα, που καταδεικνύεται σαφώς με την αύξηση του σήματος πρόσδεσης στο DNA. Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με αυτά της ερευνητικής ομάδας του Levine ([Levine](#)

et al, 2003). Αυτή η ομάδα έδειξε ότι στα κύτταρα PC-3 η βομβεσίνη επέφερε χρονοεξαρτώμενη αύξηση της σύνδεσης του NFκB με το DNA που κορυφώθηκε στη 1 ώρα, ενώ στη συνέχεια, επανήλθε κοντά στα επίπεδα σταθερής κατάστασης. Σχετικά με την πυρηνική μετακίνηση του NFκB, έδειξαν ότι αυτή έλαβε χώρα στα 30 λεπτά, χωρίς όμως να αναφέρουν χρονοεξαρτώμενη επίδραση. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τα παραπάνω δείχνοντας ότι η πυρηνική μετακίνηση που επιφέρει η βομβεσίνη είναι επίσης χρονοεξαρτώμενη και κορυφώνεται την ίδια στιγμή με την αναφερθείσα αύξηση της σύνδεσης NFκB (1 ώρα). Το τελευταίο επιβεβαιώνεται επίσης και με τα δικά μας αποτελέσματα EMSA. Επιπλέον, αποδείξαμε ότι η ET-1 έχει ακριβώς την ίδια επίδραση στην ενεργοποίηση του NFκB, που είναι εμφανής τόσο στην ανάλυση ανοσοκυτταροχημικού ελέγχου, όσο και στην ανάλυση EMSA.

Τα αποτελέσματά μας παρέχουν σαφείς αποδείξεις ότι αυτή η επίδραση στην ενεργοποίηση του NFκB οφείλεται πραγματικά στα ίδια τα νευροπεπτίδια και όχι σε κάποιο τυχαίο αποτέλεσμα. Πρώτον, δεν έλαβε χώρα κάποια εμφανής πυρηνική μετακίνηση στις ίδιες συνθήκες επώασεων είτε με ET-1 είτε με BBS στα κύτταρα LnCap που εκφράζουν NEP. Η ανάλυση EMSA, που αποτελεί μια πιο ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσε κάποιο σήμα σύνδεσης NFκB/DNA σε αυτά τα κύτταρα, αλλά αυτή ήταν σαφώς χαμηλότερη συγκρινόμενη με τα κύτταρα PC-3. Ομοίως, η επώαση rhNEP εμπόδιζε με επιτυχία την πυρηνική μετατόπιση και ενεργοποίηση στα κύτταρα PC-3.

Περαιτέρω ενδείξεις προς την ίδια κατεύθυνση έδωσε το γεγονός ότι εμποδίστηκε, τουλάχιστον εν μέρει, αυτή η αύξηση της πυρηνικής

δραστηριότητας NFκB με τη χρήση των αντίστοιχων αναστολέων υποδοχέων, και αυτό αποδείχθηκε τόσο με ανοσοκυτταροχημικό έλεγχο όσο και με EMSA. Αυτό υποδηλώνει ότι αυτή η επίδραση των νευροπεπτιδίων επέρχεται μέσω των συγκεκριμένων υποδοχέων. Ο αποκλεισμός του υποδοχέα ET_A, όπως είχε προβλεφθεί, παρεμπόδισε απόλυτα την πυρηνική μετακίνηση, καθώς αποδείχθηκε ότι ο κύριος υπεύθυνος υποδοχέας για τις μιτογόνες επιδράσεις του ET-1 στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη είναι πράγματι ο υποδοχέας ET_A. Ο αποκλεισμός του υποδοχέα BB₂ επελέγη για τα πειράματά μας με βάση το γεγονός ότι τα καρκινώματα του προστάτη και τα κύτταρα PC-3 πιο συγκεκριμένα είναι γνωστό ότι εκφράζουν επαρκώς το GRP-R (*Reile et al, 1994; Sun et al, 2000; Levine et al, 2003*) και ότι οι μιτογόνες επιδράσεις του BBS στον καρκίνο του προστάτη και σε άλλου είδους καρκίνους επέρχονται κυρίως μέσω του υποδοχέα BB₂ (*Aprikian et al, 1996; de Visser, 2007*). Όμως, η βομβεσίνη ενεργεί σε δύο άλλους υποδοχείς, τον υποδοχέα νευρομεδίνης B (NMB-R) και τον υποτύπο 3 του υποδοχέα βομβεσίνης (BRS-3), που έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται στο 14% και στο 9% των καρκινωμάτων του προστάτη αντίστοιχα (*Sun et al, 2000*). Οι Levine et al υπέθεσαν ότι η ενεργοποίηση του NFκB που προκαλεί το BBS οφείλεται στην ενεργοποίηση του GRP-R βάσει της ικανότητας του ανταγωνιστή υποδοχέα BB₂ να εμποδίζει την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca⁺⁺ που προκαλεί το BBS (*Levine et al, 2003*). Όμως, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η πυρηνική μετακίνηση του NFκB οφείλεται κυρίως αλλά όχι εξ ολοκλήρου στην ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα. Μένει να διευκρινισθεί αν ο

αποκλεισμός και των άλλων δύο υποδοχέων θα αποτρέψει πλήρως την πυρηνική μετακίνηση του NFκB και την σχετική μεταγραφική του ενεργοποίηση. Αυτή η επίδραση συνδέεται με αύξηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας, υποδηλώνοντας ότι η πυρηνική μετακίνηση που επιφέρουν τα νευροπεπτίδια εξαρτάται από την πρωτεΐνη IκB. Πράγματι, οι διαδοχικές επώσεις και με τα δύο νευροπεπτίδια οδήγησαν σε χαμηλή ολική IκB-α στα κύτταρα PC-3, ενώ η επώαση αυτών των κυττάρων με rhNEP απέτρεψε αυτή την οφειλόμενη στα NPs μείωση στη συνολική ποσότητα IκB-α. Αυτό δείχνει ότι η ενεργοποίηση του NFκB από τα NPs πράγματι επέρχεται μέσω του IκB-α. Η ομάδα του Levine ([Levine et al, 2003](#)) έδειξαν επίσης μείωση των επιπέδων συνολικού IκB-α που προκαλεί η βομβεσίνη (100nM για 30 λεπτά). Επιπλέον, αποδείξαμε ότι η αναστολή του πρωτεοσώματος και του IKK εμπόδισε την πυρηνική μετατόπιση του NFκB που επιφέρουν τα NPs, υποδηλώνοντας ότι τα NPs διεγείρουν την ενεργοποίηση του NFκB μέσω της κανονικής οδού.

5.2.2 Πρώιμη Αύξηση Δραστηριότητας του 20S Πρωτεασώματος από τα Νευροπεπτίδια

Το γεγονός ότι ο αναστολέας πρωτεοσώματος απέτρεπε/εμπόδιζε σταθερά τις επιδράσεις των νευροπεπτιδίων που περιγράφησαν πιο πάνω υποστηρίζει έναν τρόπο δράσης που διενεργείται μέσω του πρωτεασώματος. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν επί συγκεκριμένου ότι τα νευροπεπτίδια μπορούν να ρυθμίσουν

προς τα πάνω τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε συντομότερης διάρκειας επώσεις και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που απαιτούνται για να επιτευχθεί ενεργοποίηση του NFκB. Μπορούμε έτσι να συμπεράνουμε ότι η αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος λαμβάνει χώρα νωρίς κατά την νευροπεπτιδική διέγερση.

Αυτή η πρώιμη αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος που επιφέρουν τα νευροπεπτίδια προηγείται της πυρηνικής μετακίνησης του NFκB, καθώς ξεκινά νωρίτερα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ φθάνει στο μέγιστο σημείο της σε χρόνους επώασης/συγκεντρώσεις που είναι ακόμα χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για να επιτευχθεί ορατή πυρηνική μετακίνηση. Είναι πιθανό επομένως ότι τα νευροπεπτίδια προκαλούν την αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος, και όταν αυτή φθάσει σε κρίσιμο επίπεδο οδηγεί σε ενεργοποίηση του NFκB μέσω της μείωσης του ολικού IκB-α.

Αυτή η προς τα πάνω ρύθμιση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος που σχετίζεται με τα νευροπεπτίδια μπορεί επίσης να εξηγεί το εύρημά μας σύμφωνα με το οποίο ο ανταγωνιστής υποδοχέα ET_A, αναστέλλοντας τη δράση όχι μόνο της εξωγενούς αλλά ακόμα και της αυτοκρινούς και παρακρινούς δράσης της ET-1 στα κύτταρα PC-3, οδηγεί σε 50% μείωση της δραστηριότητας σταθερής κατάστασης του πρωτεασώματος, ακόμα κι αν ακολουθεί διέγερση με ET-1. Το γεγονός ότι η προ-επώαση με ανταγωνιστή του υποδοχέα BB₂ δεν ήταν σε θέση να μειώσει τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε επίπεδα χαμηλότερα αυτών της σταθερής κατάστασης μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η βομβεσίνη ασκεί την επίδρασή της και μέσω άλλων υποδοχέων, όπως

αναφέρθηκε πιο πάνω. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι, καθώς η ρύθμιση της δραστηριότητας του πρωτεασωμικού συμπλέγματος είναι μια πολύ σύνθετη διαδικασία, και σίγουρα δεν είναι δυνατόν να συναχθούν απόλυτα συμπεράσματα ή να οδηγηθούμε σε γραμμικές σχέσεις.

Τα κύτταρα LnCaP έχουν ενδογενή παραγωγή NEP και επομένως η ET-1 που εκκρίνεται παρακρινώς αποδομείται. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι έχουν μειωμένη έκφραση ECE-1, με αποτέλεσμα μείωση της παραγωγής ET-1 (*Usmani et al, 2002*). Έτσι δεν αποτελεί έκπληξη ότι η επίδραση των εξωγενών νευροπεπτιδίων στη δραστηριότητα του πρωτεασώματος είναι συγκριτικά λιγότερο έντονη στα κύτταρα LnCaP. Ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις, η προς τα πάνω ρύθμιση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος που επιφέρουν τα NPs δεν δείχνει να είναι τόσο ισχυρή ώστε να οδηγήσει σε αρκετά χαμηλά επίπεδα IκB-α, αδυνατώντας έτσι να προκαλέσει ορατή πυρηνική μετακίνηση του NFκB στα LnCaP κύτταρα, όπως αποδείξαμε.

5.2.3 Παραγωγή ROS από τα Νευροπεπτίδια και Επαγόμενες Οδοί

Σε μια προσπάθεια να δημιουργηθεί ένα συνολικό μηχανιστικό μοντέλο που θα περιλαμβάνει και θα ερμηνεύει όλα τα δεδομένα μας, θα πρέπει να βασισθούμε σε ενδείξεις από άλλα *in vitro* συστήματα, καθώς δεν υπάρχει βιβλιογραφία που να ερευνά εις βάθος αυτούς τους μηχανισμούς στον καρκίνο του προστάτη. Η ET-1 είναι γνωστό ότι παράγει ενεργείς ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species,

ROS), μέσω των οποίων ασκεί τη μιτογόνο επίδραση της σε παθογόνες συνθήκες, όπως ο πολλαπλασιασμός πνευμονικών αρτηριακών λείων μυών (*Wedgwood et al, 2001*) και η υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων (*Hirotsu et al, 2002; Force et al, 2002*).

Η παραγωγή ROS φαίνεται να δρα με διάφορους τρόπους που τελικά επηρεάζουν τα ερεθίσματα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης. Κάποιοι από αυτούς εμπλέκονται στην ή επηρεάζουν την οδό NFκB/UPS. Πιο συγκεκριμένα, οι ROS είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, όπως οι EGFR και PDGFR (*Kamata & Hirata, 1999; Benhar et al, 2002*). Αυτό, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το Ras, οδηγεί σε επαγόμενη ενεργοποίηση και των τριών οδών πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (οδοί MAPK), δηλαδή (1) των κινασών που ρυθμίζονται με εξωκυττάρια σηματοδότηση (οδός ERK), (2) των κινασών c-Jun N-terminal (οδός JNK), και (3) των κινασών p-38 (οι δύο τελευταίες ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες [SAPKs]) (*Kamata & Hirata, 1999; Gupta et al, 1999; Hirotsu et al, 2002; Benhar et al, 2002; Martindale & Holbrook, 2002; Lau et al, 2008*). Η βομβεσίνη αποδείχθηκε επίσης ότι διεγείρει πολύ πρώιμα (στα 5 λεπτά επώασης με 10nM BBS) την κινάση MAP στα κύτταρα Swiss 3T3, αν και δεν ερευνήθηκε αν αυτή η επίδραση επήλθε και λόγω ROS (*Pang et al, 1993*).

Η παραγωγή ROS τελικά οδηγεί σε ενεργοποίηση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων, όπως των NFκB και AP-1 (*Gupta et al, 1999; Benhar et al, 2001; Martindale & Holbrook, 2002; Lau et al, 2008*). Η ενεργοποίηση του NFκB γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης του IκB-α που επιφέρει η οξειδωτική (προκαλείται επίσης

και από το MEKK1 και το Akt, τα οποία ενεργοποιούνται από τα ROS όπως παραπάνω) (*Martindale & Holbrook, 2002*) και μέσω επακόλουθης αυξημένης σύνδεσης της υπομονάδας p50 με το DNA. Βρέθηκε επίσης ότι η ενεργοποίηση του NFκB που επιφέρουν τα ROS επέρχεται μέσω της ρυθμιστικής αποπτωτικών σημάτων κινάσης 1 (ASK-1), η οποία είναι ενεργοποιητής των επαγόμενων από τα ROS οδών JNK και p38 (*Hirotsani et al, 2002*).

5.2.4 Δυνητικό Μοντέλο Νευροπεπτιδικής Διέγερσης: ROS – Πρωτεάσωμα - NFκB

Ενδείξεις από τη βιβλιογραφία δείχνουν ότι ένα μοντέλο αύξησης πρωτεασωματικής δραστηριότητας σε πρώιμο στάδιο με επαγόμενη ενεργοποίηση NFκB θα μπορούσε να συνδεθεί με την παραγωγή ROS που επιφέρουν τα νευροπεπτίδια, όπως ήδη αναφέραμε. Μάλιστα, πέραν των οδών που περιγράψαμε πιο πάνω, η παραγωγή ROS ευθύνεται επίσης για την ενεργοποίηση του PLCγ (Phospholipase C-gamma), που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κυτοσολικού Ca⁺⁺ και αυξημένη παραγωγή διασυλγλυκερόλης (DAG) (*Kamata & Hirata, 1999*). Τα δύο τελευταία με τη σειρά τους διεγείρουν την PKC (Protein kinase C; πρωτεϊνική κινάση C) (*Kamata & Hirata, 1999; Martindale & Holbrook, 2002*). Επίσης, η ενεργοποίηση του MAPK από τη βομβεσίνη που αναφέρθηκε πιο πάνω βρέθηκε ότι εξαρτάται από την PKC (*Pang et al, 1993*).

Μια άλλη σχέση μπορεί να είναι το γεγονός ότι η ET-1, μέσω του υποδοχέα ET_AR, είναι γνωστό ότι επιφέρει αύξηση της εξαρτώμενης από την Ca²⁺/καλμοδουλίνη κινάσης II (CaM kinase II, CaMKII) και της PKC, ένας μηχανισμός που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων (*Zhu et al, 2000; Backs et al, 2006*). Η βομβεσίνη έχει επίσης αποδειχθεί ότι διεγείρει την PKC *in vitro* (*Boccacio et al, 1991*).

Οι πρωτεΐνες MAPK, CaMKII και PKC έχουν όλες αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη δραστηριότητα της υπομονάδας 20S (χυμοθρυπτική) του πρωτεασώματος σε νευρωνικές συνάψεις στα ζώα (*Upadhya et al, 2005*). Ειδικά για την εPKC, έχει αποδειχθεί το ίδιο στα ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα στα πλαίσια της ανταπόκρισης του καρδιοκυττάρου σε ισχαιμική προσβολή στους ανθρώπους (*Churchill et al 2009*). Αν αληθεύει αυτό και για τα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη (δεν υπάρχουν ακόμα ενδείξεις στη βιβλιογραφία), αυτή η επαγόμενη από την ET-1 αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος θα μπορούσε επίσης να εξηγεί το εύρημά μας ότι ο ανταγωνιστής υποδοχέα ET_A, εμποδίζοντας τη δράση όχι μόνο των εξωγενών, αλλά ακόμα και της παρακρινούς δράσης της ET-1 στα κύτταρα PC-3, οδηγεί σε 50% μείωση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος, σε σχέση με τα επίπεδα σταθερής κατάστασης. Μπορεί έτσι να ερμηνευθεί επίσης το γεγονός ότι η αύξηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος που επιφέρουν τα νευροπεπτίδια κατά προηγείται της πυρηνικής μετακίνησης του NFκB, καθώς ξεκινά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και κορυφώνεται σε συγκεντρώσεις (1nM, 50nM) που εξακολουθούν να είναι χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για να επιτευχθεί

ορατή πυρηνική μετακίνηση (100nM). Έτσι μπορεί να ισχύει ότι τα νευροπεπτιδία που εμμέσως –πιθανώς μέσω παραγόμενων ROS– επάγουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος και όταν αυτή φτάνει σε ένα κρίσιμο επίπεδο οδηγεί σε ενεργοποίηση του NFκB μέσω της μείωσης του ολικού IκB-α. Μελλοντική έρευνα προς αυτήν την κατεύθυνση θα μπορούσε πιθανώς να διαλευκάνει αυτούς τους μηχανισμούς. Όμως, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, καθώς η ρύθμιση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος αποτελεί μια πολύ περίπλοκη διαδικασία, και κάθε ερευνητική προσέγγιση ανάλυσης του οφείλει να είναι ιδιαίτερα προσεκτική αναφορικά με τα επαγόμενα συμπεράσματα και μηχανιστικές υποθέσεις.

5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πρόσφατες τάσεις στην αντικαρκινική θεραπεία υποστηρίζουν την έννοια συνδυασμού θεραπειών για βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερο εύρος δράσης. Έτσι, η έρευνα των μοριακών μηχανισμών που καθορίζουν τους επιθετικότερους καρκινικούς φαινότυπους στοχεύει σε συνδυαστικές κλινικές εφαρμογές αγωνιστών/αναστολέων. Τα στοιχεία που παρουσιάσθηκαν εδώ δείχνουν ότι οι αγωνιστές και ανταγωνιστές της οδού NER/νευροπεπτιδίων επηρεάζουν τη δραστηριότητα της οδού NFκB/UPS. Έτσι, η συνδυαστική στόχευση αυτών των μηχανισμών μπορεί να αναστείλει πιο αποτελεσματικά τις οδούς που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την επιβίωση, την διήθηση και τη μετάσταση των κυττάρων στον καρκίνο του προστάτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliot PJ (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* **59**: 2615–2622.

Aprikian AG, Han K, Chevalier S, Bazinet M, Viallet J (1996). Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol* **16**: 297-306.

Aprikian AG, Tremblay L, Han K, Chevalier S (1997). Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int J Cancer* **72**: 498-504.

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC (2008). RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* **68**: 92-104.

Aronson WJ, Barnard RJ, Freedland SJ, Henning S, Elashoff D, Jardack PM, Cohen P, Heber D, Kobayashi N (2010). Growth inhibitory effect of low fat diet on

prostate cancer cells: results of a prospective, randomized dietary intervention trial in men with prostate cancer. *J Urol* **183(1)**: 345-350.

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiocyte hypertrophy.

Bagnato A, Spinella F, Rosanò L (2008). The endothelin axis in cancer: the promises and the challenge of molecularly targeted therapy. *Can J J Physiol Pharmacol* **86**: 473-484.

Bajo AM, Schally AV, Krupa M, Hebert F, Groot K, Szepeshazi K (2002). Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3836-3841.

Baldwin AS (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**: 241-246.

Banerjee S, Hussain M, Wang Z, Saliganan A, Che M, Bonfil D, Cher M, Sarkar FH (2007). In vitro and In vivo Molecular Evidence for Better Therapeutic Efficacy of ABT-627 and Taxotere Combination in Prostate Cancer. *Cancer Res* **67**: 3818-3826.

Bascom JL, Kenny PA (2005). Keystone symposium: the role of microenvironment in tumor induction and progression, Banff, Canada, 5-10 February 2005. *Breast Cancer Res* **7**: 113-118.

Bassères DS, Baldwin AS (2006). Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* **25**: 6817-6830.

Battistini B, Chailier P, D'Orléans-Juste P, Brière N, Sirois P (1993). Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* **14**: 385-389.

Benhar M, Engelberg D, Levitzki A (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* **3(5)**: 420-425.

Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH (1992). The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol* **147(3 Pt2)**: 817-821.

Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH (1992). Prostate specific antigen density: a means of distinguishing between benign prostate hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* **147(3 Pt2)**: 815-816.

Berger AP, Deibl M, Strasak A, Bektic J, Pelzer AE, Klocker H, Steiner H, Fritsche G, Bartsch G, Horninger W. Large-scale study of clinical impact of PSA velocity: long-term PSA kinetics as method of differentiating men with from those without prostate cancer. *Urology* **69**: 134-138.

Boccaccio C, Gaudino G, Cilli M, Mondino A, Comoglio PM (1991). Ligand-independent tyrosine phosphorylation of the receptor encoded by the c-neu oncogene. *Growth Factors* **5(3)**: 233-242.

Boisvert FM, Lam YW, Lamont D, Lamond AI (2009). A quantitative proteomic analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol Cell Proteom* [epub ahead of print].

Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M (1989). Bombesin Stimulates Growth of Human Prostatic Cancer Cells *In Vitro*. *Cancer* **63**: 1714-1720.

Brinkman AO, Trapman J (2000). Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Adv Pharmacol* **47**: 317-341.

Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J (1999). Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69(1-6)**: 307-313.

Carducci MS, Jimeno A (2006). Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. *Clin Cancer Res* **12**: 6296s-6300s.

Carducci MA, Saad F, Abrahamsson PA, Dearnaley DP, Schulman CC, North SA, Sleep DJ, Isaacson JD, Nelson JB (2007). A phase 3 randomised controlled trial of the efficacy and safety of Atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* **110**: 1959-1966.

Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW (1998). Lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**: 384-391.

Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, deKernion JB, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Subong EN, Parson RE, Gasior GH, Loveland KG, Southwick PC (1998). Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* **279(19)**: 1542-1547.

Catalona WJ, Southwick PC, Slawin KM, Partin AW, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, Richie JP, Walsh PC, Scardino PT, Lange PH, Gasior GH, Loveland KG,

Bray KR (2000). Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology* **56(2)**: 255-260.

Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL (2005). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* **10(1)**: 33-39.

Chen FE, Huang D, Chen YQ, Ghosh G (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor of NF- κ B bound to DNA. *Nature* **391**: 410-413.

Chen LF, Mu Y, Greene WC (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulate distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* **21**: 6539-6548.

Chen ZJ (2005). Ubiquitin signaling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* **7(8)**:

Churchill EN, Ferreira JC, Brum PC, Szweda LI, Mochly-Rosen D (2009). Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of δ PKC during reperfusion. *Cardiovasc Res* [epub ahead of print].

Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C (2002). Protein quality control; U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* **27**: 368-375.

Dai J, Shen R, Sumitomo M, Goldberg JS, Geng Y, Navarro D, Xu S, Koutcher JA, Garzotto M, Powell CT, Nanus DM (2001). Tumor-Suppressive Effects of Neutral Endopeptidase in Androgen-independent Prostate Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **7**: 1370–1377.

Dai J, Shen R, Sumitomo M, Stahl R, Navarro D, Gershengorn MC, Nanus DM (2002). Synergistic Activation of the Androgen Receptor by Bombesin and Low-Dose Androgen. *Clin Cancer Res* **8**: 2399-2405.

Dawson LA, Maitland NJ, Berry P, Turner AJ, Usmani BA (2006). Expression and localization of endothelin converting enzyme-1 in human prostate cancer. *Exp Biol Med* **231**: 1106-1110.

Dawson LA, Maitland NJ, Turner AJ, Usmani BA (2004). Stromal–epithelial interactions influence prostate cancer cell invasion by altering the balance of metallopeptidase expression. *Br J Cancer* **90**: 1577–1582.

Delongchamps NB, Singh A, Haas GP (2006). The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control* **13(3)**:158-168.

DeMartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 2007;129:659-62.

de Visser M, Bernard HF, Erion JL, Schmidt MA, Srinivasan A, Waser B, Reubi JC, Krenning EP, de Jung M (2007). Novel ¹¹¹In-labelled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**: 1228-1238.

Drews O, Zong C, Ping P (2007). Exploring proteasome complexes by proteomics approaches. *Proteomics* **7**: 1047-1058.

Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, Turnbull BW, Slate EH, Jacobs ET, Marshall JR, Clark LC; Nutritional Prevention of Cancer Study Group (2003). Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU Int* **91(7)**: 608-612.

Festuccia C, Guerra F, D'Ascenzo S, Giunciuglio D, Albini A, Bologna M (1998). *In vitro* regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int J Cancer* **75**: 418-431.

Force T, Haq S, Kilter H, Michael A (2002). Apoptosis signal-regulating kinase/Nuclear Factor- κ B. A novel signaling pathway regulates cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* **105**: 402-404.

Gao Z, Chiao P, Zhang X, Zhang X, Lazar M, Seto E, Young HA, Ye J (2005). Coactivators and corepressors of NF κ B in I κ B alpha gene promoter. *J Biol Chem* **280(22)**: 21091-21098.

Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV (2002). The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* **115**: 141-151.

Gilmore T (1990). NF- κ B, KBF1, *dorsal*, and *related* matters. *Cell* **62(5)**: 841-843.

Gilmore T (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**: 6680-6684.

Godara G, Pecher S, Jukic DM, D' Antonio JM, Akhavan A, Nelson JB, Pflug BR (2007). Distinct patterns of endothelin axia expression in primary prostate cancer. *Urol* **70**: 209-215.

Grant ES, Brown T, Roach A, Williams BC, Habib FK (1997). *In vitro* expression of endothelin-1 (ET-1) and the ET_A and ET_B ET receptors by the prostatic epithelium and stroma. *J Clin Endocrinol Metabol* **82(2)**: 508-513.

Guo Z, Dai B, Jiang T, Xu K, Xie Y, Kim O, Neshelwat I, Kong X, Melamed J, Handratta VD, Njar VCO, Brodie AMH, Yu LR, Veenstra TD, Chen H, Qiu Y

(2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* **10**: 309-319.

Gupta A, Rosenberg SF, Bowden GT (1999). Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogen* **20(11)**: 2063-2073.

Hansson J, Abrahamsson PA (2001). Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. *Ann Oncol* **12(Suppl. 2)**: S145-S152.

Hayden MS, Ghosh S (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.

Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR, Huttunen JK, Hartman AM, Haapakoski J, Malila N, Rautalahti M, Ripatti S, Mäenpää H, Teerenhovi L, Koss L, Virolainen M, Edwards BK. (1998). Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst* **90(6)**: 440-446.

Hirotsu S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M (2002). Involvement of Nuclear Factor- κ B and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in G-Protein-Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation* **105**: 509-515.

Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009

Iwamura M, di Sant'Agnese, Wu G, Benning CM, Cockett AT, Gershagen S (1994). Overexpression of human epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 by neuroendocrine cells in normal prostatic tissue. *Urology* **43**: 838-843.

James ND, Caty A, Borre M, Zonnenberg BA, Beuzeboc P, Morris T, Phung D, Dawson NA (2008). Safety and Efficacy of the Specific Endothelin-A Receptor Antagonist ZD4054 in Patients with Hormone-Resistant Prostate Cancer and Bone Metastases Who Were Pain Free or Mildly Symptomatic: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised, Phase 2 Trial. *Eur Urol* **55**: 1112-1123.

Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **276**: 42938-42944.

Jung T, Bader N, Grune T (2007). Oxidised proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **462**: 231-237.

Kamata H, Hirata H (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11(1)**: 1-14.

Kenny AJ (1993). Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles. *Biochem Soc Trans* **21**: 663–668

King KA, Hua J, Torday JS, Drazen JM, Graham SA, Shipp MA, Sunday ME (1993). CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation *in utero* by potentiating endogenous bombesin-like peptides. *J Clin Invest* **91**: 1969–1973.

Kirby RS, Patel MI. Fast Facts: Prostate Cancer. 5th ed., 2008. Health Press Limited, Oxford, UK.

Kroog GS, Jensen RT, Battey JF (1995). Mammalian bombesin receptors. *Med Res Rev* **15(5)**: 389-417.

Kung HJ, Evans CP (2009). Oncogenic activation of androgen receptor. *Urol Oncol* **27**: 48-52.

Lau ATY, Wang Y, Chiu JF (2008). Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* **104**: 657-667.

Lee JG, Zheng R, McCafferty JM, Burnstein KL, Nanus DM, Shen R (2009).

Endothelin-1 enhances the expression of the androgen receptor via activation of the *c-myc* pathway in prostate cancer. *Mol Carcinogen* **48**: 141-149.

Levine L, Lucci JA, Pazdrak B, Cheng JZ, Guo YS, Townsend CM Jr, Hellmich MR (2003). Bombesin stimulates nuclear factor κ B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* **63**: 3495-502.

Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ (2000). Proteasome Inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* **46(5)**: 673-683.

Lindholm PF, Bub J, Kaul S, Shidham VB, Kajdacsy-Balla A (2001). The role of constitutive NF- κ B activity in PC-3 human prostate cancer cell invasive behavior. *Clin Exp Metastasis* **18**: 471–479.

Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, Tammela TLJ, Vessella RL, Visakorpi T (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* **61**: 3550-3555.

Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia SM, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA, Parsons JK, Bearden JD, Crawford ED, Goodman GE, Claudio J, Winquist E, Cook ED, Karp DD, Walther P, Lieber

MM, Kristal AR, Darke AK, Arnold KB, Ganz PA, Santella RM, Albanes D, Taylor PR, Probstfield JL, Jagpal TJ, Crowley JJ, Meyskens FL Jr, Baker LH, Coltman CA Jr (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers. *JAMA* **301(1)**: 39-51.

Logothetis C, Hoosein N (1992). The inhibition of paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *J Cell Biochem* **16H(Suppl)**: 128-134.

Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA (2009). Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer. An update. *Arch Pathol Lab Med* **133**: 1033-1040.

Mahajan NP, Liu Y, Majumder S, Warren MR, Parker CE, Mohler JL, Earp HS, Whang YE (2007). Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(20)**: 8438-8443.

Mani A, Gelmann EP (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*. **23**: 4776-4789.

Markwalder R, Reubi JC (1999). Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res* **59**: 1152-1159.

Martindale JL, Holbrook NJ (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**: 1-15.

Masaki T (2000). The endothelin families: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **53(4 Suppl2)**: S3-S5.

Miller J, Gordon C (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett* **579**: 3224-3230.

Miller RE, Roudier M, Jones J, Armstrong A, Canon J, Dougall WC (2008). RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol Cancer Ther* **7**: 2160-2169.

Mohler J *et al* (2010). National Comprehensive Cancer Network Prostate Cancer Practice Guidelines, v.1.2010

Muenchen HJ, Lin DL, Walsh MA, Keller ET, Pienta KJ (2000). Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor- κ B by an I κ B α "super-repressor". *Clin Cancer Res* **6**:1969–1677.

Munster PN, Marchion D, Thomas S, Egorin M, Minton S, Springett G, Lee JH, Simon G, Chiappori A, Sullivan D, Daud A (2009). Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker *Br J Cancer* **101**: 1044-1050.

Nanus DM (2003). Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 6307-6309.

Nazareth LV, Weigel NL (1996). Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem* **271**: 19900-19907.

Naujokat C, Fuchs D, Berges C (2007). Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1389-1397.

Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 110-116.

Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW (1996). Endothelin-1 Production and Decreased Endothelin B Receptor Expression in Advanced Prostate Cancer. *Cancer Res* **56**: 663-668.

Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberg MA, Simons JW (1995). Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nature Med* **1**: 944-949.

Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J, Carducci M (2008). Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Atrasentan in Patients With Nonmetastatic, Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer* **113**: 2478-2487.

Nixon RG, Brawer MK (1997). Enhancing the specificity of prostate-specific antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. *Br J Urol* **79(Suppl 1)**: 61-67.

O'Connor OA. Proteasome inhibitors. In: *Chabner BA, Longo DL, eds. Cancer Chemotherapy and Biotherapy. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp. 621-640.*

Osman I, Dai J, Mikhail M, Navarro D, Taneja SS, Lee P, Christos P, Shen R, Nanus DM (2006). Loss of neutral endopeptidase and activation of protein kinase B (Akt) is associated with prostate cancer progression. *Cancer* **197**: 2628-2636.

Osman I, Yee H, Taneja SS, Levinson B, Zeleniuch-Jacquotte A, Chag C, Nobert C, Nanus DM (2004). Neutral endopeptidase protein expression and prognosis in localised prostate cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 4096-4100.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* **78**: 773-785.

Pang L, Decker SJ, Saltiel AR (1993). Bombesin and epidermal growth factor stimulate the mitogen-activated protein kinase through different pathways in Swiss 3T3 cells. *Biochem J* **289**: 283-287.

Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millican RE, Tu SM, Pagliaro L, Kim J, Adams J, Elliott P, Essetine D, Petrusich A, Dieringer P, Perez C, Logothetis CJ (2004). Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumours with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* **22**: 2108-2121.

Papandreou CN, Logothetis CJ (2004). Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* **64**: 5036-5043.

Papandreou CN, Usmani BA, Geng Y, Bogenreider T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM (1998). Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Med* **4**: 50-57.

Park SY, Cooney RV, Wilkens LR, Murphy SP, Henderson BE, Kolonel LN (2010). Plasma 25-hydroxyvitamin D and prostate cancer risk: The Multiethnic Cohort. *Eur J Cancer* Jan 9. [Epub ahead of print]

Parkin DM, Bray F, Ferlay j, Pisani P (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.

Paule B, Terry S, Kheuang L, Soyeux P, Vacherot F, de la Taille A (2007). The NF- κ B/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: new therapeutic approaches? *World J Urol* **25**: 477-489.

Pickart CM (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**: 181-190.

Pickart CM, Cohen RE (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat rev Mol Cel Biol* **5**: 177-187.

Porter MP, Stanford JL (2005). Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate* **62(4)**: 316-321.

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**: 884-888.

Ouadrhiri Y, Pilette C, Monteiro RC, Vaerman JP, Sibille Y (2002). Effect of IgA on respiratory burst and cytokine release by human alveolar macrophages: role of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26(3)**: 315-332.

Rechsteiner M, Hill CP (2005). Mobilising the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* **15(1)**: 27-33.

Redman MW, Tangen CM, Goodman PJ, Lucia MS, Coltman CA Jr, Thompson IM (2008). Finasteride does not increase the risk of high-grade prostate cancer: a bias-adjusted modeling approach. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **1(3)**: 174-181.

Reile H, Armatis PE, Schally AV (1994). Characterization of high-affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate: cancer cell lines PC-3 and DU-145: internalization of receptor bound ¹²⁵I-(Tyr⁴) bombesin by tumor cells. *Prostate* **25**: 29-38.

Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE (1992). 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US black and white males. *Lancet* **339(8798)**: 887-889.

Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Kaur P, Gray K, Stringer B (2004). Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* **10**: 2466–2472.

Ryan RR, Katsuno T, Mantley SA, Pradhan TK, Weber HC, Coy DH, Battey JF, Jensen RT (1999). Comparative pharmacology of the nonpeptide neuromedin B receptor antagonist PD 168368. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 1202-1211.

Sanford DC, Dewille JW (2005). C/EBPdelta is a downstream mediator of IL-6 induced growth inhibition of prostate cancer cells. *Prostate* **63**: 143-154.

Scheidereit C (2006). I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* **25**: 6685-6705.

Schultz WA, Hoffmann MJ (2009). Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol* **19**: 172-180.

Shang Y, Myers M, Brown M (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* **9**: 601-610.

Shen R, Sumitomo M, Dai J, Harris A, Kaminetzky D, Gao M, Burnstein KL, Nanus DM (2000a). Androgen-Induced Growth Inhibition of Androgen Receptor Expressing Androgen-Independent Prostate Cancer Cells Is Mediated by Increased Levels of Neutral Endopeptidase. *Endocrinol* **141**: 1699-1704.

Shen R, Sumitomo M, Dai J, Hardy DO, Navarro D, Usmani B, Papandreou CN, Hersh LB, Shipp MA, Freedman LP, Nanus DM (2000b). Identification and characterization of two androgen response regions in the human neutral endopeptidase gene. *Mol Cell Endocrinol* **170**: 131–142.

Sherwood ER, Lee C (1995). Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol* **13**: 290-296.

Shipp MA, Look AT (1993). Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* **84**: 1052–1070.

Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Steins H, Sundays ME, Reinherz EL (1991). CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-

like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10662-10666.

Spiotto MT, Chung TD (2000). STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Prostate* **42**: 186-195.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* **17(4)**: 337-347.

Steiner MS (1993). Role of peptide growth factors in prostate. *Urology* **42**: 88-110.

Suh J, Rabson AB (2004). NF- κ B activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* **91**: 110-117.

Sumitomo M, Milowsky MI, Shen R, Navarro D, Dai J, Asano T, Hayakawa M, Nanus DM (2001). Neutral Endopeptidase Inhibits Neuropeptide-mediated Transactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor-Akt Cell Survival Pathway. *Cancer Res* **61**: 3294–3298.

Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou CN, Giancotti FG, Knudsen B, Nanus DM (2000). Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* **106**:1399–1407.

Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, Murai M, Miyajima A, Kimura F, Hayakawa M, Nakamura H (1999). An essential role for nuclear factor kappa B in preventing TNF- α -induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* **161**: 674–679.

Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M (2000). Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate* **42**: 295-303.

Sun M, Yang L, Fedman RI, Sun X, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ (2003). Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway by Androgen through Interaction of p85 α , Androgen Receptor, and Src. *Biol Chem* **278(44)**: 42992-43000.

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259(5103)**:1912-1915.

Sweeny C, Shanmugam R, Bhat-Nakshatri P, Jayaprakasan V, Baldrige LA, Gardner T, Smith M, Nakshatri H, Cheng L (2004). Nuclear factor- κ B is constitutively activated in prostate cancer *in vitro* and is overexpressed in

prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* **10**: 5501-5507.

Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA Jr (2003). The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Eng J Med* **349(3)**: 215-224.

Tiraboschi G, Jullian N, Thery V, Antonczak S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1999). A three-dimensional construction of the active site (region 507-749) of human neutral endopeptidase (EC.3.4.24.11). *Prot Engineer* **12(2)**: 141-149.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310(5748)**: 644-648.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays* **23**: 261-269.

Upadhyya SC, Ding L, Smith TK, Hedge AN (2006). Differential regulation of proteasome activity in the nucleus and the synaptic terminals. *Neurochem Int* **48**: 296-305.

Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM (2000). Methylation of the Neutral Endopeptidase Gene Promoter in Human Prostate Cancers. *Clin Cancer Res* **6**: 1664–1670.

Usmani B, Harden B, Maitland NJ, Turner AJ (2002). Differential expression of neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) and endothelin-converting enzyme in human prostate cancer cell lines. *Clin Sci* **103**: 3145-3175.

Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN (2009a). The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 1: post-translational regulation. *J Cell Mol Med* **13(9B)**: 3006-3018.

Vlachostergios PJ, Patrikidou A, Daliani DD, Papandreou CN (2009b). The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: transcriptional regulation. *J Cell Mol Med* **13(9B)**: 3019-3031.

Wedgwood S, Dettman RW, Black SM (2001). ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L1058-L1067.

Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Rev Mol Cell Biol* **6**: 599-609.

Wilson TJ, Singh RK (2008). Proteases as modulators of tumor–stromal interaction: Primary tumors to bone metastases. *Biochim Biophys Acta* **1785**: 85-95.

Witte JS (2009). Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nat Rev Genet* **10**: 77-82.

Yoshida T, Kinoshita H, Segawa T, Nakamura E, Inoue T, Shimizu Y, Kamoto T, Ogawa O (2005). Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. *Cancer Res* **65(21)**: 9611-9616.

Yu EY, Wilding G, Posadas E, Gross M, Culine S, Massard C, Morris MJ, Hudes G, Calabrò F, Cheng S, Trudel GC, Paliwal P, Sternberg CN (2009). Phase II Study of Dasatinib in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **15(23)**: 7421-7428.

Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2000). Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1 induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* **275(20)**: 15239-15245.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- a. Entrez-PubMed database, National Library of Medicine, National Institute of Health, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
- b. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, Cancer Statistics Review 1975-2006, National Cancer Institute, USA. http://seer.cancer.gov/crs/1976_2006
- c. American Cancer Society, Statistics for 2009. http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp
- d. DevCan: Probability of Developing or Dying of Cancer Software, Version 6.3.0 Statistical Research and Applications Branch, NCI, 2008. <http://srab.cancer.gov/devcan>
- e. National Comprehensive Cancer Network, USA. <http://www.nccn.org>
- f. Rel/NFκB Transcriptions Factors. <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html>
- g. GenBank®, Genetic Sequence Database, National Institute of Health (NIH), USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
- h. GeneCards®, Gene database. <http://www.genecards.org/>
- i. UniProt, Universal Protein Recourse database. <http://www.uniprot.org/>
- j. Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- k. European Collecton of Animal Cell Cultures (ECACC), <http://www.hpacultures.org.uk>

Παράρτημα I

Ανθρώπινα Σηματοδοτικά Γονίδια Rel/NFκB

<i>Protein Name</i>	<i>Human Gene Name</i>	<i>GenBank ID</i>	<i>Chromosomal Location</i>
c-Rel	REL	5966	2p16.1
RelA (p65)	RELA	5970	11q13.3
RelB	RELB	5971	19q13.2
p50/p105	NFKB1	4790	4q24
p52/p100	NFKB2	4791	10q24.32
IκBα	NFKBIA	4792	14q13.3
IκBβ	NFKBIB	4793	19q13.3
IκBε	NFKBIE	4794	6p21.1
IKKα	CHUK	1147	10q24.31
IKKβ	IKBKB	3551	8p11.22
IKKγ	IKBKG	8517	Xq28
Bcl-3	BCL3	602	19q13.2

Πηγή: <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html>

Παράρτημα II

Γονίδια-στόχοι NFκB: Ομάδες και παραδείγματα

<i>Gene</i>	<i>Function</i>	<i>Accession No</i>	<i>Human Gene Name</i>
<i>Cytokines/Chemokines and their modulators</i>			
IFN-γ	Interferon	NM_000619	IFNG
IL6	Interleukin 6, inflammatory cytokine	NM_000600	IL6
IL8	Interleukin 8, alpha-chemokine	NM_000584	IL8
TNFalpha	Tumour necrosis factor alpha	NM_000594	TNF
<i>Immunoreceptors</i>			
CD40	TNF-receptor family member	NM_001250	CD40
CD154	CD40 ligand	NM_000074	CD40LG
CD83	T-cell development molecule	NM_004233	CD38
<i>Proteins involved in antigen presentation</i>			
Complement B	Activator of alternative complement pathway	NM_001710	CFB
Proteasome subunit LMP2	Subunit of 28S proteasome, cysteine protease	NM_002800	PSMB9
<i>Cell adhesion molecules</i>			
ELAM-1 (CD62E, E-selectin)	E-selectin, endothelial cell leukocyte adhesion	NM_000450	SELE

	molecule		
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	NM_000201	CD54
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule	NM_001078	VCAM1
<i>Acute phase proteins</i>			
C-reactive protein	Host defense protein	NM_000567	CRP
Urokinase-type plasminogen activator	Activates fibrinogen	NM_002658	PLAU
			<i>Stress response genes</i>
COX-2	Cyclooxygenase, prostaglandin endoperoxide synthase	NM_000963	PTGS2
MAP4K1	Activator of stress-induced protein kinase pathway	NM_001042600	MAP4K1
			<i>Cell surface receptors</i>
Epidermal growth factor receptor	Receptor for EGF	NM_005228	EGFR
ErbB2	EGF-like receptor	NM_001005862	ERBB2
<i>Regulators of apoptosis</i>			
Bax	Pro-apoptotic Bcl-2 homologue	NM_004324	BAX
Bcl-xL	Pro-survival Bcl-2 homologue	NM_138578	BCL2L1
Bcl-2	Pro-survival factor	NM_000633	BCL2
<i>Growth factors, ligands, and their modulators</i>			
VEGF C	Vascular Endothelial Growth Factor	NM_005429	VEGFC
EPO	Erythropoetin	NM_000799	EPO
G-CSF	Granulocyte colony stimulating	NM_00059	GSF3

factor			
<i>Early response genes</i>			
B94	Early response gene	NM_006291	TNFAIP2
P62	Non-proteasomal multi-ubiquitin chain binding protein	NM_016221	DCTN4
<i>Transcription factors and their modulators</i>			
Bcl-3	Coactivator of NFκB p50 and p52	NM_005178	BCL3
Nfkb1	NFκB p105 precursor	NM_003998	NFKB1
Nfkb2	NFκB p100 precursor	NM_001077493	NFKB2
<i>Enzymes</i>			
MMP-3, matrix metalloproteinase-3	Secreted collagenase	NM_002422	MMP3
MMP-9, matrix metalloproteinase-3	Secreted collagenase	NM_004994	MMP9
<i>Miscellaneous</i>			
Cyclin D1	Cell cycle regulator	NM_053056	CCND1
Endothelin 1	Vasoconstrictor/mitogen	NM_001955	EDN1
PTEN	Tumour suppressor	NM_000314	PTEN

Πηγή: <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html>

Ιδιότητες Φυσικών Κυτταρικών Σειρών Καρκίνου Προστάτη

Κυτταρική Σειρά LNCaP (πηγή: ECACC)

General Cell Collection: LNCap clone FGC

Catalogue No.:	89110211
Cell Line Name:	LNCap clone FGC
Keywords:	Human Caucasian prostate carcinoma
Cell Line Description:	Derived from a metastasis at the left supraclavicular lymph node of a 50 year old patient with a confirmed diagnosis of metastatic prostate carcinoma. Growth and acid phosphatase production is affected by 5-alpha-dihydrotestosterone. They do not form a uniform monolayer and attach only lightly to the substrate. When shipped, cells detach from flask and can either be incubated 24-48 hours to allow attachment or be collected by centrifugation (150xg, 15 minutes) and reseeded.
Species:	Human
Tissue:	Prostate
Morphology:	Epithelial-like
Growth Mode:	Adherent
Passage No:	+6
Subculture Routine:	Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO ₂ ; 37°C. Cells grow slowly in clusters and can be disaggregated by repeated pipetting. After subculture cells take up to 48 hours to reattach. Do not disturb during this period. Medium is rapidly acidified, change twice per week.
Culture Medium:	RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10mM HEPES + 1.0 mM sodium pyruvate + 10% Foetal Bovine Serum (FBS).
Karyotype:	Pseudodiploid male; seven marker chromosomes, modal number 46, range 33 to 91
Products:	Prostate acid phosphatase, prostate specific antigen
Receptors:	Androgen, estrogen
Depositor:	Obtained from ATCC

Originator: No
Country: USA
References: Cancer Genet Cytogenet 1984; 11:399; Cancer Res 1983; 43:1809; Cancer Res 1997; 57:3339; J Biol Chem 1996; 271:13228

Additional Bibliography: Murphy, G.P.,ed.,Models for prostate cancer.37 New York:Liss;1980:pp115-132 Gibas Z et al. A high resolution study of chromosome changes in a human prostatic carcinoma cell line (LNCap).Cancer Genet. Cytogenet. 11:399-404,1984 Horoszewicz JS et al. LNCap model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 43:1809-1818, 1983 Hu SX et al. Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression. Cancer Re. 57:3339-3343,1997 Boffa LC et al. Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. J.Biol. Chem. 271:13228-13233, 1996

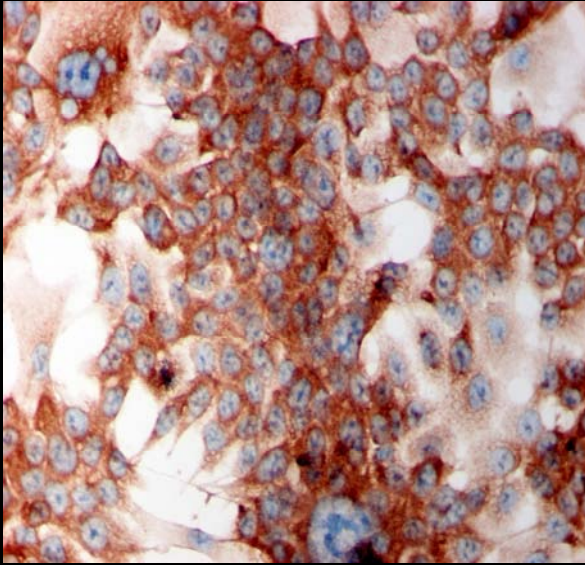
Κυτταρική Σειρά PC-3 (πηγή: ECACC)

General Cell Collection: PC-3

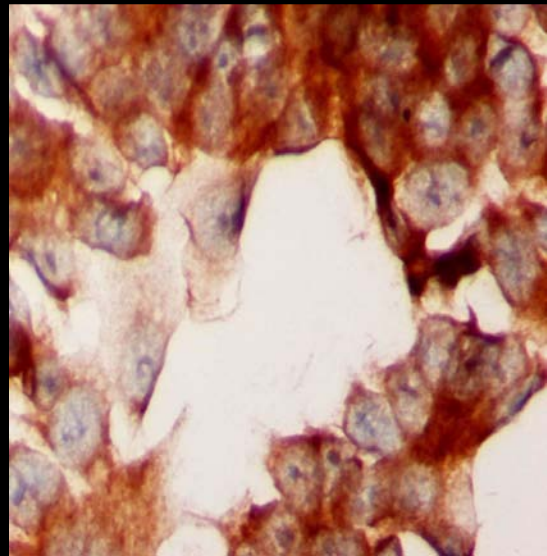
Catalogue No.:	90112714
Cell Line Name:	PC-3
Keywords:	Human Caucasian prostate adenocarcinoma
Cell Line Description:	Established from a grade 4 prostatic adenocarcinoma from a 62 year old male Caucasian. The cells grow in agar and produce tumours in nude mice. Exhibit low acid phosphatase and testosterone-5-alpha reductase activity.
Species:	Human
Tissue:	Prostate
Morphology:	Epithelial
Growth Mode:	Adherent
Passage No:	25
Subculture Routine:	Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:2 to 1:6 i.e. seeding at 2-5x10,000 cells/cm ² using 0.25% trypsin/EDTA; 5% CO ₂ ; 37°C. Medium change every 5 days. The initial subculture interval after cells are thawed may be longer than 7-9 days.
Culture Medium:	Coons Modified Ham's F12 + 2mM Glutamine + 7% Foetal Bovine Serum (FBS).OR Kaign's modified Ham's F12 + 45mg/L ascorbic acid + 18 mg/L Inositol + 2mM Glutamine + 7% Foetal Bovine Serum (FBS).
Karyotype:	2n = 46, triploid, modal no. 62
Depositor:	Obtained from ATCC
Originator:	No
Country:	USA
References:	Invest Urology 1979;17:16; Cancer Res 1980;40:524

Παράρτημα IV

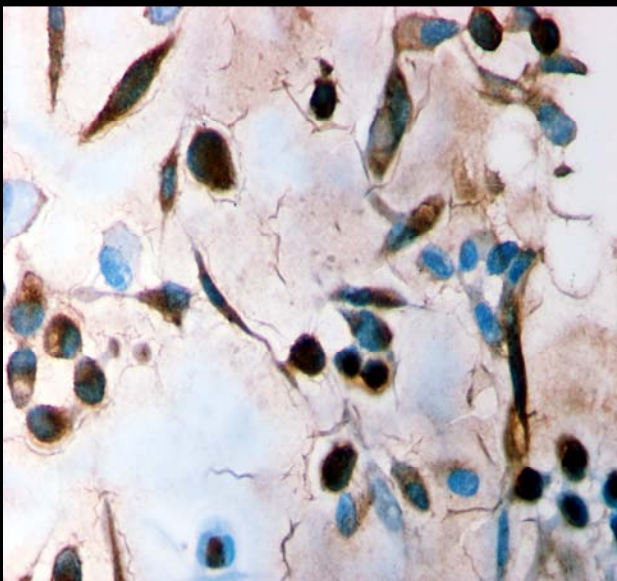
Ανοσοκυτταροχημεία NFκB



LnCaP; NFκB staining (x10)



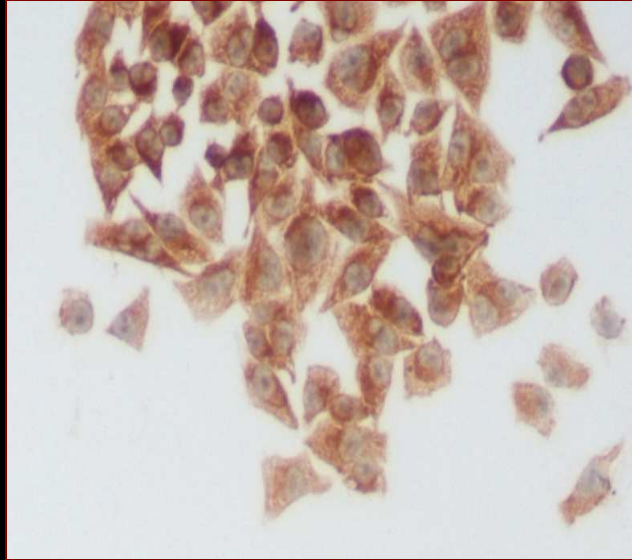
LnCaP; NFκB staining (x40)



PC-3; NFκB staining (x10)



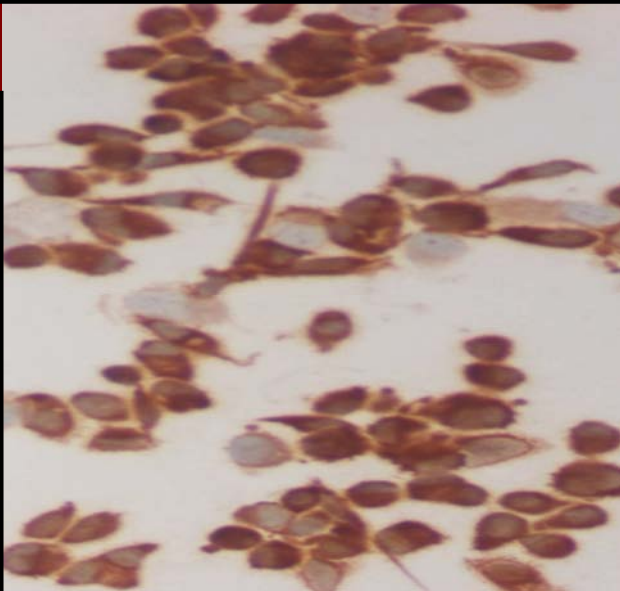
PC-3; NFκB staining (x40)



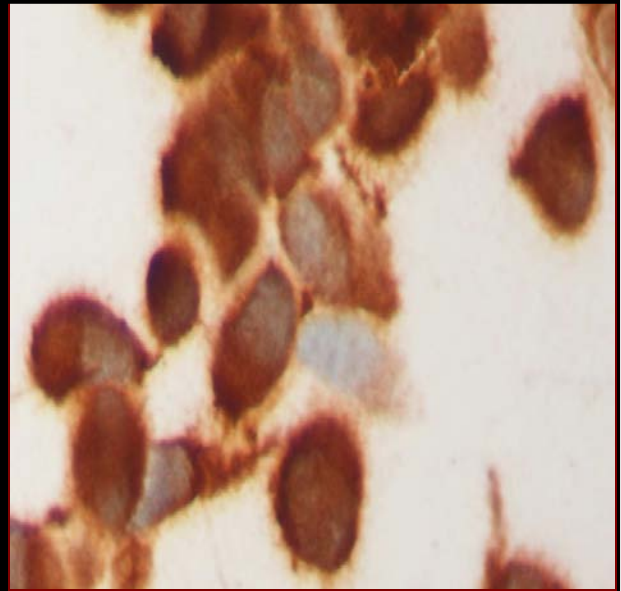
WT-5: tet- 48hrs; NFκB staining (x20)



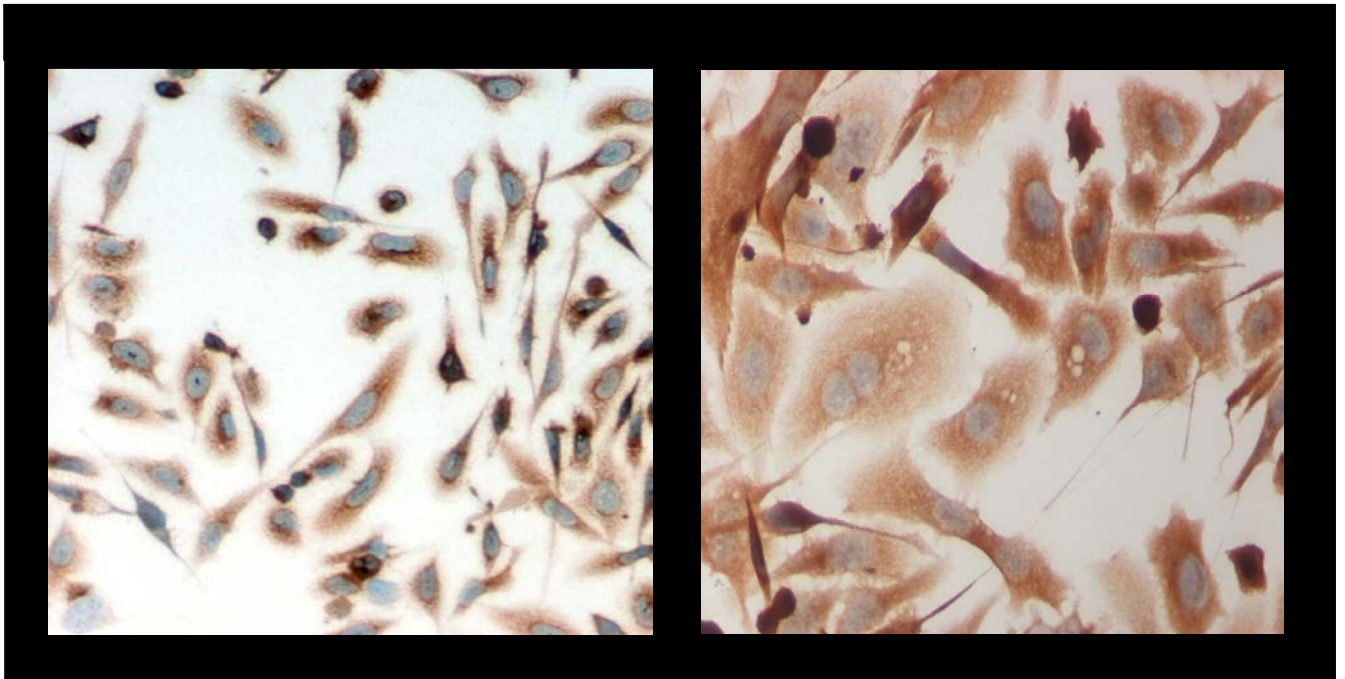
WT-5: tet- 48hrs; NFκB staining (x40)



WT-5: tet+; NFκB staining (x20)

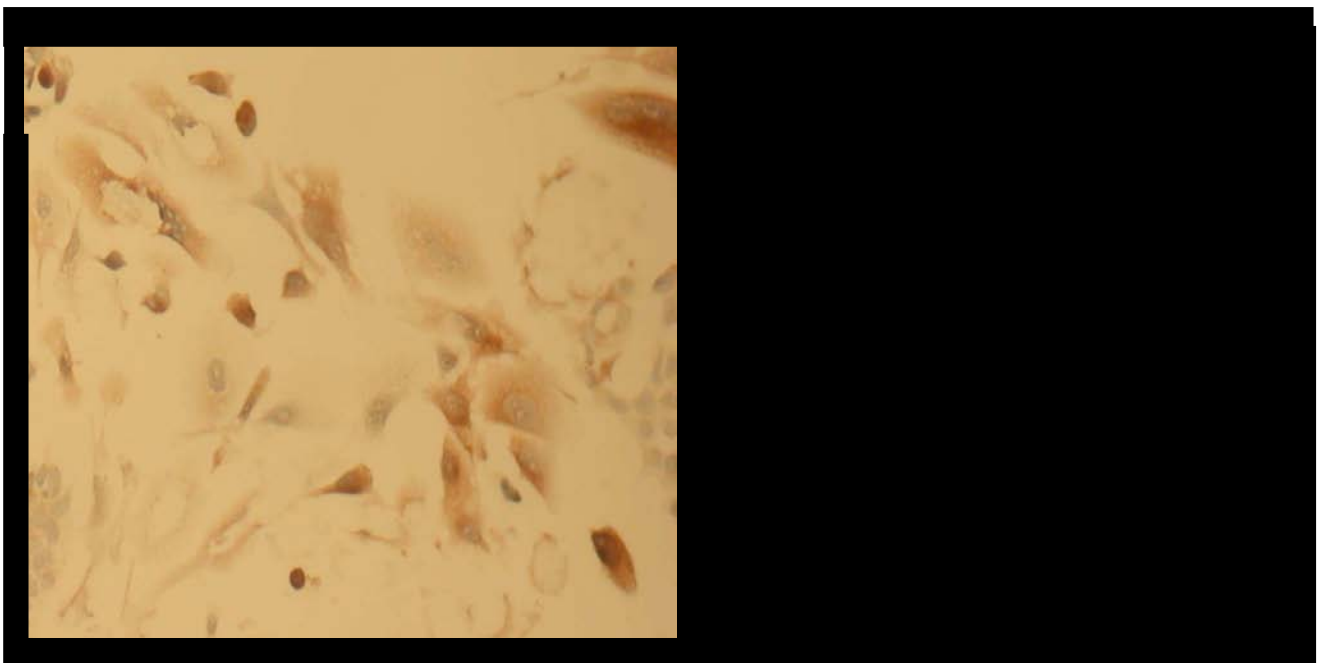


WT-5: tet+; NFκB staining (x40)

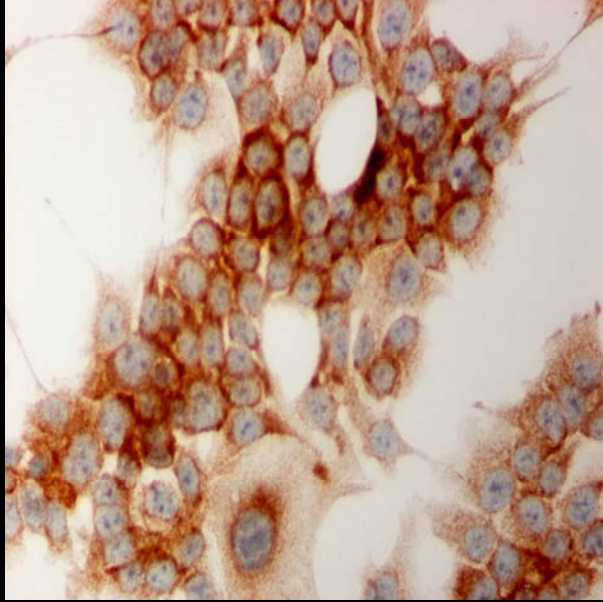


PC-3: Bortezomib 1 μ M (90min); NF κ B staining (x20)

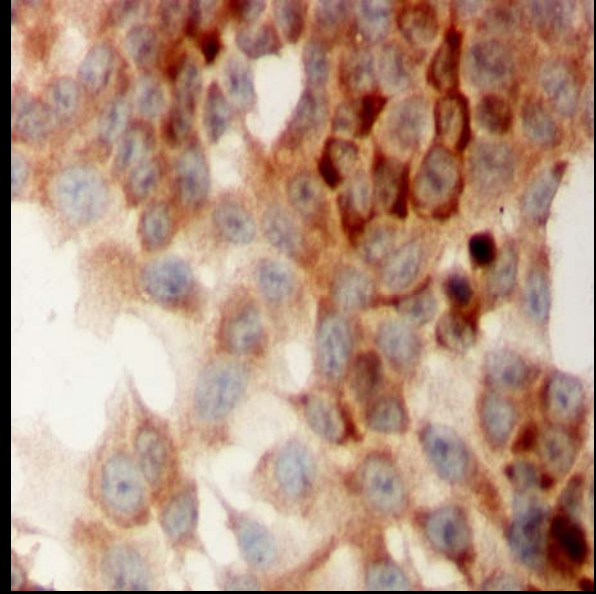
PC-3: Wedelolactone 50 μ M (90min); NF κ B staining (x40)



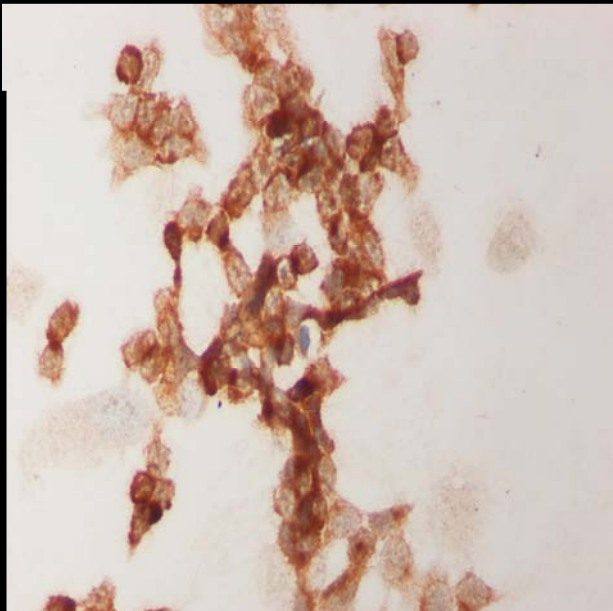
PC-3: BAY-7082 20 μ M (16hrs); NF κ B staining (x10)



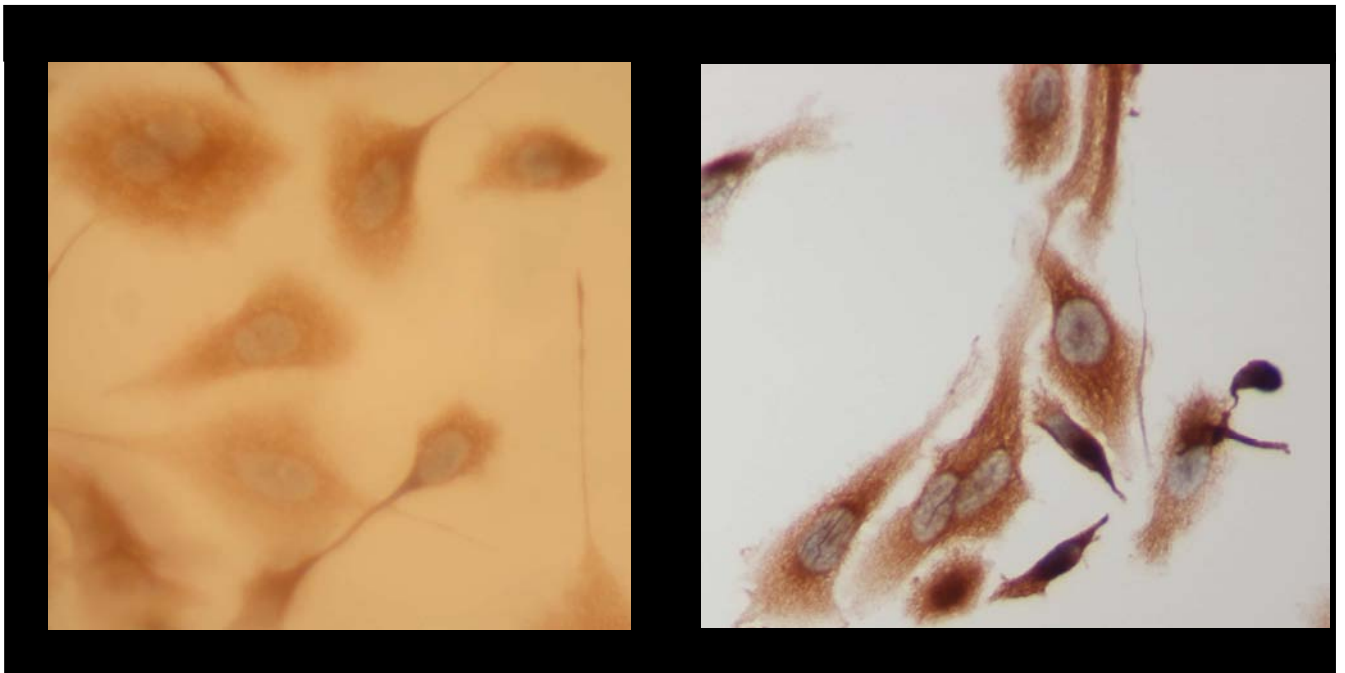
LnCaP: Bortezomib 1 μ M (90min); NF κ B staining (x20)



LnCaP: Wedelolactone 50 μ M (90min); NF κ B staining (x40)

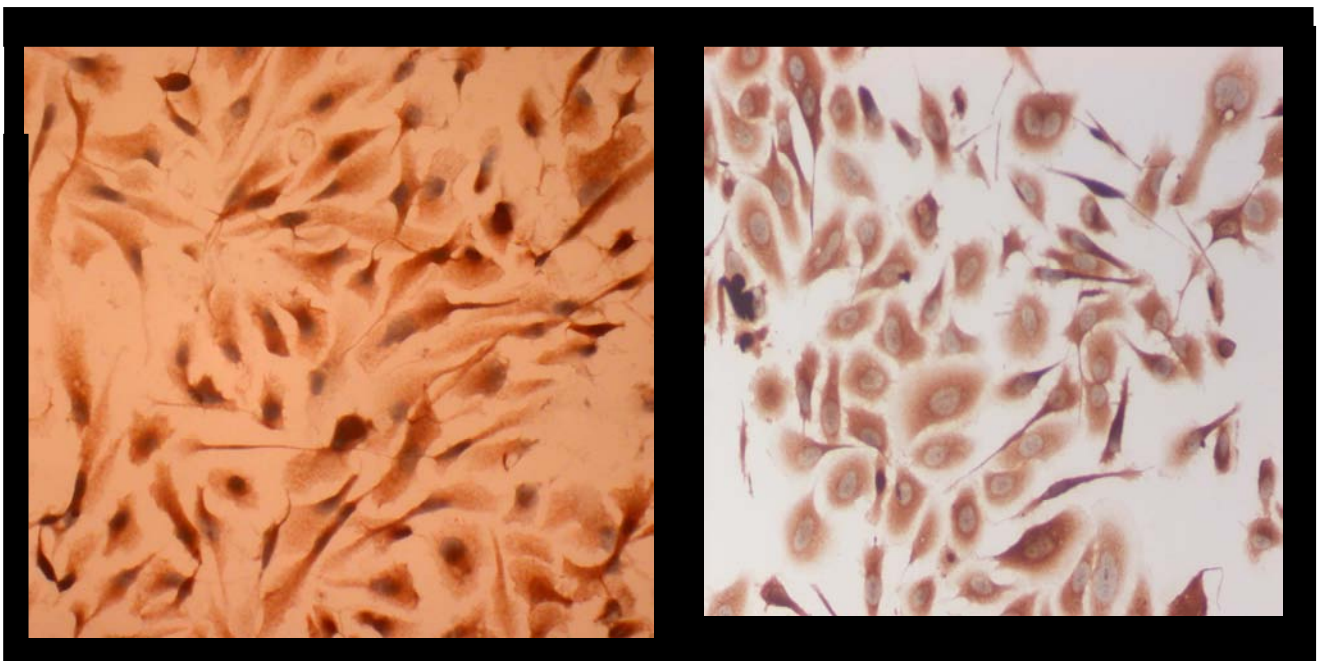


LnCaP: BAY-7082 20 μ M (16hrs); NF κ B staining (x10)



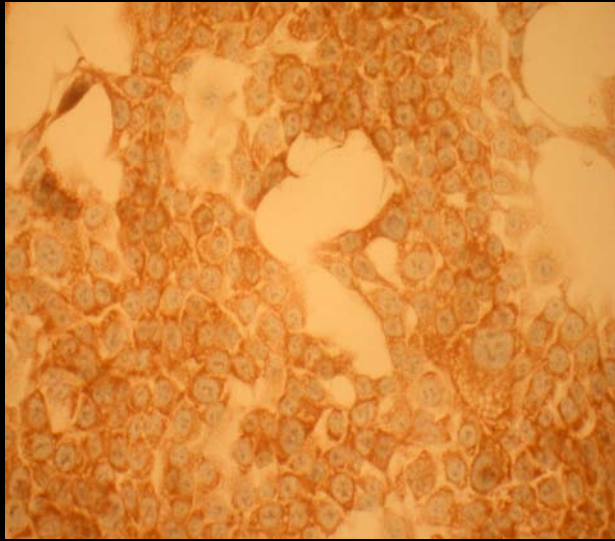
PC-3: ET-1 1nM (45 min); NF κ B staining (x40)

PC-3: ET-1 50nM (45 min); NF κ B staining (x40)

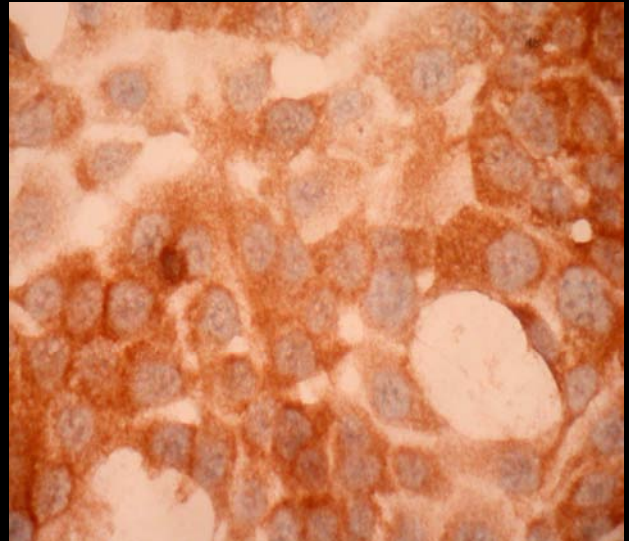


PC-3: ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x20)

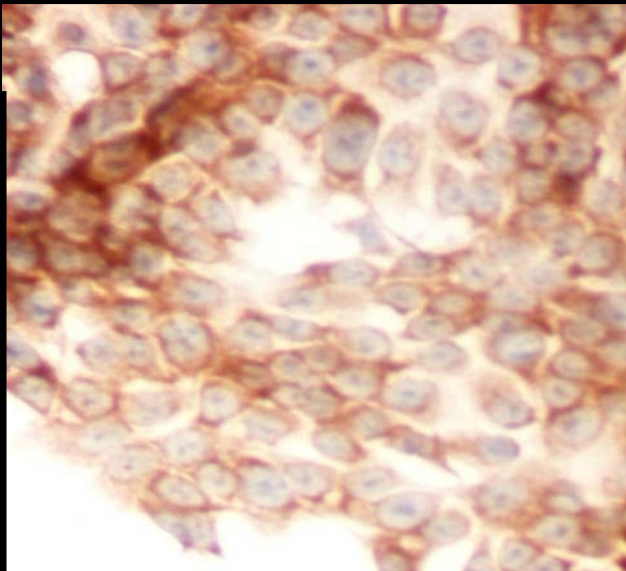
PC-3: BQ-123 1 μ M (30min)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x20)



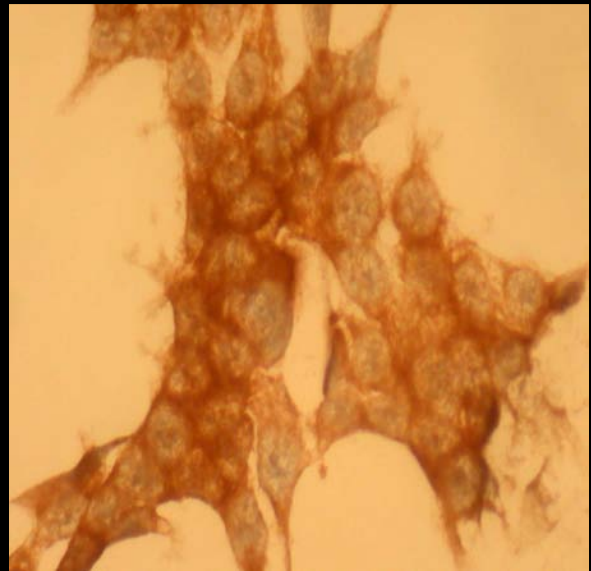
LnCaP: ET-1 1nM (45 min); NF κ B staining (x10)



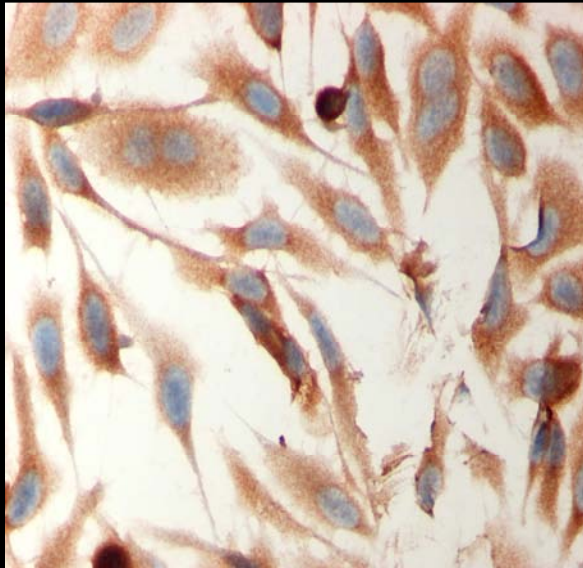
LnCaP: ET-1 50nM (45 min); NF κ B staining (x40)



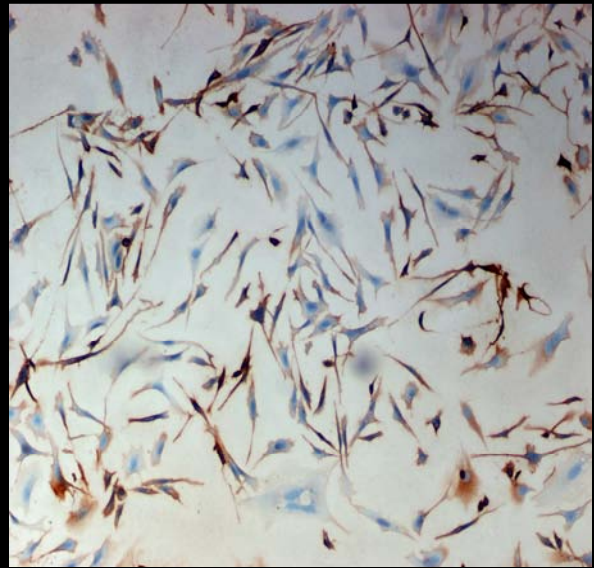
LnCaP: BQ-123 1 μ M (30min)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x10)



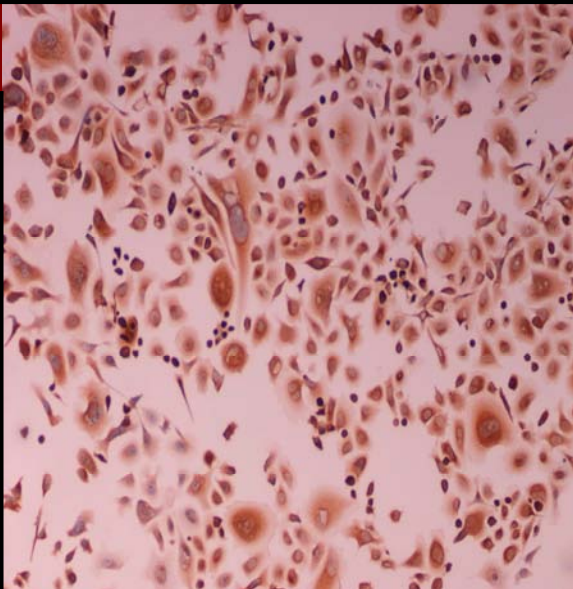
LnCaP: BQ-123 1 μ M (30min)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x40)



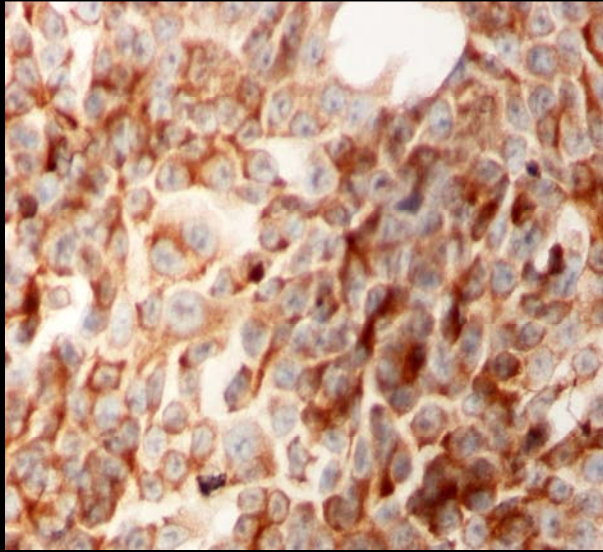
PC-3: Bortezomib 1μM (90min)+ET-1 100nM (45min); NFκB staining (x40)



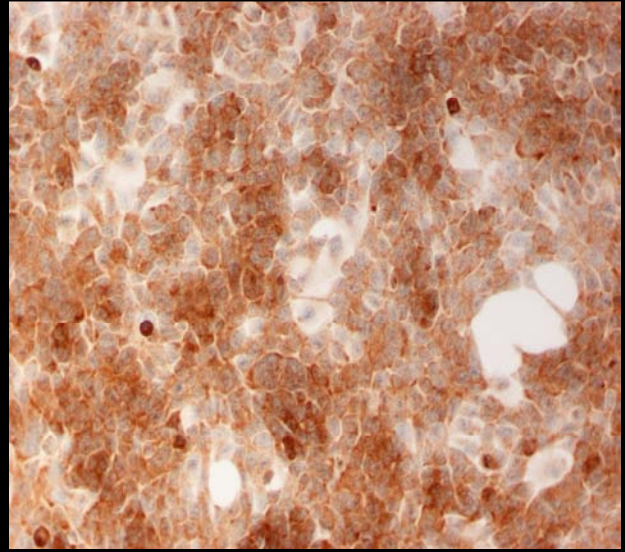
PC-3: Wedelolactone 50μM (90min)+ET-1 100nM (45min); NFκB staining (x10)



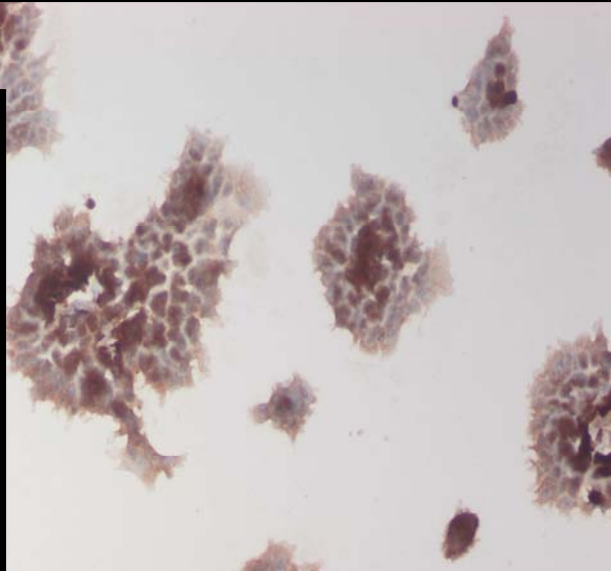
PC-3: BAY-7082 20μM (16hrs)+ET-1 100nM (45min); NFκB staining (x10)



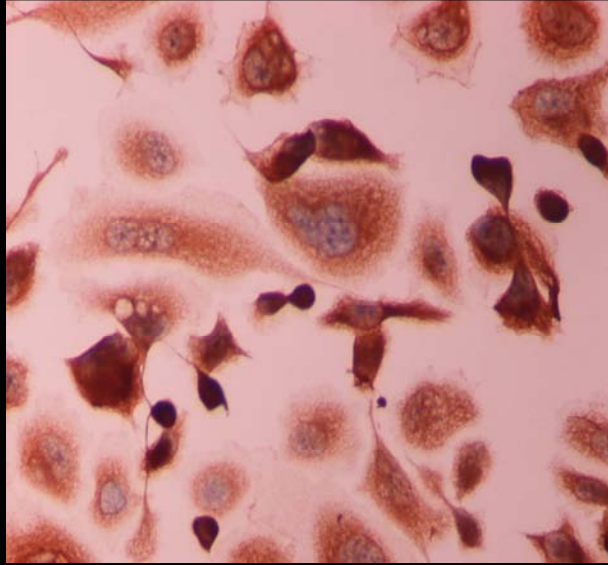
LnCaP: Bortezomib 1 μ M (90min)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x20)



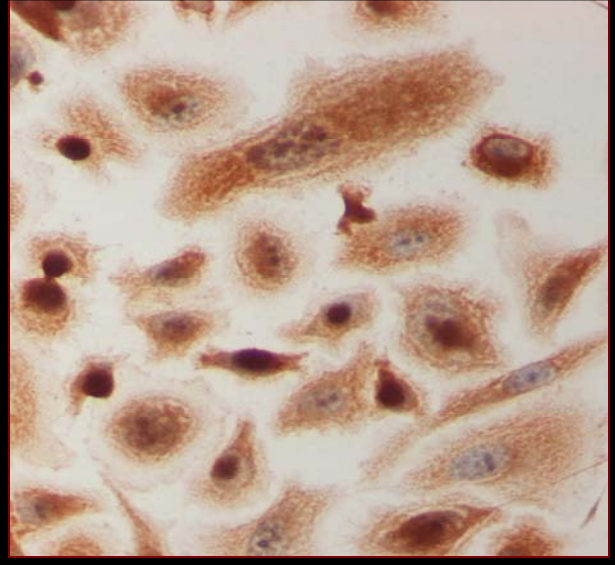
LnCaP: Wedelolactone 50 μ M (90min)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x10)



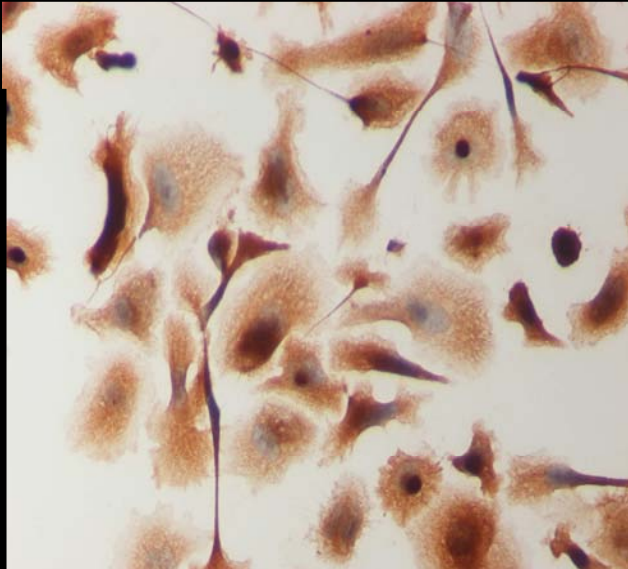
LnCaP: BAY-7082 20 μ M (16hrs)+ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x10)



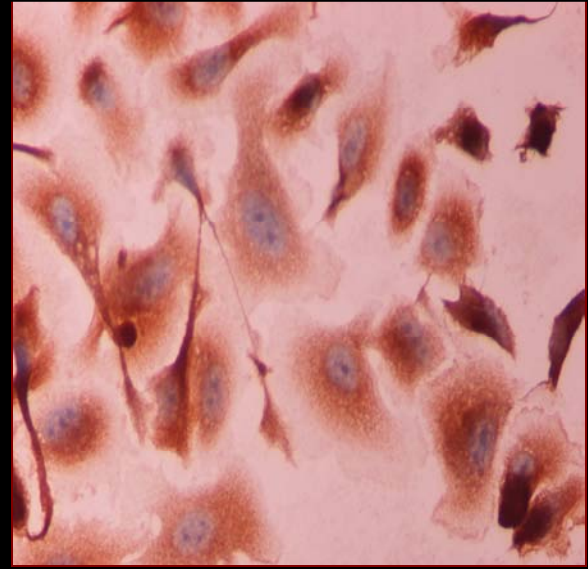
PC-3: BBS 100nM (30 min); NFκB staining (x40)



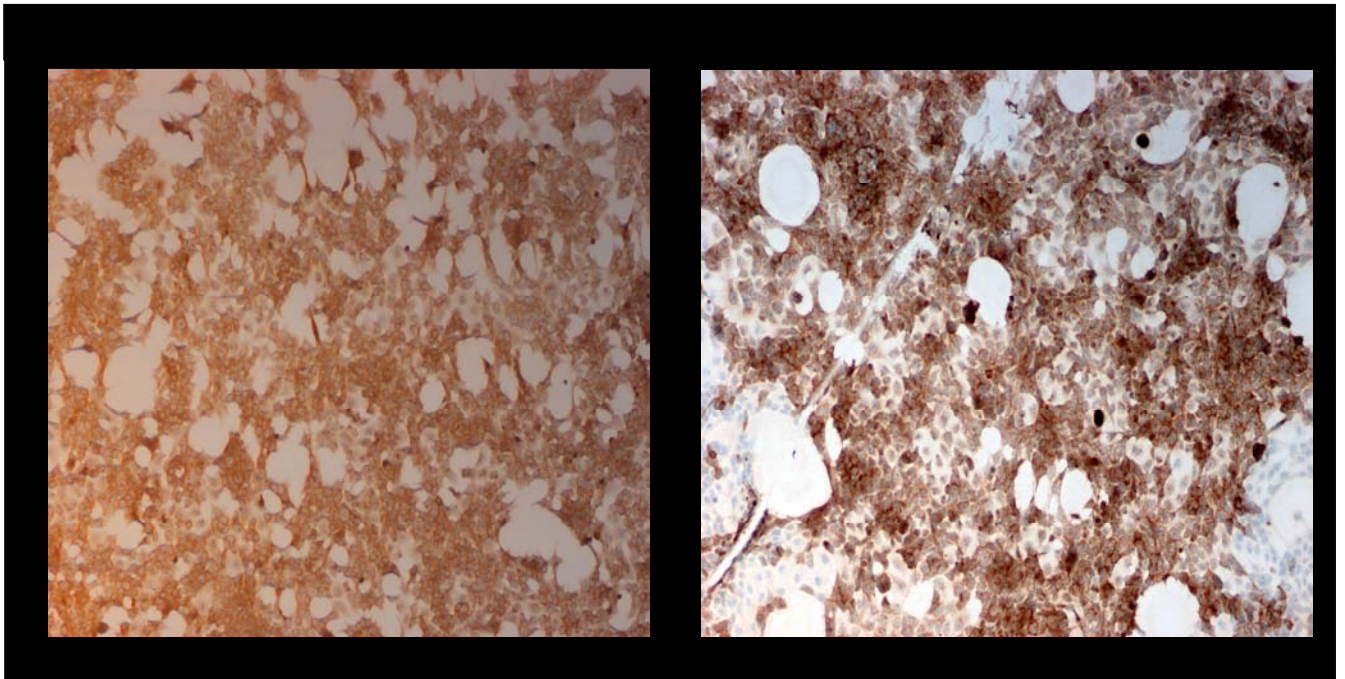
PC-3: BBS 100nM (45 min); NFκB staining (x40)



PC-3: BBS 100nM (60min); NFκB staining (x40)

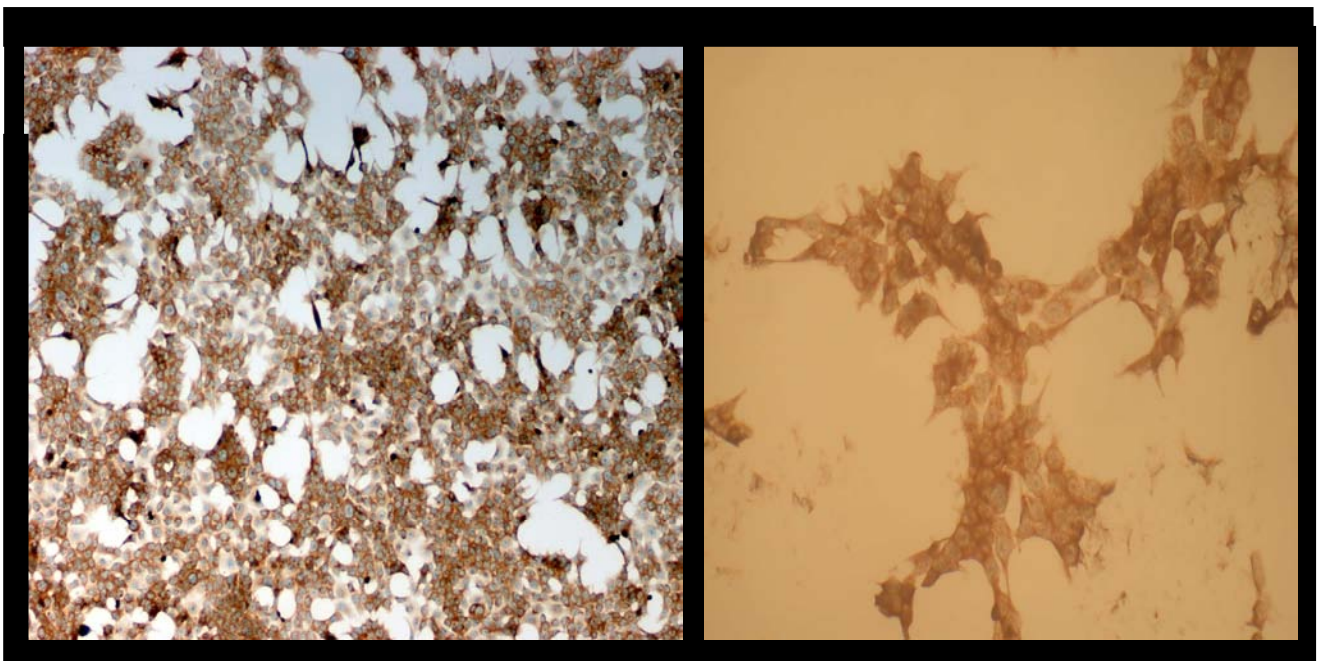


PC-3: RC-3095 10nM (30min)+BBS 100nM (60min); NFκB staining (x20)



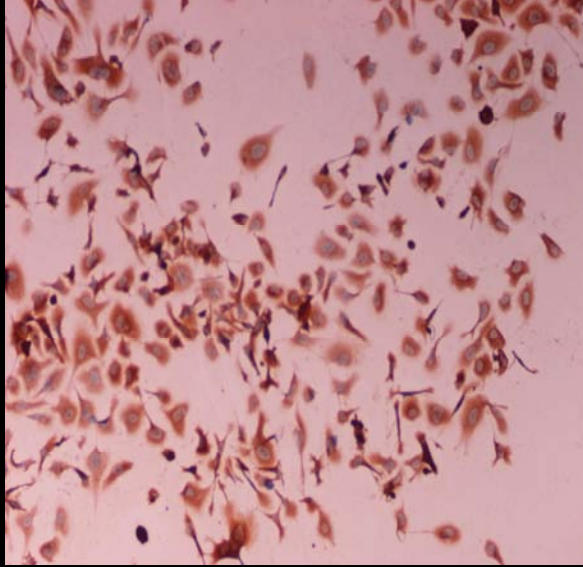
LnCaP: BBS 100nM (30 min); NF κ B staining (x10)

LnCaP: BBS 100nM (45 min); NF κ B staining (x10)

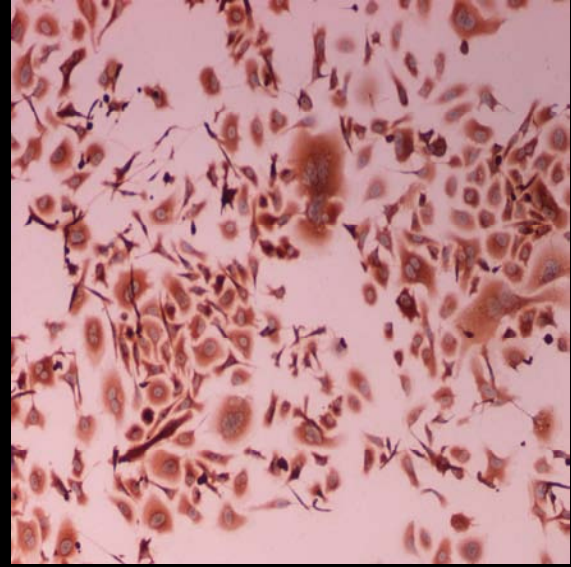


LnCaP: BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)

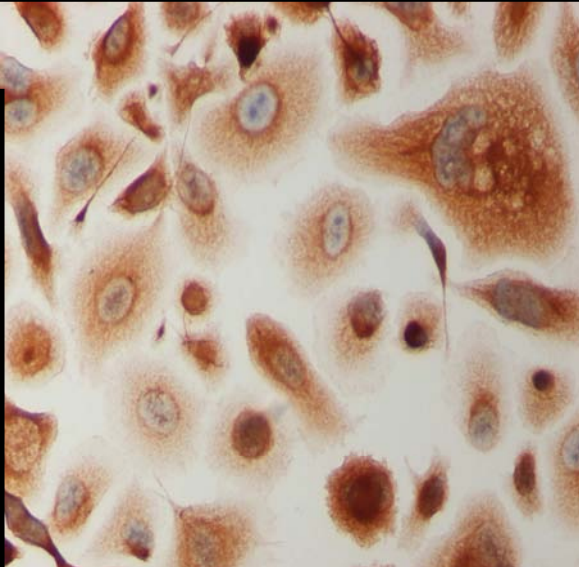
LnCaP: RC-3095 10nM (30min)+BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x20)



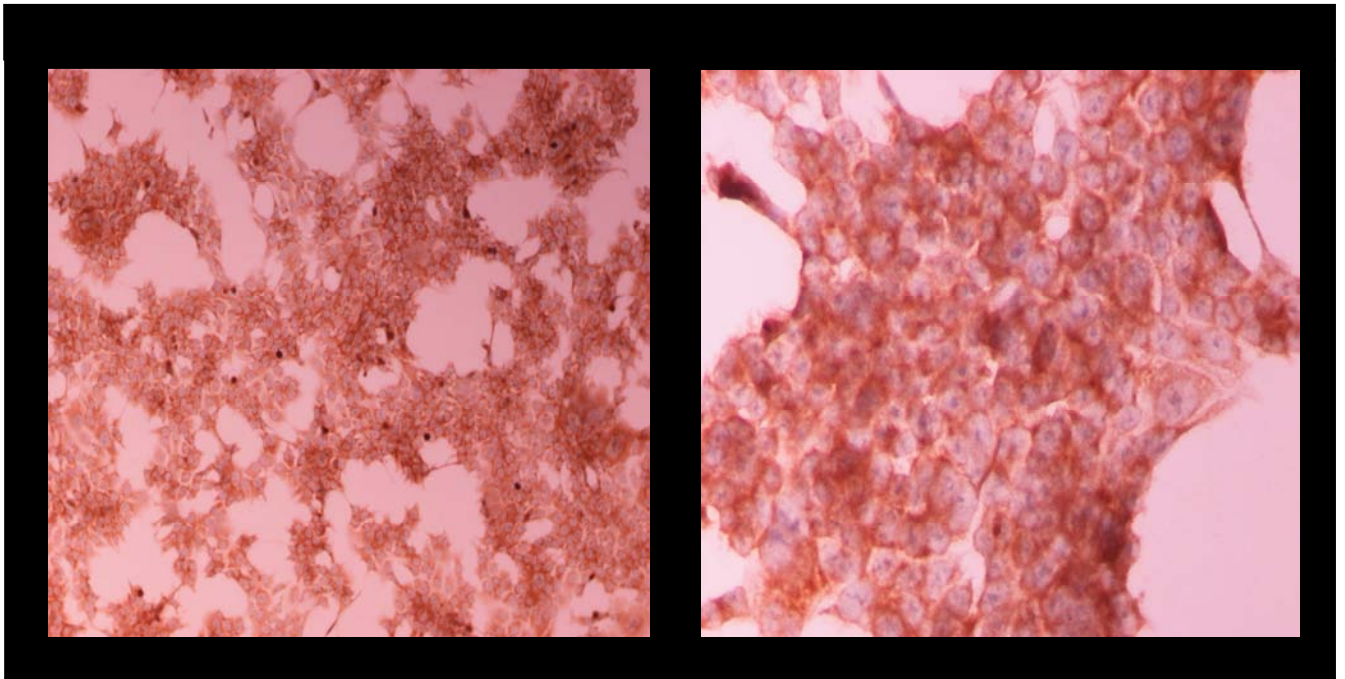
PC-3: Bortezomib 1 μ M (90min)+BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)



PC-3: Wedelolactone 50 μ M (90min)+ BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)



PC-3: BAY-7082 20 μ M (16hrs)+BBS 100nM (45min); NF κ B staining (x40)

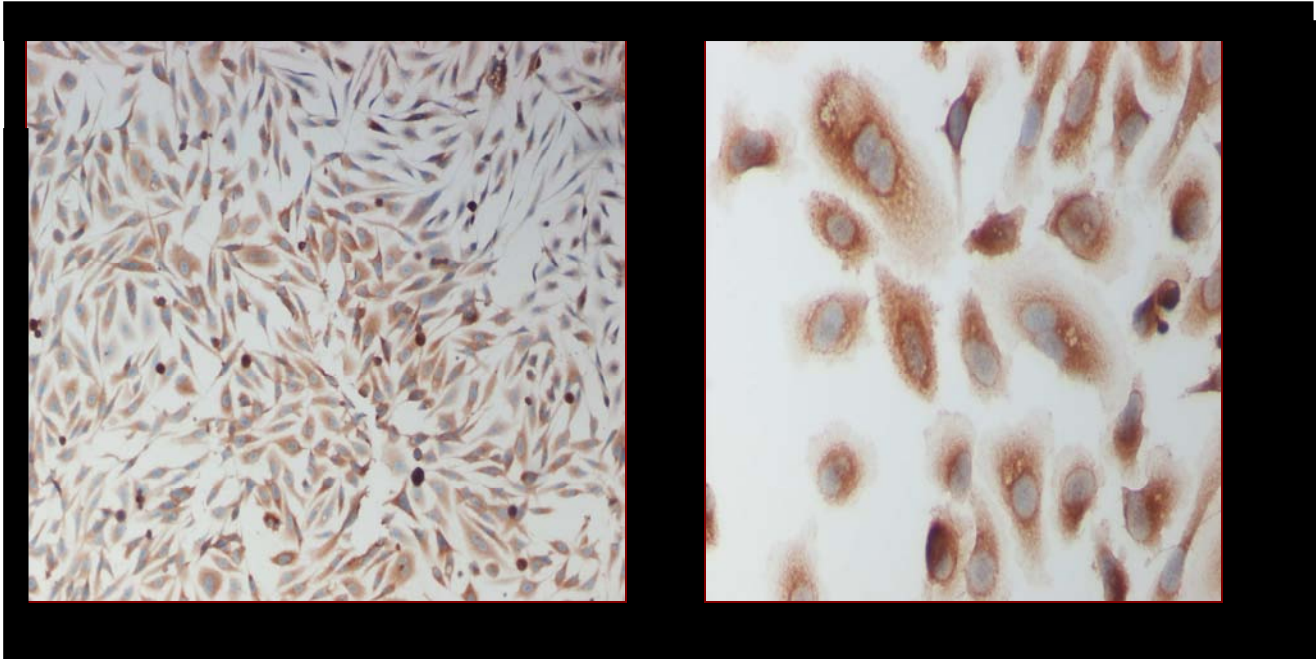


LnCaP: Bortezomib 1 μ M (90min)+BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)

PC-3: Wedelolactone 50 μ M (90min)+ BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)

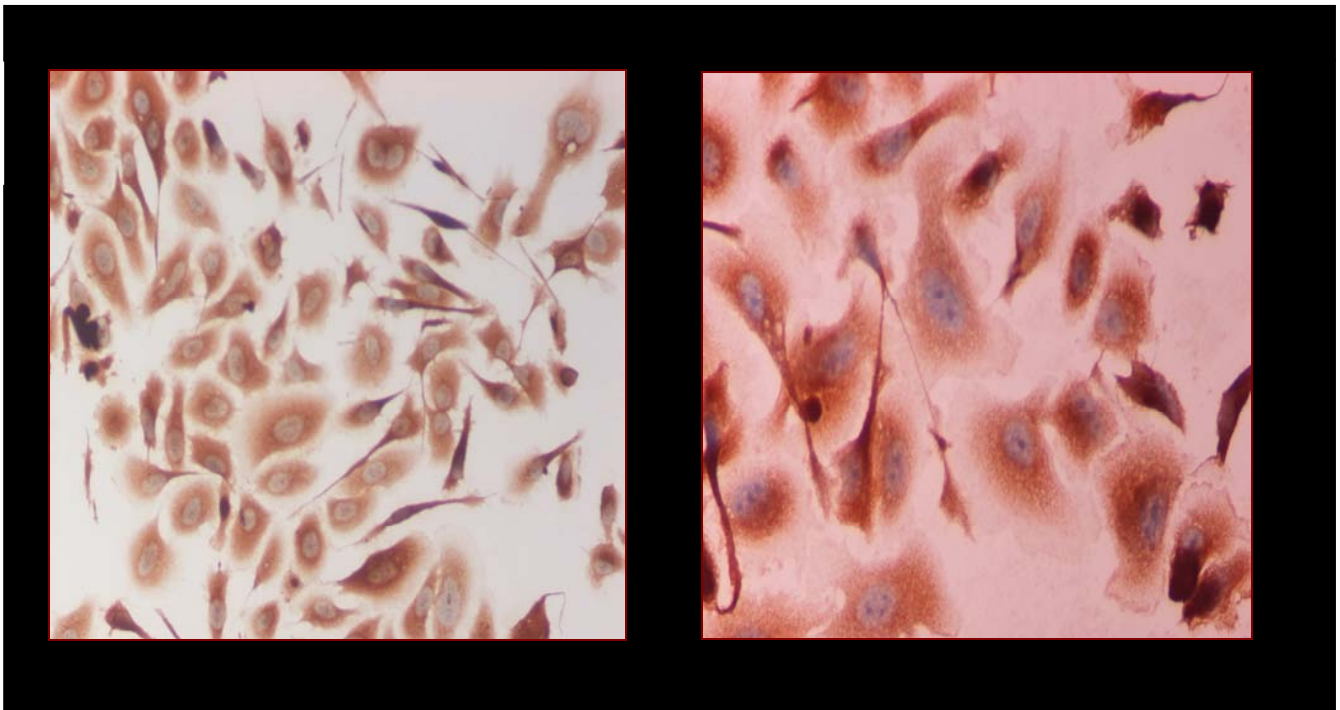


LnCaP: BAY-7082 20 μ M (16hrs)+BBS 100nM (45min); NF κ B staining (x10)



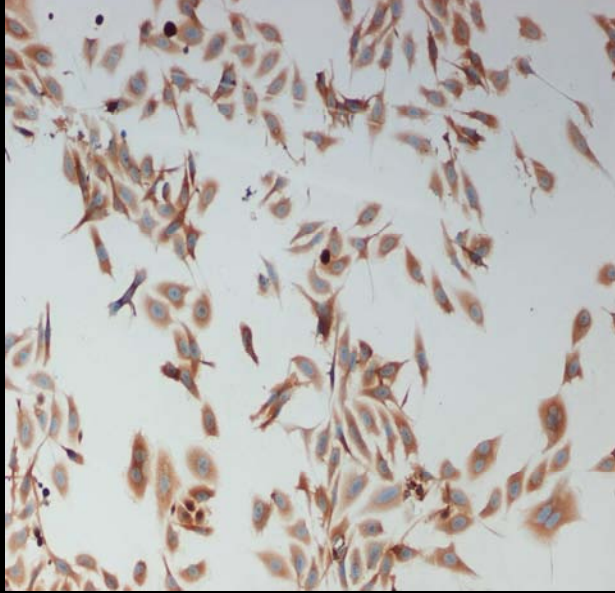
PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs); NF κ B staining (x10)

PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs); NF κ B staining (x40)

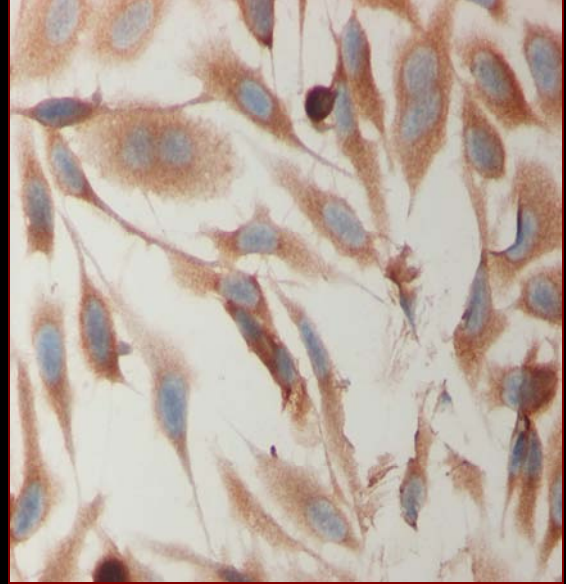


PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs) + ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x20)

PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs) + ET-1 100nM (45min); NF κ B staining (x40)



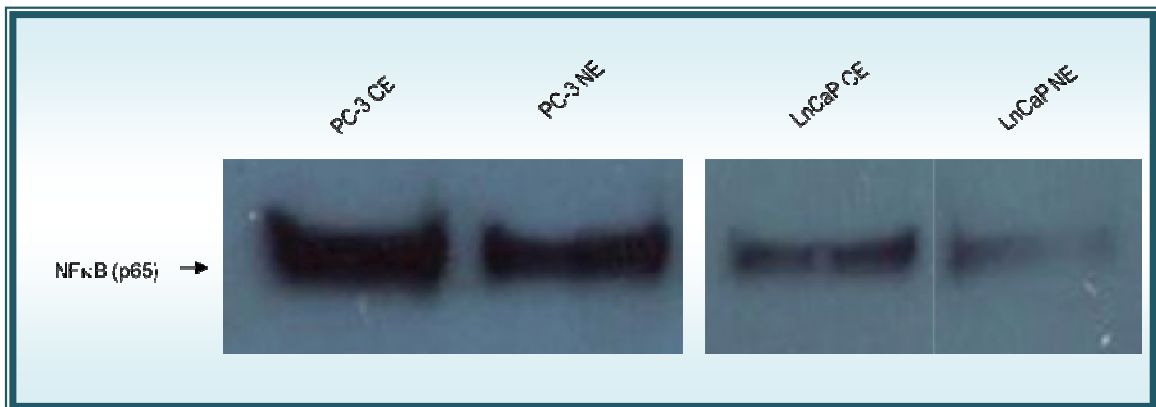
PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs) + BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x10)



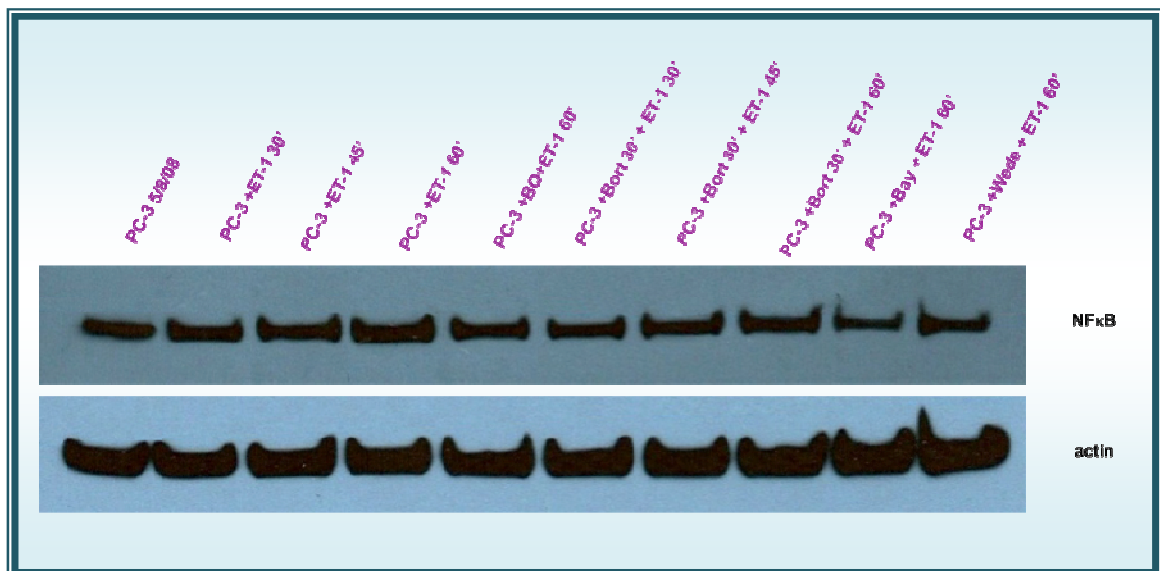
PC-3: rhNEP 50 μ g/ml (72hrs) + BBS 100nM (60min); NF κ B staining (x40)

Παράρτημα V

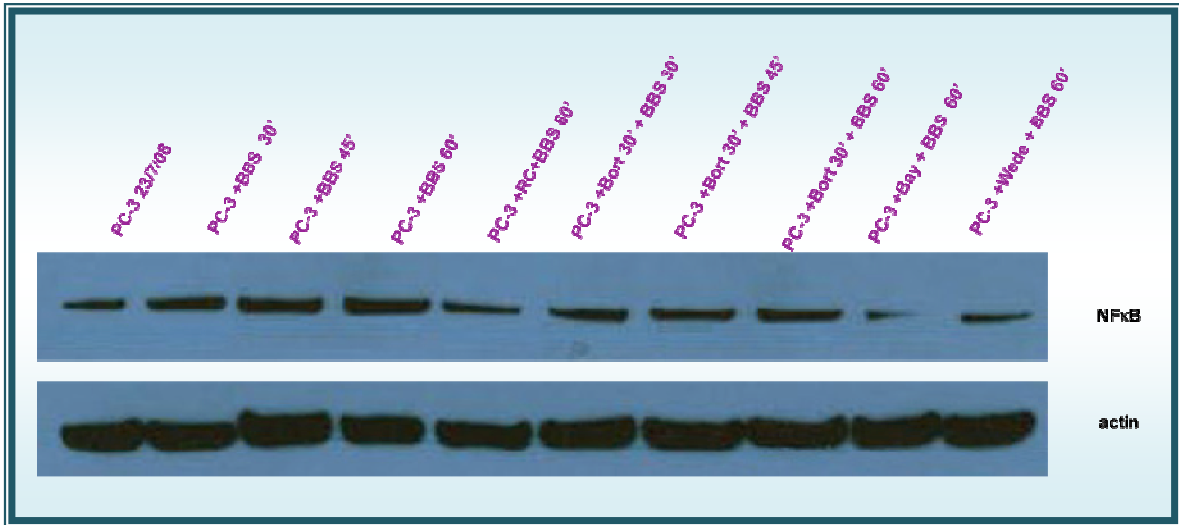
Πυρηνική NFκB πρωτεΐνη: Western blotting



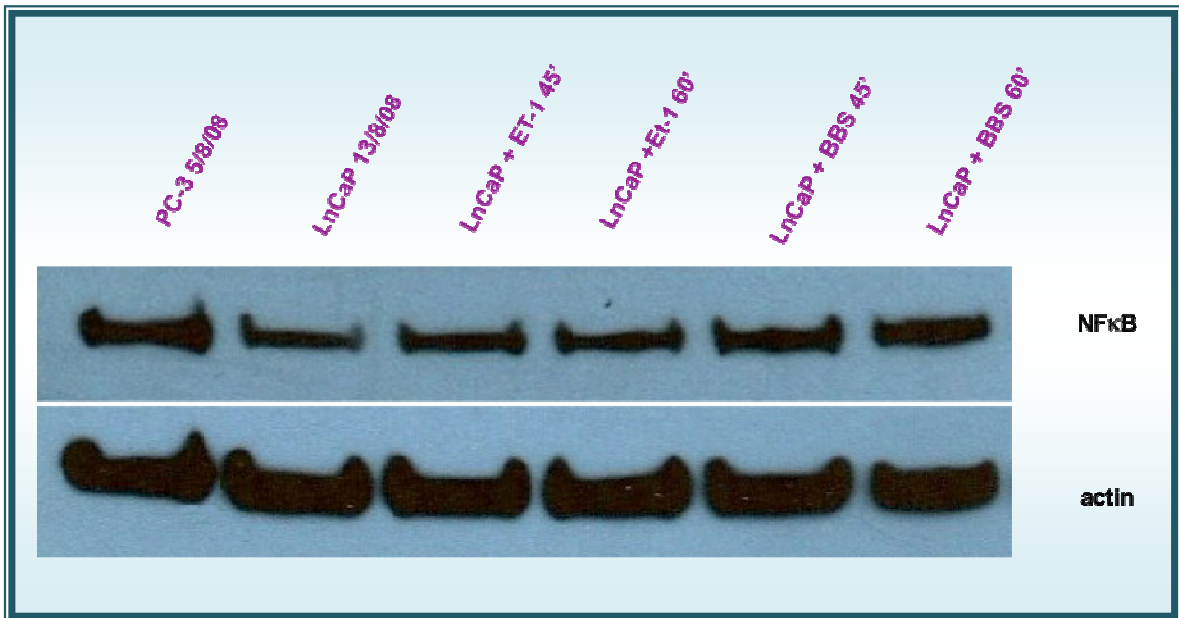
PC-3, LnCaP: baseline; NFκB NE/CE WB (anti-p65 mouse monoclonal 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



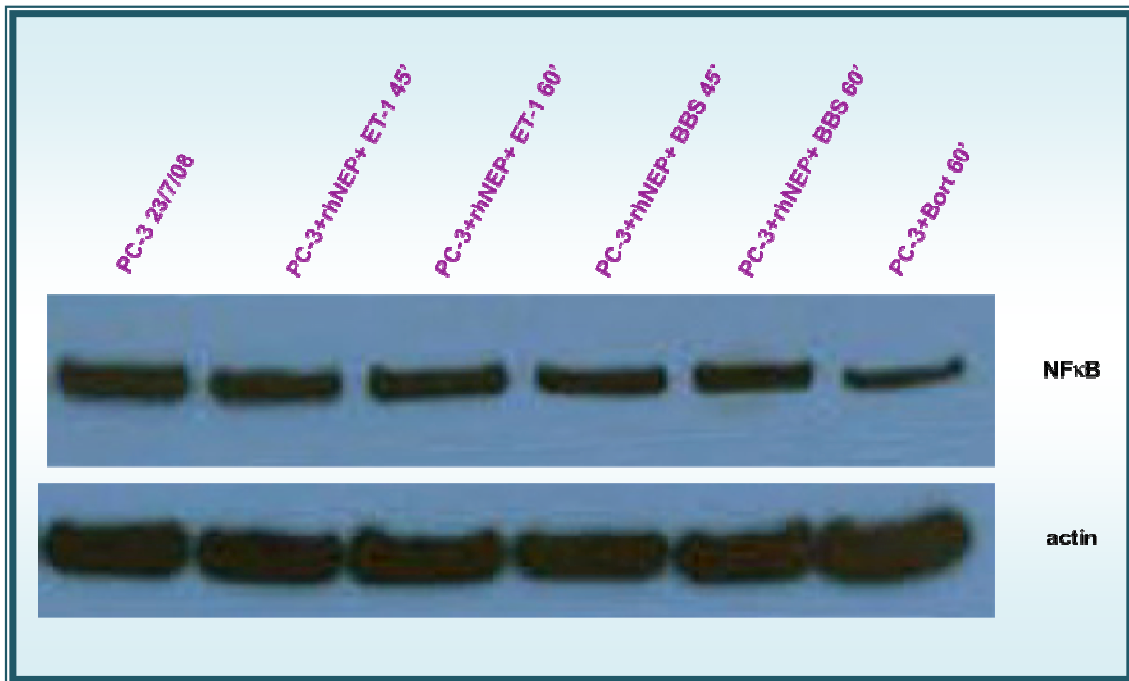
PC-3: ET-1-related incubations; NFκB NE WB (anti-p65 mouse monoclonal 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



PC-3: BBS-related incubations; NFκB NE WB (anti-p65 mouse monoclonal 1:500, Santa Cruz Biotechnoloav)



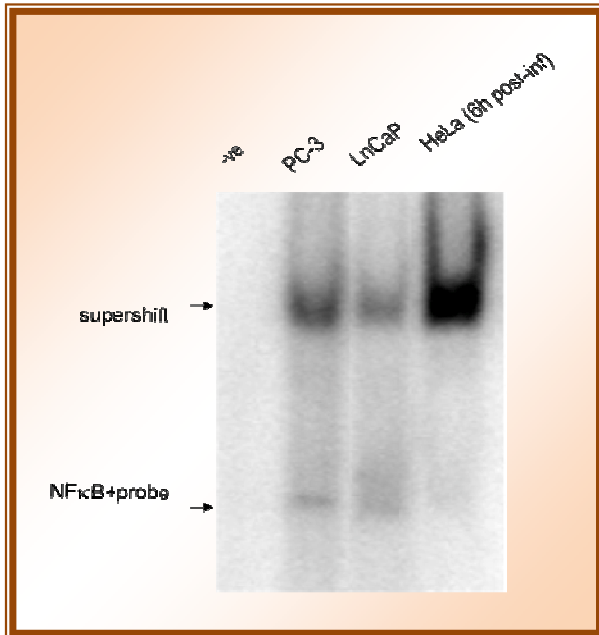
LnCaP: NP-related incubations; NFκB NE WB (anti-p65 mouse monoclonal 1:500, Santa Cruz Biotechnoloav)



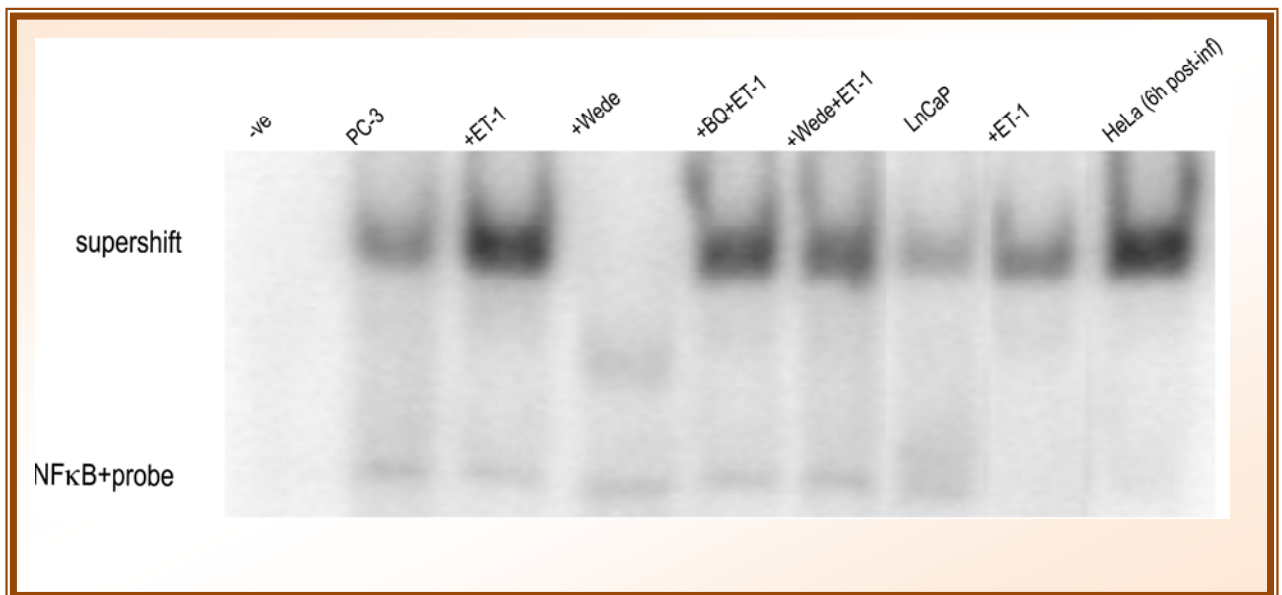
PC-3: rhNEP-related incubations; NFκB NE WB (anti-p65 mouse monoclonal 1:500, Santa Cruz Biotechnology)

Παράρτημα VI

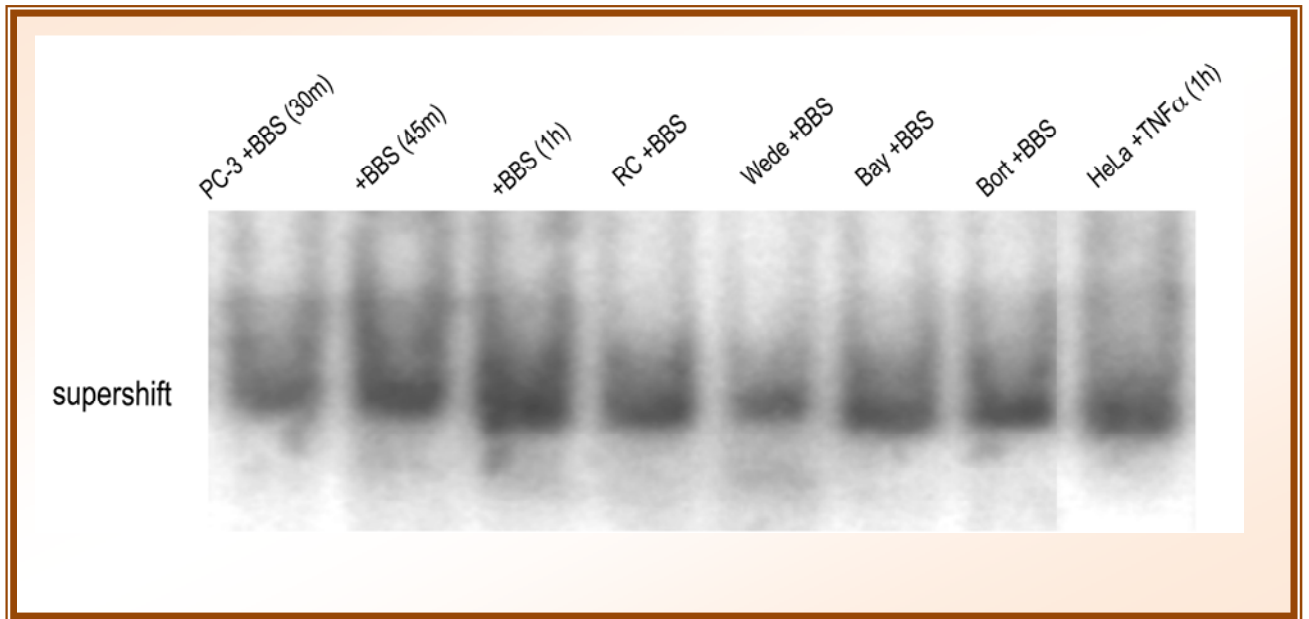
Σύνδεση $NF\kappa B$ -DNA: EMSA



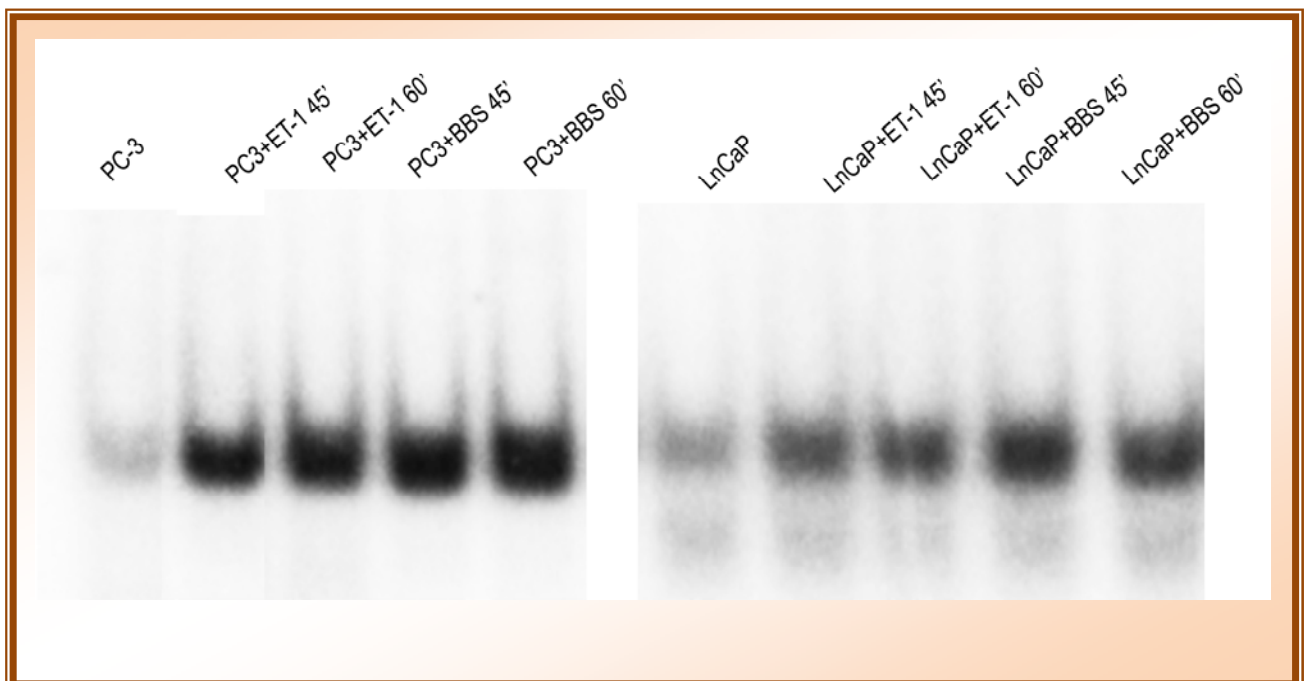
PC-3, LnCaP: baseline; $NF\kappa B$ EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)



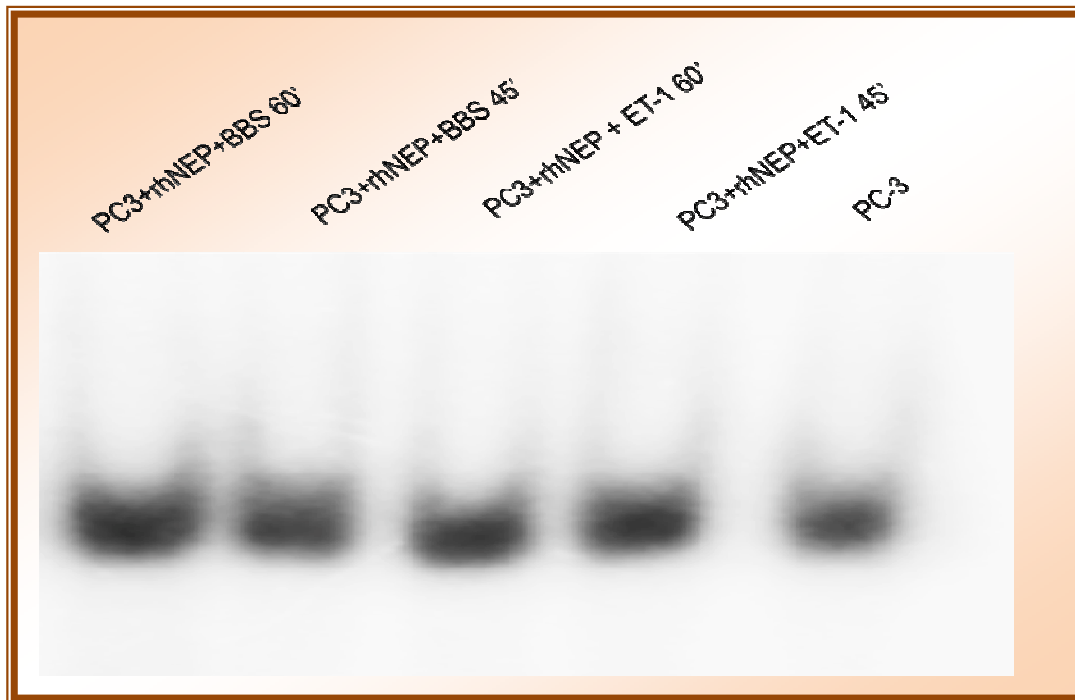
PC-3, LnCaP: ET-1 related incubations; $NF\kappa B$ EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)



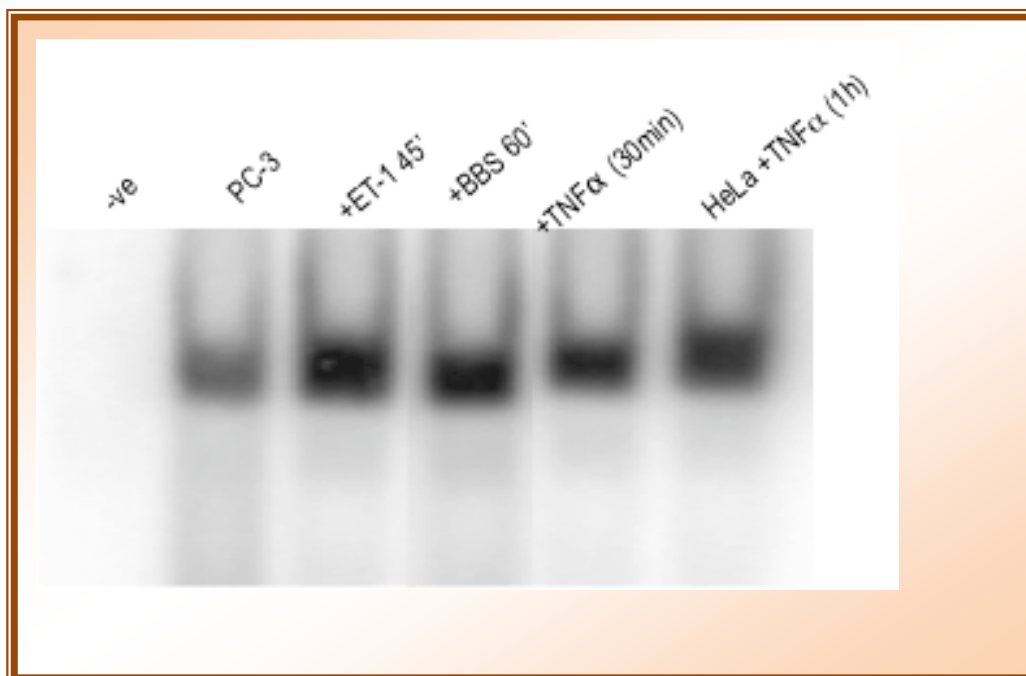
PC-3: BBS-related incubations; NF κ B EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)



PC-3, LnCaP: ET-1 and BBS-related incubations; NF κ B EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)



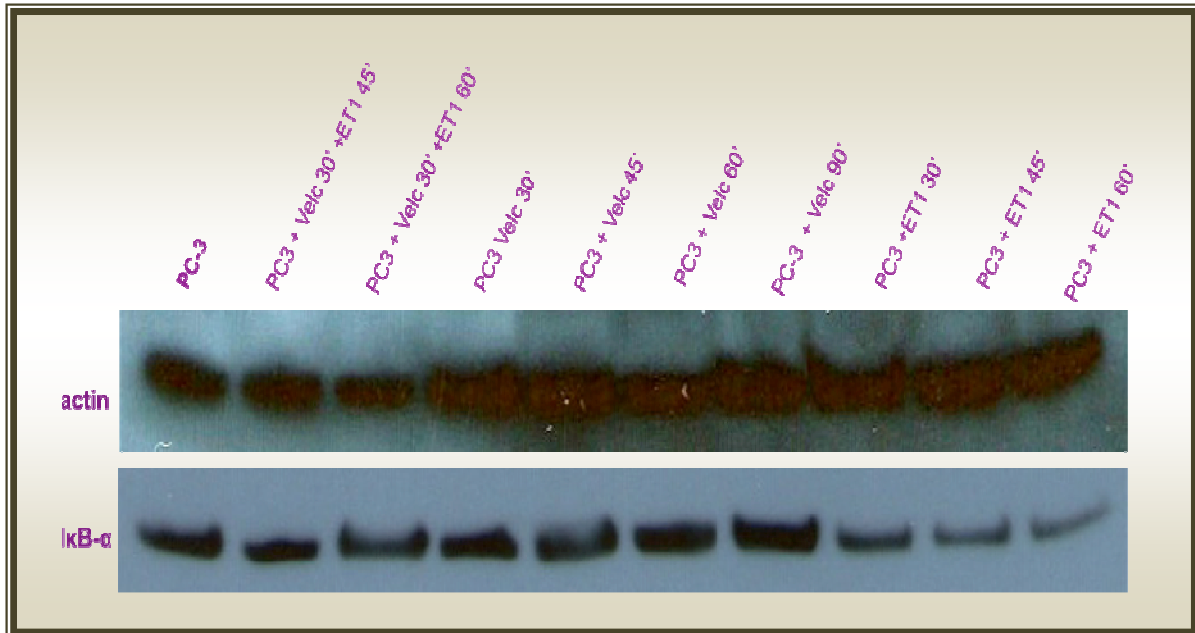
PC-3: rhNEP-related incubations; NFκB EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)



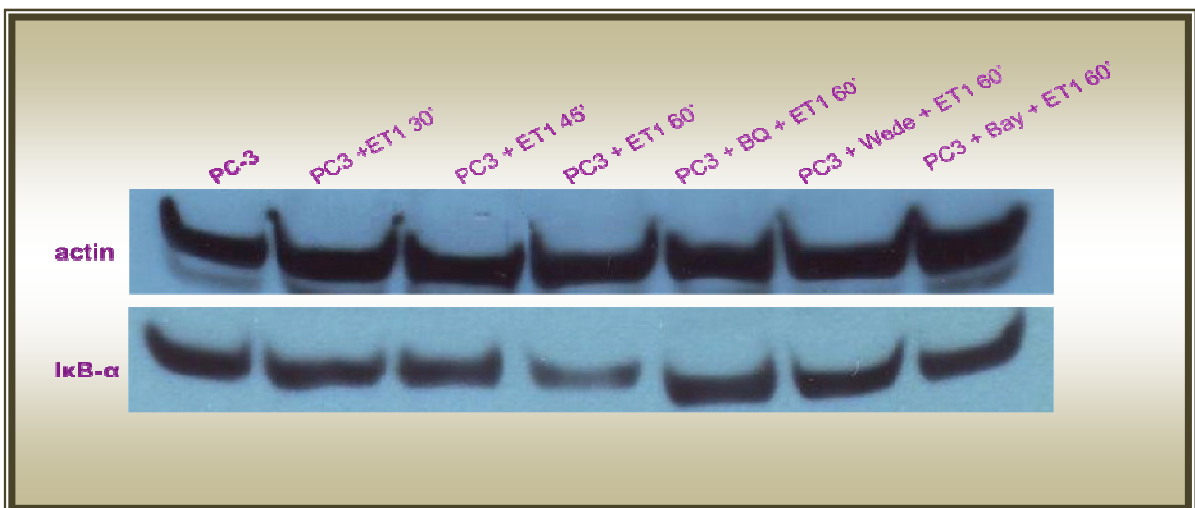
PC-3: NP-related incubations; NFκB EMSA (anti-p65 mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)

Παράρτημα VII

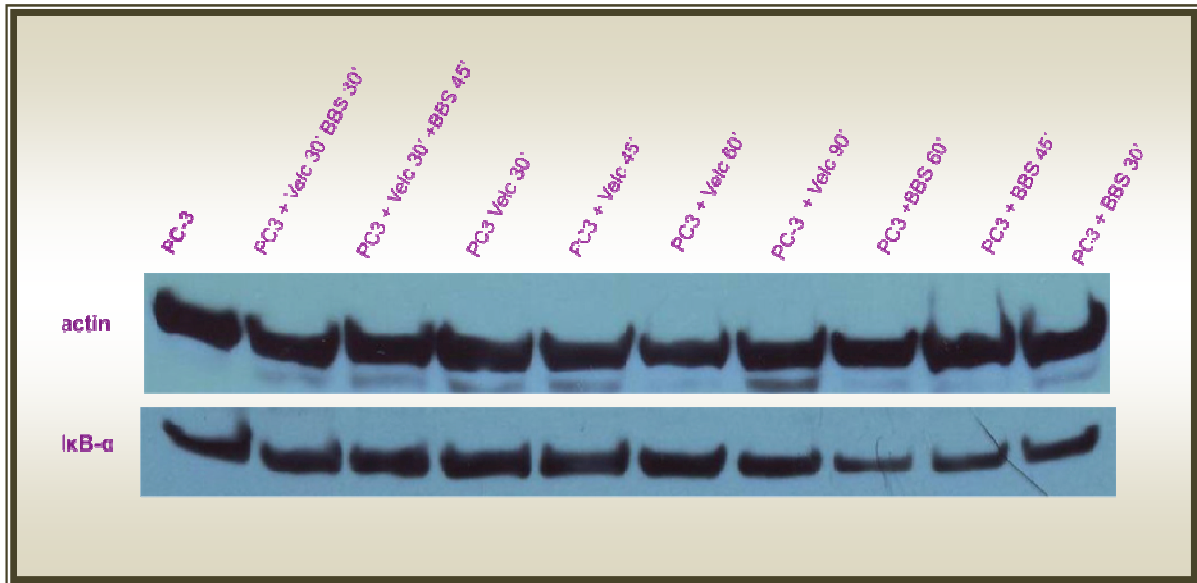
Ολική κυτταρική πρωτεΐνη IκB-α: Western blotting



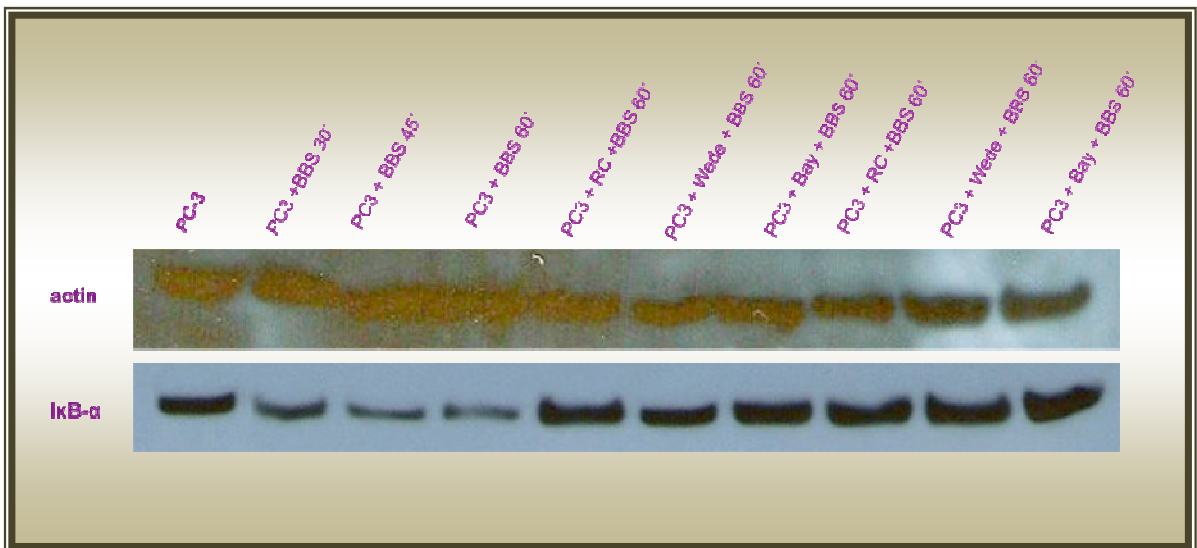
PC-3: ET-1 & Bortezomib-related incubations; IκBα WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



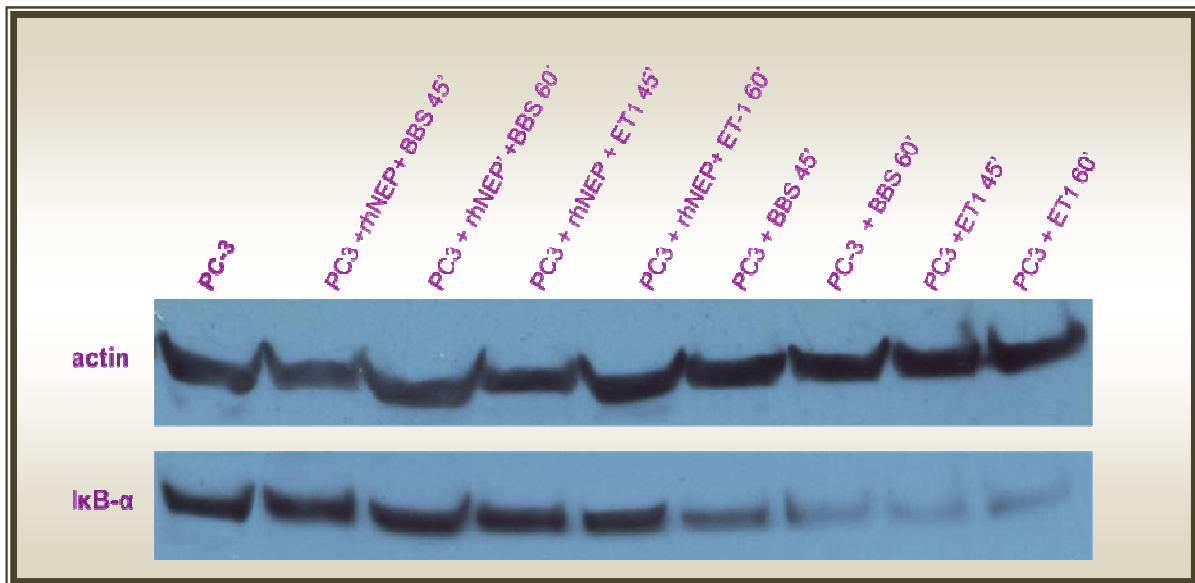
PC-3: ET-1 -related incubations; IκBα WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



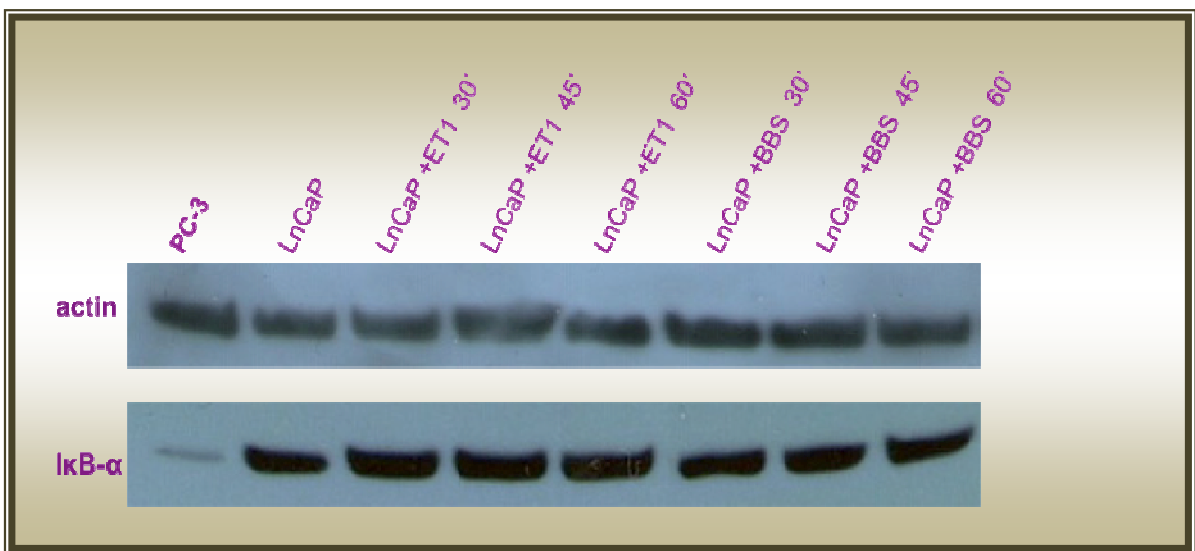
PC-3: BBS & Bortezomib-related incubations; IκBα WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



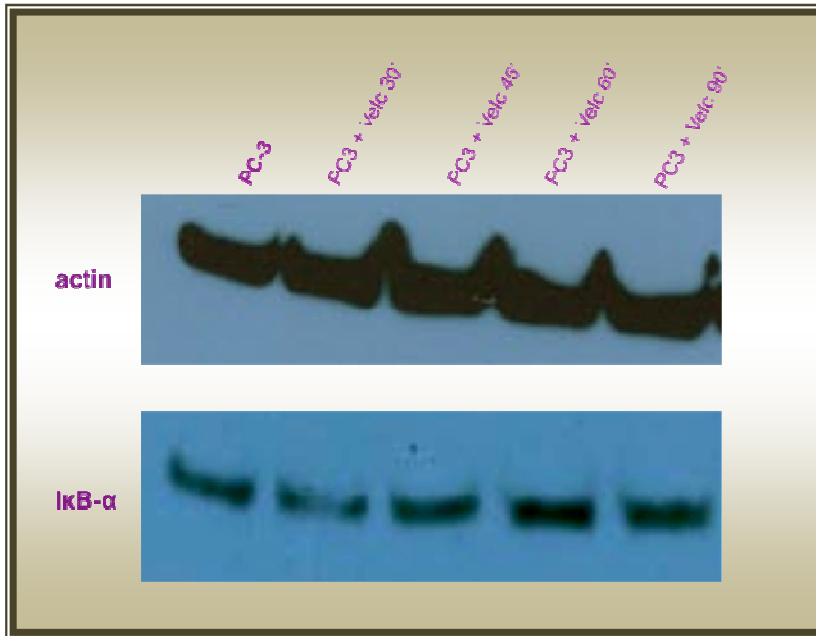
PC-3: BBS-related incubations; IκBα WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



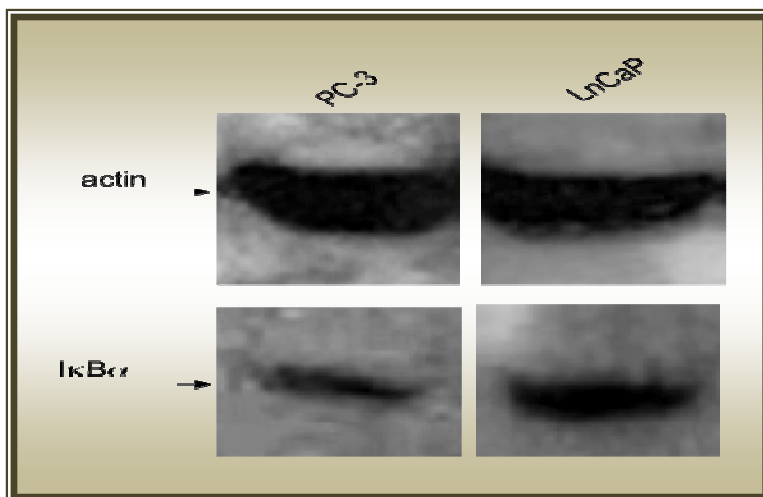
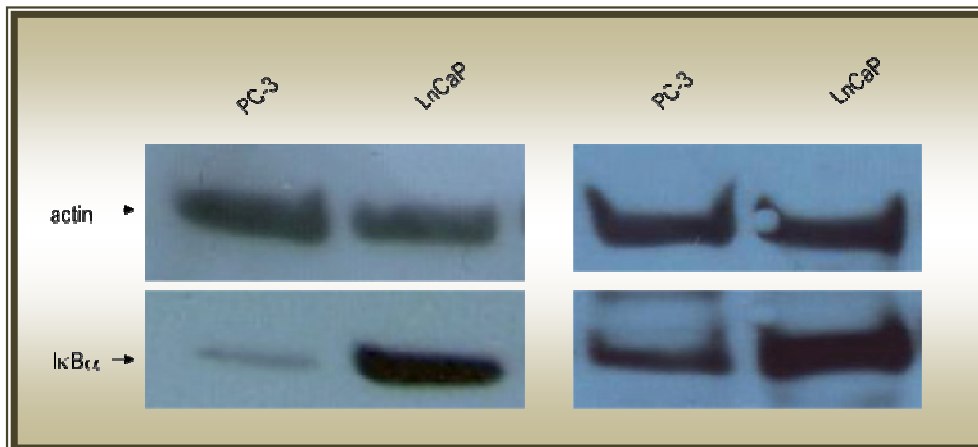
PC-3: rhNEP-related incubations; IκB α WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



LnCaP: NP-related incubations; IκB α WB (goat polyclonal, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)



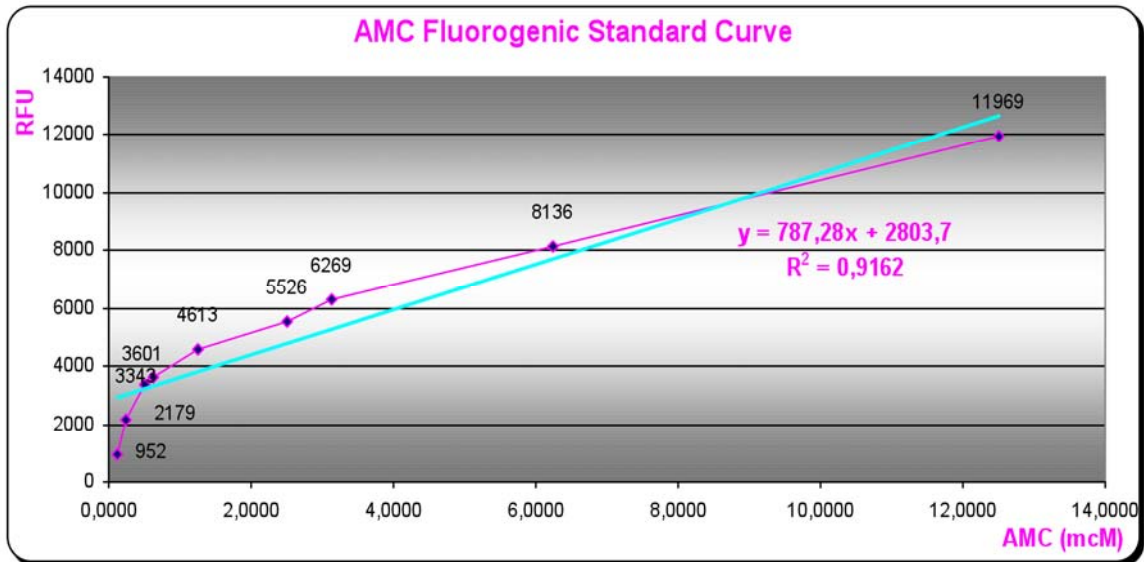
PC-3: Bortezomib-related incubations;
IκBα WB (goat polyclonal, 1:250, Santa Cruz Biotechnology)



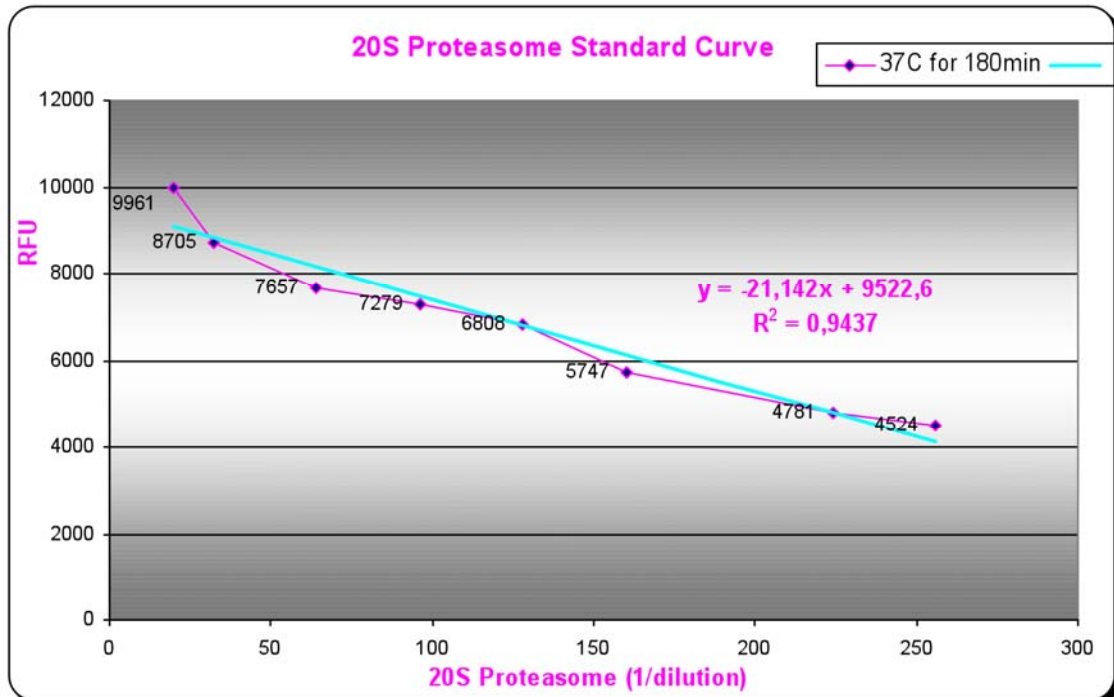
PC-3, LnCaP: baseline; IκBα WB (goat polyclonal, 1:250, Santa Cruz Biotechnology)

Παράρτημα VIII

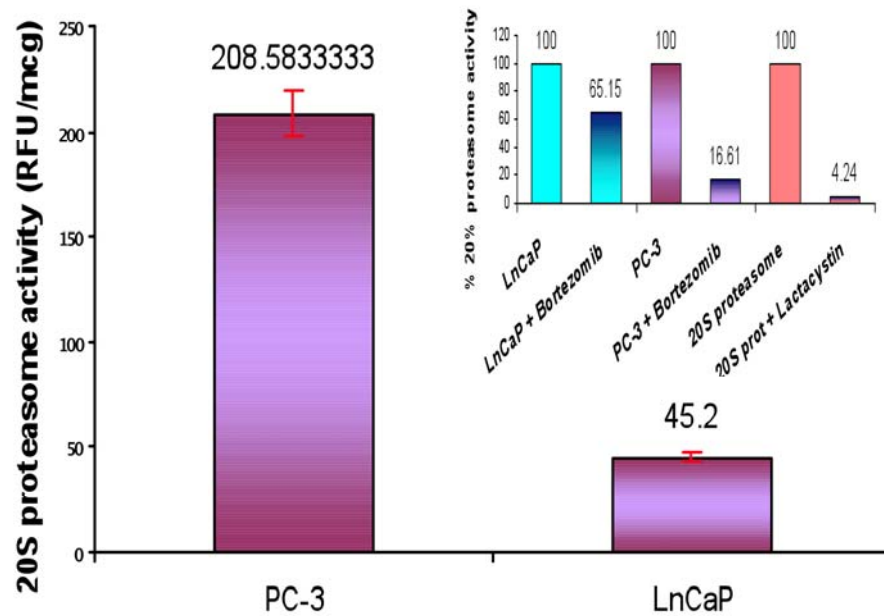
Μέτρηση Δραστηριότητας 20S Πρωτεασωματος



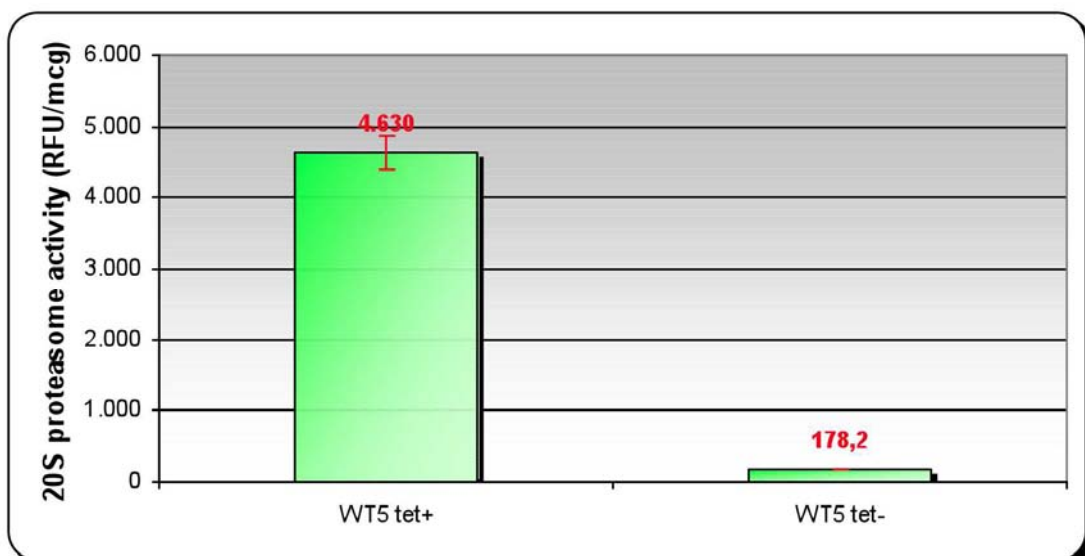
LLVY-AMC Standard curve; 20S proteasome fluorogenic assay



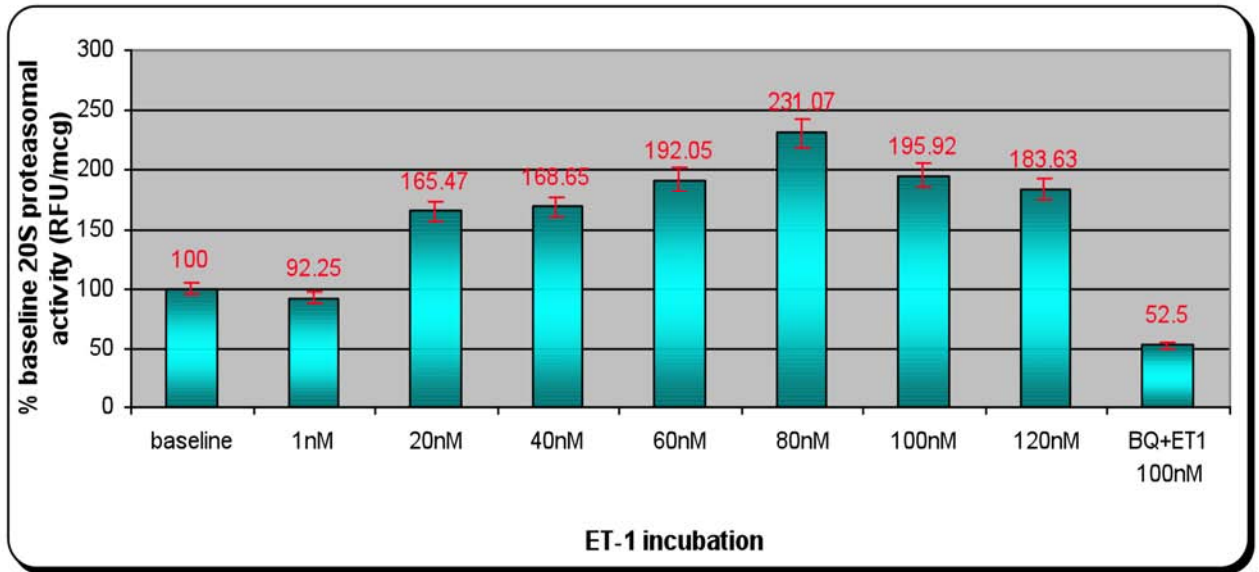
20S proctasome Standard curve; 20S proteasome fluorogenic assay



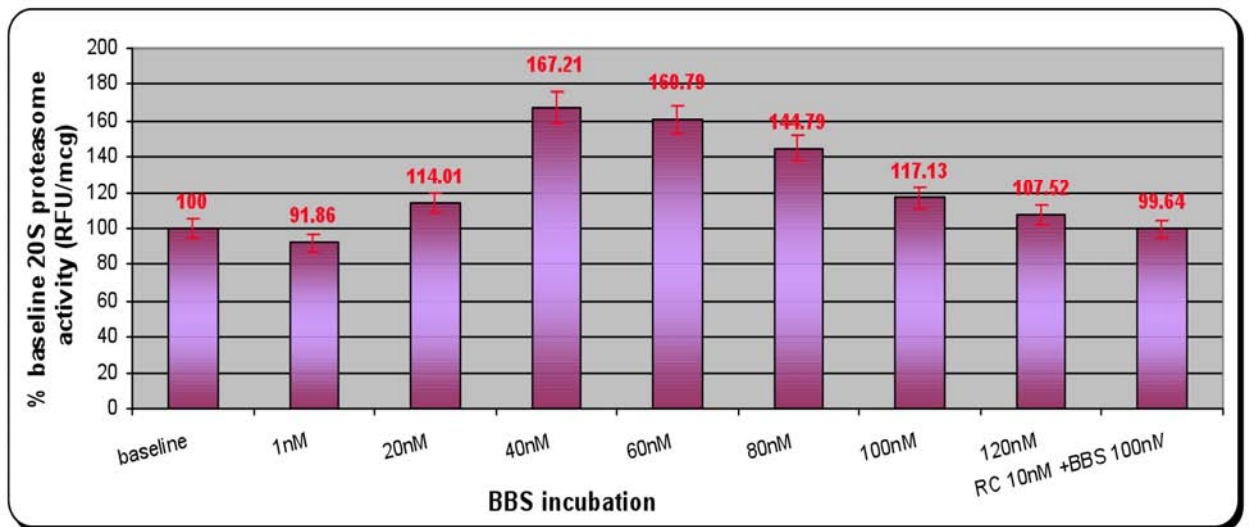
PC-3, LnCaP: baseline; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



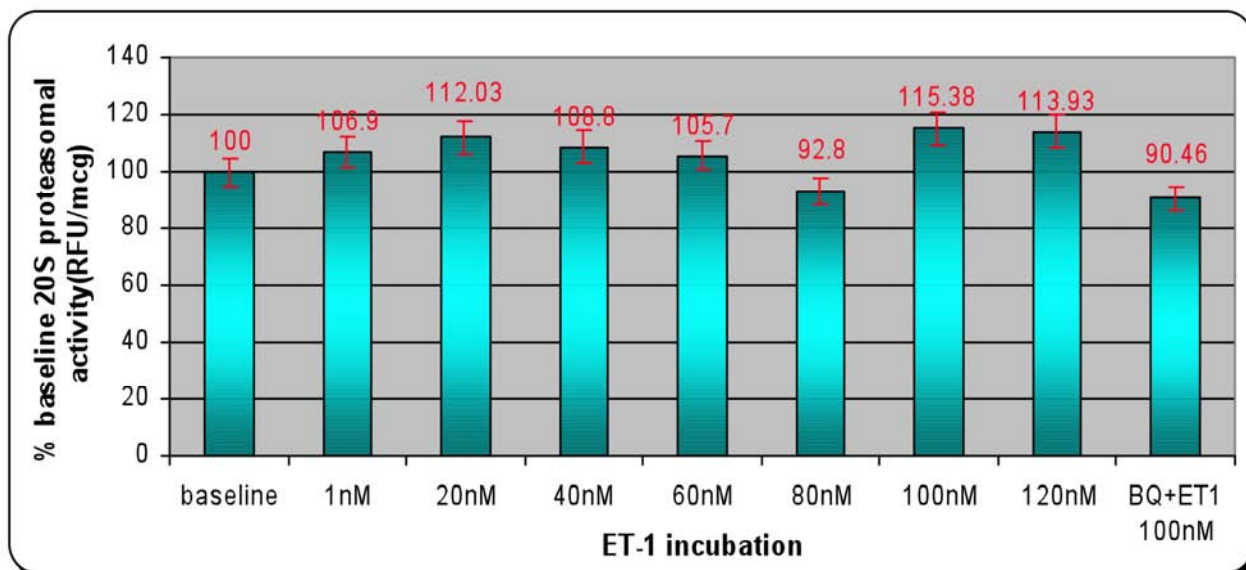
WT-5, tet+ (left), tet-48hrs (right); 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



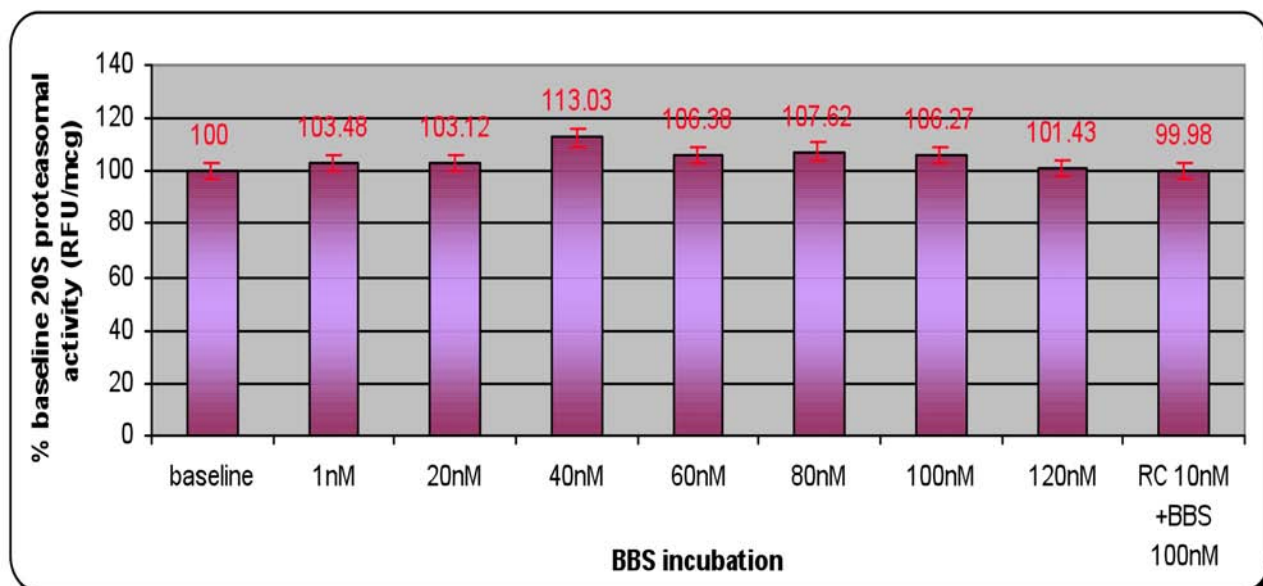
PC-3: ET-1 incubations_Concentration series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



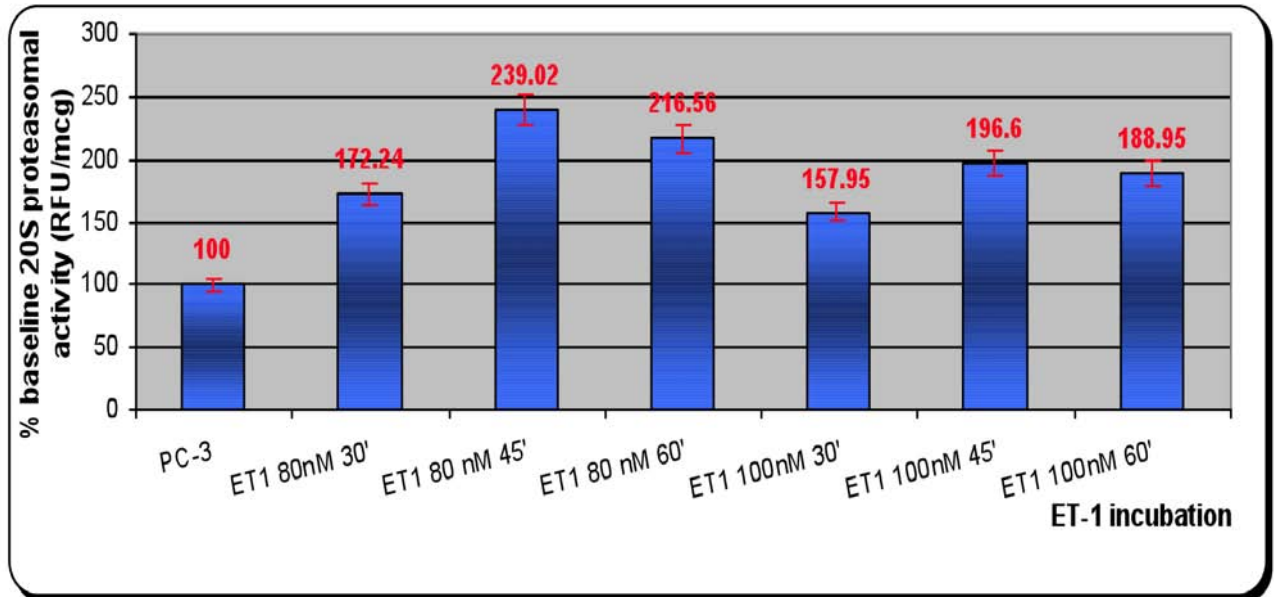
PC-3: BBS incubations_Concentration series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



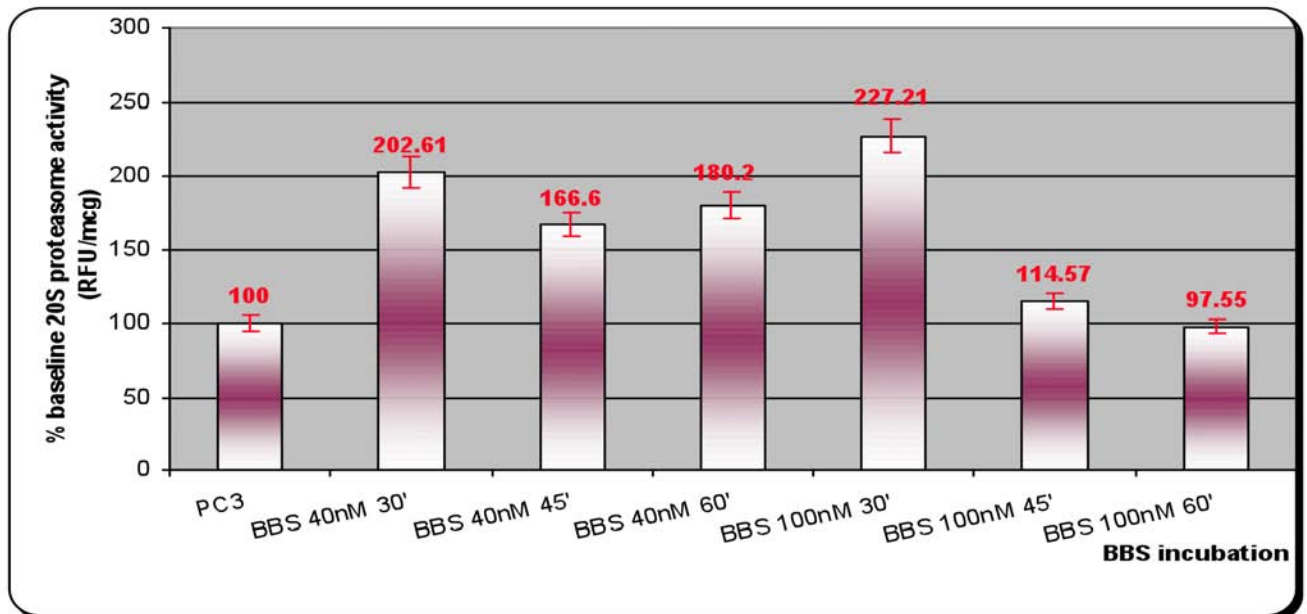
LnCaP: ET-1 incubations_Concentration series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



LnCaP: BBS incubations_Concentration series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



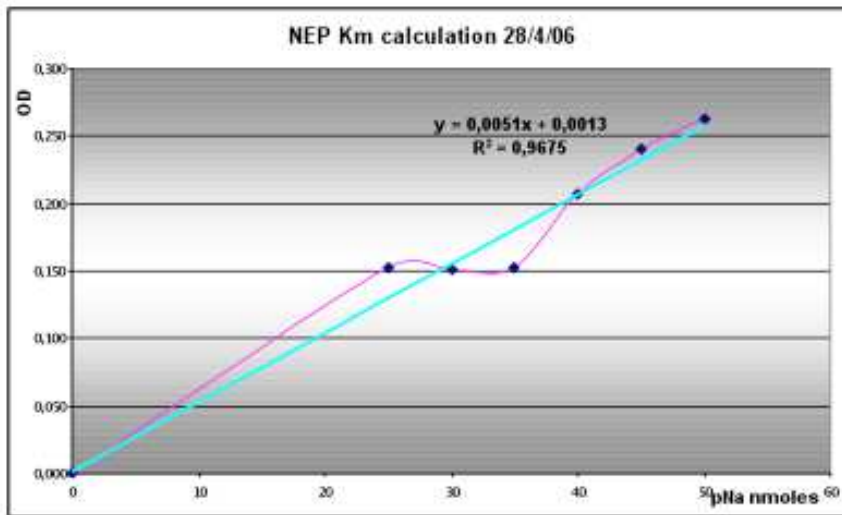
PC-3: ET-1 incubations_Time series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay



PC-3: ET-1 incubations_Time series; 20S Proteasomal activity fluorogenic assay

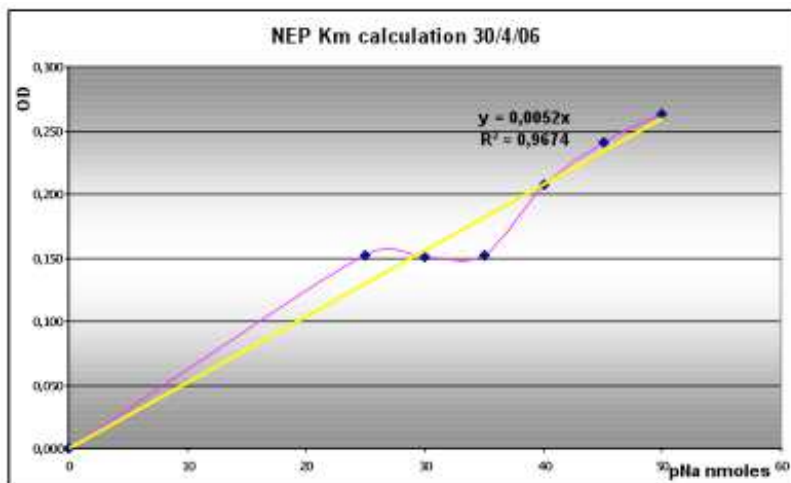
Παράρτημα ΙΧ

Μέτρηση Ενζυματικής Δραστηριότητας NEP



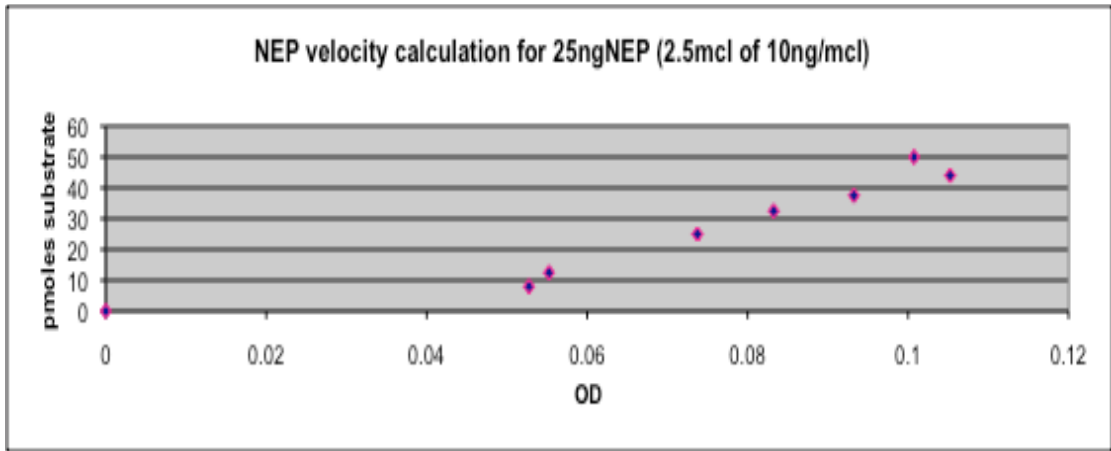
Vmax: 0.248
Km: 24.05

LnCaP: NEP Km calculation; NEP activity- colorimetric assay

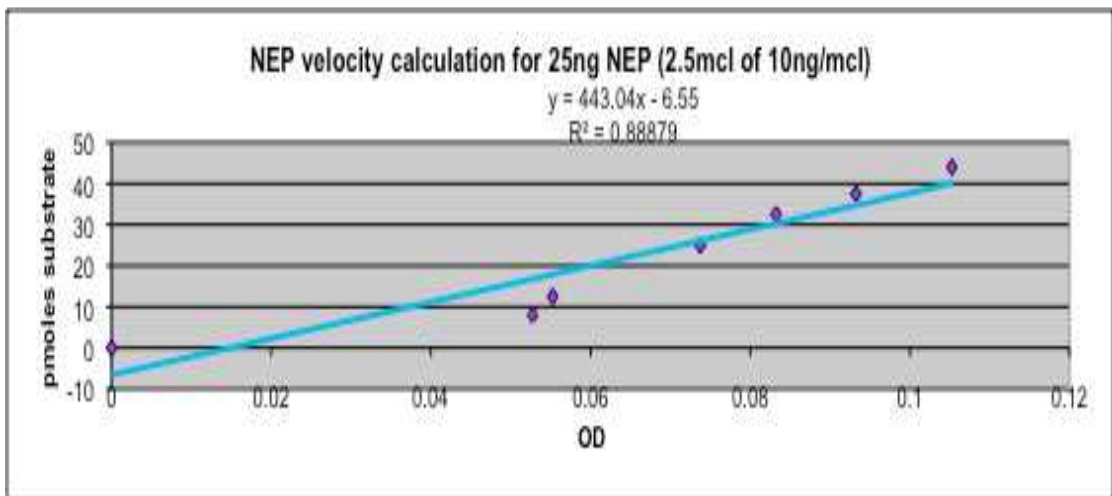


Vmax: 0.263
Km: 25.28

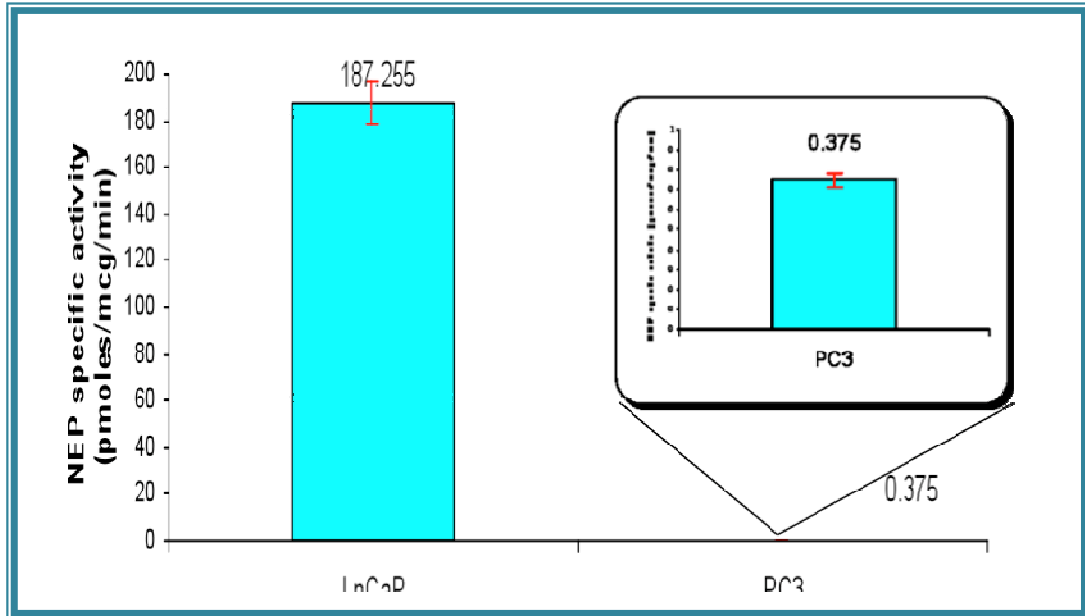
LnCaP: NEP Km calculation; NEP activity- colorimetric assay



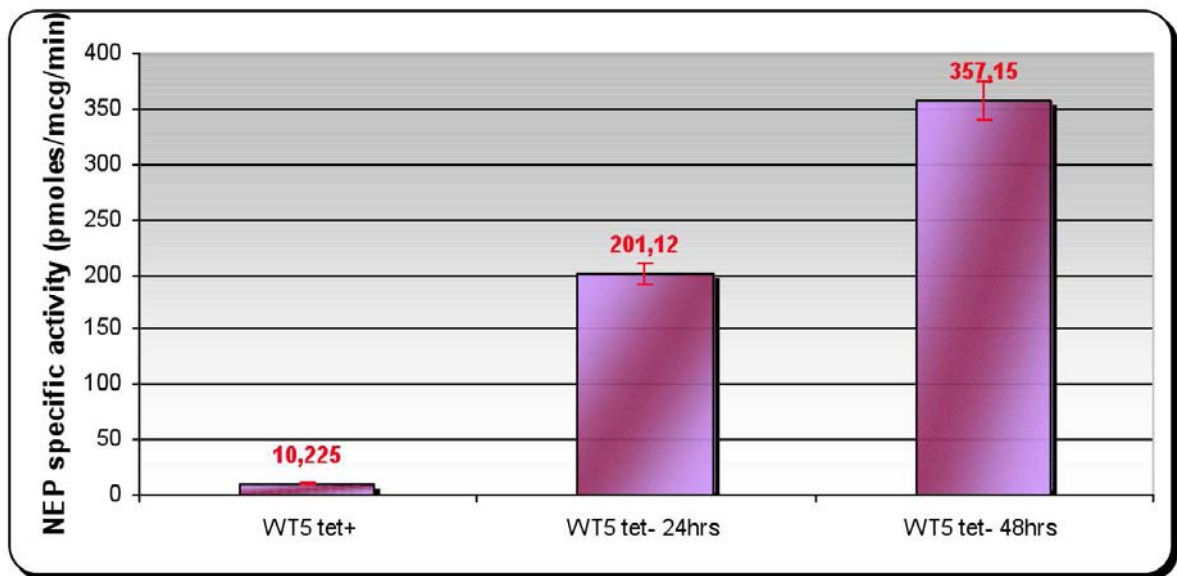
rhNEP enzymatic velocity standard curve; NEP activity- colorimetric assay



rhNEP enzymatic velocity standard curve; NEP activity- colorimetric assay



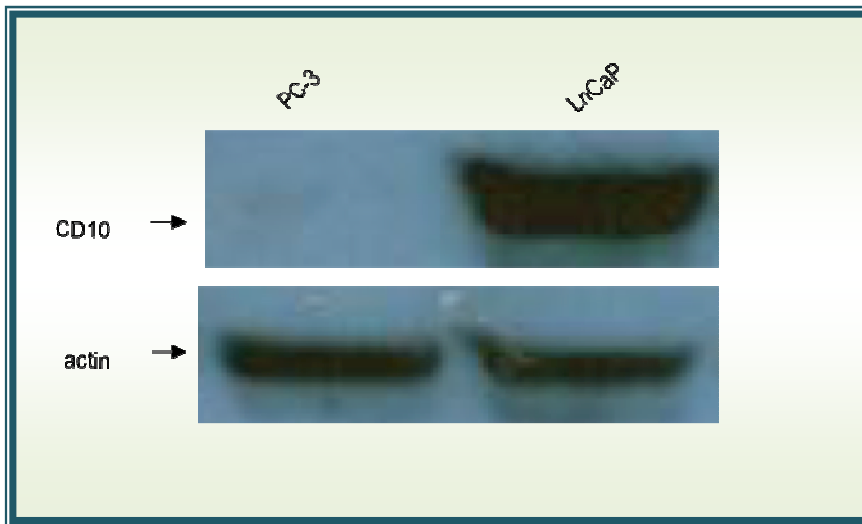
PC-3, LnCaP: baseline; NEP activity, colorimetric assay



WT-5: tet+ (left), tet- 24hrs (middle), tet- 48hrs (right); NEP activity, colorimetric assay

Παράρτημα Χ

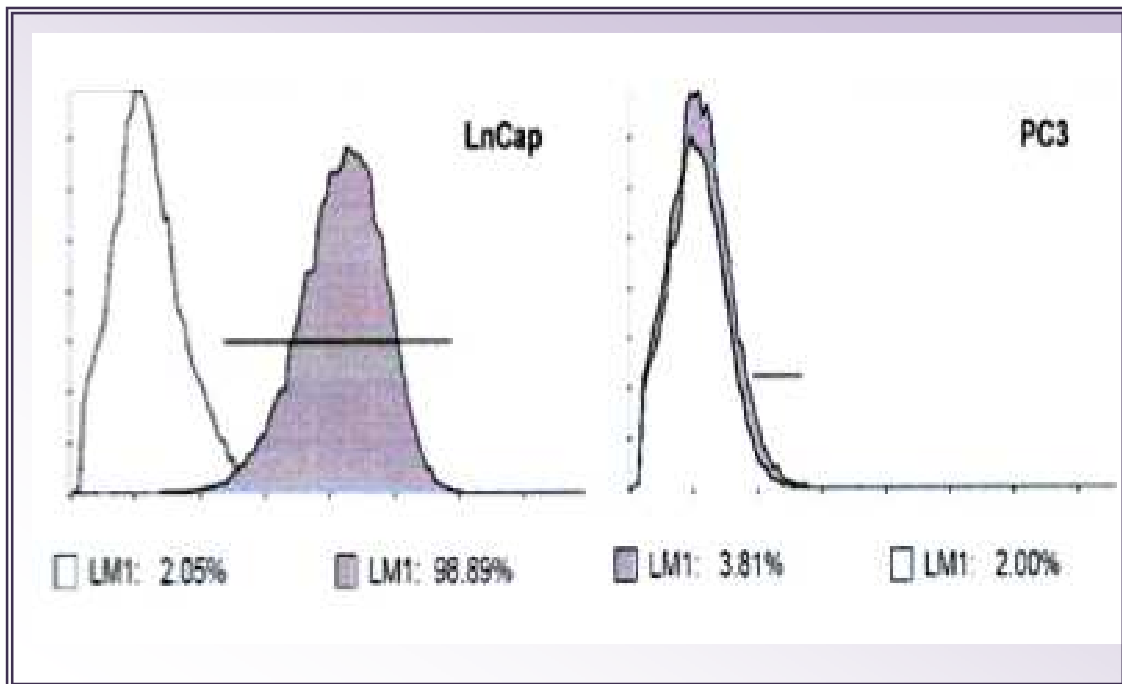
Μεμβρανική CD10 (NEP) πρωτεΐνη: Western blotting



PC-3, LnCaP: baseline; NEP WB (anti-CD10 mouse monoclonal 1:1000, Novocastra)

Παράρτημα XI

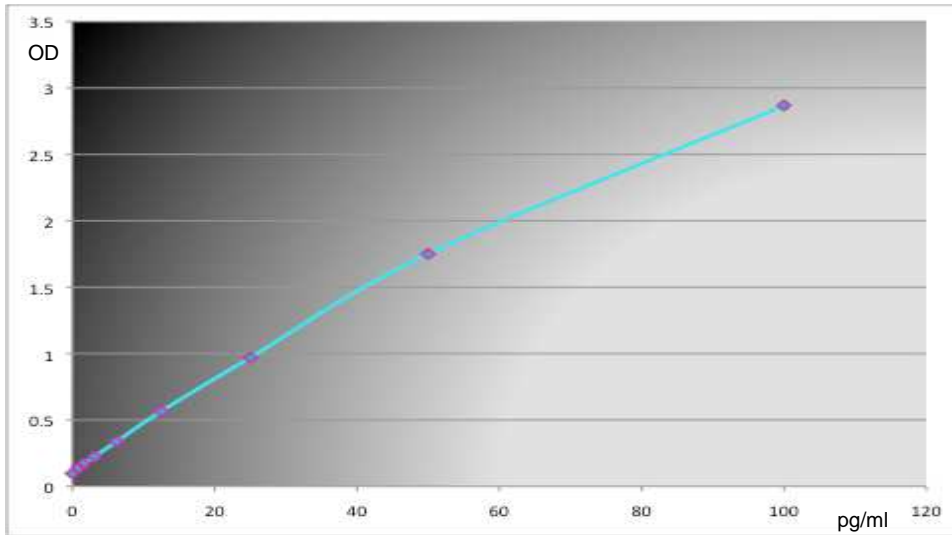
Επιφανειακή Έκφραση Πρωτεΐνης CD10 (NEP): Κυτταρομετρία Ροής



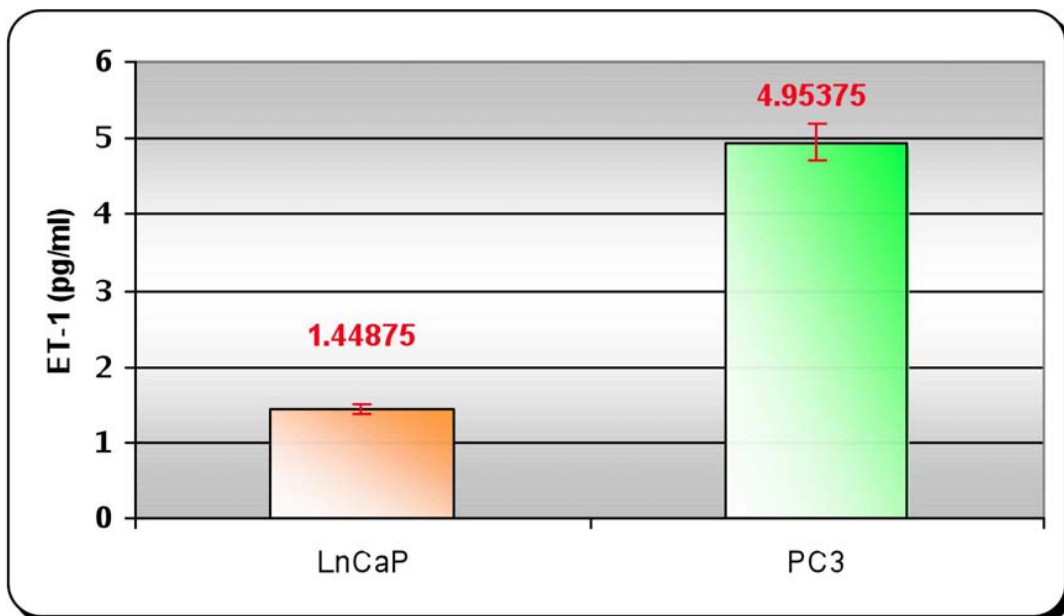
PC-3, LNCaP: baseline; CD10 FCM (anti-CD10-FITC mouse monoclonal, Beckman Coulter)

Παράρτημα XII

Συγκέντρωση εκκρινόμενης ET-1: Μέθοδος ELISA



ET-1 absorbance standard curve; ELISA



PC-3, LnCaP: baseline; ET-1 concentration in CM (ELISA)