



ΤΜΗΜΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ / NFκΒ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Π. ΤΣΑΠΑΚΙΔΗΣ
Ειδικευόμενος Παθολογίας-Ογκολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. Χρήστος Παπανδρέου
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
2. Γεώργιος Κουκούλης
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
3. Μιχαήλ Μελέκος
Καθηγητής Ουρολογίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

1. Χρήστος Παπανδρέου
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας
2. Γεώργιος Κουκούλης
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
3. Μιχαήλ Μελέκος
Καθηγητής Ουρολογίας
4. Λάζαρος Σακκάς
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
5. Ιωάννης Στεφανίδης
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας
6. Γεώργιος Κουκούλης
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας
7. Γεώργιος Βασιλόπουλος
Επίκουρος Καθηγητής - Παθολογίας-Αιματολογίας

Περιεχόμενα

1. Προλογος	9
2. Συντομογραφίες.....	13
3. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
3.1. NEP (Neutral endopeptidase).....	21
3.2. NFκB.....	26
3.3. ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑ.....	29
3.4. Η αναστολή του πρωτεασώματος αυξάνει την δραστικότητα του p53.....	39
3.5 Η αναστολή του πρωτεασώματος και του μονοπατιού PI3k/Akt αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27.....	44
3.6 Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl και η σχέση τους με τα κυτταρικά μονοπάτια στον καρκίνο του προστάτη.....	47
3.7. Το μοριακό μονοπάτι του NEP - NFκB - πρωτεάσωμα και η σχέση του με τον καρκίνο του προστάτη.....	51
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	55
4.1. ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ.....	56
4.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
4.1.1. Καλλιέργεια κυττάρων.....	60
4.1.2. Δοκιμασία Μεθύλ - τριαζολύλ - τετραζολίου (MTT).....	61
4.1.3. Δοκιμασία βιωσιμότητας των κυττάρων με τον αποκλεισμό του κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue).....	62
4.1.4. Δοκιμασία κατακερματισμένου DNA.....	62
4.1.5. Δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστικότητας.....	63
4.1.6. Απομόνωση πρωτεϊνών και Western blotting.....	64
4.1.7. Δοκιμασία ενζυμικής δραστικότητας του NEP.....	66
4.1.8. Δοκιμασία RT - PCR.....	66
4.1.9. Στατιστική ανάλυση.....	68
4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
4.2.1. Η επίδραση των νευροπεπτιδίων στην κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλεται από την χρήση της μπορτεζομίμπης.....	70
4.2.2. Τα νευροπεπτίδια δεν καταφέρνουν να αναστείλουν την απόπτωση	

που προκαλεί η μπορτεζομίμη.....	70
4.2.3. Η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση p53, p21, p27 και Bad με τη χορήγηση νευροπεπτιδίων και του αναστολέα του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμη.....	75
4.2.4. Η πρωτεασωμική δραστηριότητα αυξάνεται από τη χορήγηση νευροπεπτιδίων στην PC3 κυτταροσειρά.....	80
4.2.5. Η μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα από τα νευροπεπτίδια μπλοκάρει από την μπορτεζομίμη στη PC3 κυτταροσειρά.....	84
4.2.6. Η διαφορετική επίδραση των νευροπεπτιδίων, βομβεσίνη και ET-1, και του αναστολέα του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμη, στην έκφραση των γονιδίων στόχων του NFκB, IL-8 και VEGF.....	86
4.2.7. Η μπορτεζομίμη εμποδίζει τη δράση της MAPK και στα ανδρογόνο-ανεξάρτητα και στα ανδρογόνο-εξαρτώμενα κύτταρα.....	87
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	91
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
8. ABSTRACT.....	101
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	102

Πρόλογος

Η μοριακή βάση του καρκίνου του προστάτη υπήρξε αινιγματική και αδιευκρίνιστη για δεκαετίες. Τα τελευταία όμως χρόνια χάρη στην εξέλιξη που έχει πραγματοποιηθεί στον τομέα της μοριακής βιολογίας, έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό οι μηχανισμοί καρκινογένεσης τόσο στον καρκίνο του προστάτη όσο και σε άλλους καρκίνους. Η ανακάλυψη των πρώτο-ογκογονιδίων (proto-oncogenes) που αποτελούν αδρανείς μορφές γονιδίων, φώτισε νέα πεδία στην έρευνα των μηχανισμών της καρκινογένεσης, αναδείχθηκε ο ρόλος αρκετών ογκογονιδίων και στον καρκίνο του προστάτη, όπως είναι τα c-myc, c-fos και c-jun, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Τα πρώτο-ογκογονίδια αυτά αντιπροσωπεύουν κάποια από τα πρώτα γονίδια που εκφράζονται στον προστάτη ευνουχισμένων ποντικών μετά από τη χορήγηση ανδρογόνων. Ο ρόλος τους αφορά στην μετατροπή εξωπυρηνικών μιτογόνων ερεθισμάτων σε γονιδιακή έκφραση, που στη συνέχεια μεταφράζεται στους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, δηλαδή στις πρωτεΐνες Fos, Jun και Myc. Οι πρωτεΐνες αυτές με τη σειρά τους, ρυθμίζουν τα δευτερεύοντα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη. Η διεγερτική δράση των γονιδίων c-fos και c-jun επάγεται από παράγοντες ανάπτυξης, όπως ο EGF (epidermal growth factor) και ο FGF (fibroblast growth factor), εκτός εάν επηρεασθεί από την ανασταλτική δράση παραγόντων, όπως ο TGF- β (transforming growth factor β). Σε αυτή την προσεκτικά ρυθμισμένη και πολύπλοκη διαδικασία οι πρωτεΐνες Fos και Jun αυτορυθμίζουν την έκφραση των ίδιων τους των γονιδίων. Και άλλα ογκογονίδια ενδεχομένως σχετίζονται με τον καρκίνο του προστάτη όπως τα her-2, neu, p53. Μεγάλη προσπάθεια έχει εστιασθεί στην εύρεση γονιδίου υπεύθυνου για την εμφάνιση προστατικού καρκίνου και φαίνεται ότι υπάρχει προδιαθεσική εστία στο χρωμόσωμα 1 και στο χρωμόσωμα 10, όπου βρίσκεται το PTEN ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Αυτό που είναι πλέον παραδεκτό στην καρκινογένεση στον προστάτη είναι η άποψη πως δεν αρκεί βλάβη ή μετάλλαξη σε ένα μόνο ογκογονίδιο, καθώς ο καρκίνος είναι μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων, κατά τα οποία το γονιδίωμα διαδοχικά εκτίθεται σε πολλαπλά τυχαία «χτυπήματα». Από επιδημιολογικές μελέτες και στατιστική ανάλυση της εμφάνισης του

προστατικού καρκίνου, προϋούσης της ηλικίας, έχει υπολογισθεί ότι ο αριθμός των βημάτων ή «χτυπημάτων» κυμαίνεται από 4 έως 6 για τον καρκίνο του προστάτη και μια πιθανή εφαρμογή της θεωρίας αυτής (Multiple Hit Theory).

Σήμερα υπάρχει η δυνατότητα αναγνώρισης πολλών μορίων-στόχων στους δρόμους της καρκινογένεσης. Αυτά τα μόρια στόχοι συμβάλλουν σήμερα τα μέγιστα στη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου. Το σύστημα πρωτεασώματος-ουβικουτίνης (UPS) αποτελεί ένα τέτοιο στόχο στη θεραπεία και του καρκίνου του προστάτη. Η πρωτεόλυση από το σύστημα πρωτεασώματος-ουβικουτίνης (UPS) είναι ένας άμεσος και αποτελεσματικός τρόπος αποδόμησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες χρονικά στιγμές, και σε πολλές περιπτώσεις μια πρωτεΐνη αποδομείται μόνο όταν υπάρχει το κατάλληλο μοριακό σήμα. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που αποτελούν υποστρώματα για το πρωτεάσωμα υπάρχουν και πρωτεΐνες που εμπλέκονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είτε θετικά είτε αρνητικά. Η αναστολή του γενικά σε πολλούς καρκινικούς τύπους συντελεί στην κυτταρική απόπτωση και μάλιστα στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται αναστολείς του, όπως μπορετζομίμπη, στη θεραπεία του καρκίνου.

Ο ρόλος των ορμονών στην παθογένεια του καρκίνου του προστάτη δεν είναι πλήρως κατανοητός, αν και η νόσος δεν παρουσιάζεται σε άνδρες που έχουν ευνουχιστεί προ της εφηβείας, γεγονός που δείχνει ότι τα ανδρογόνα πιθανόν παίζουν ρόλο στην ανάπτυξή του. Είναι γνωστό πως τα κυκλοφορούντα ανδρογόνα είναι μια αναγκαία προϋπόθεση για την ομαλή ανάπτυξη του φυσιολογικού προστάτη, καθώς και για την ανάπτυξη της καλοήθους υπερπλασίας του αδένα. Ο ακριβής ρόλος των ανδρογόνων σε σχέση με την καρκινογένεση στον προστάτη δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, αλλά φαίνεται πως αυτά ασκούν τη δράση τους προωθώντας την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Η ορμονική επίδραση ενισχύεται από το γεγονός ότι η ανάπτυξη πολλών καρκινωμάτων του προστάτη μπορεί να αναχαιτιστεί με ορχεκτομή ή με χορήγηση οιστρογόνων. Ο καρκίνος καθώς αναπτύσσεται γίνεται ανδρογόνο-ανεξάρτητος και πιο επιθετικός. Ο ανδρογόνο-εξαρτώμενος τύπου καρκίνου εκφράζει μια μέταλλο-πεπτιδάση, NEP, που διασπά και απενεργοποιεί τα νευροπεπτίδια που κύριο ρόλο έχουν την κυτταρική ανάπτυξη σε βάρος της κυτταρικής απόπτωσης. Η απώλεια των ανδρογόνων και επομένως της NEP έχει σαν αποτέλεσμα τα νευροπεπτίδια να συνδέονται

με τους υποδοχείς τους και να ενεργοποιούν το σύστημα NFκB, προάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη και αγγειογένεση.

Σε αυτή τη μελέτη έγινε μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί και άλλο ο ρόλος των νευροπτιδίων, του συστήματος του πρωτεασώματος και ενός παράγοντα NFκB που συνδέεται άμεσα με την αύξηση, την ανάπτυξη και την αντίσταση στην κυτταρική απόπτωση. Όμως όλα αυτά δε θα ήταν εφικτά χωρίς τη συμβολή του αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας - Ογκολογίας κ. Χρηστό Παπανδρέου που εκτός από την απεριόριστη εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, με βοήθησε να συλλάβω έννοιες τις ογκολογίας και των μοριακών γεγονότων που συντελούνται στον καρκίνο του προστάτη. Επίσης, θα πρέπει να ευχαριστήσω και τους συνεργάτες του ογκολογικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Θεσσαλίας, συναδέλφους Παναγιώτη Βλαχοστέργιο, Άννα Πατρικίδου και Γιάννη Βουτσαδάκη που μου προσέφεραν σημαντική βοήθεια σε διάφορα σημεία της εργασίας μου. Τέλος θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, τη σύζυγο μου καθώς και το νέο μέλος της οικογένειάς μου, τον υιό μου, που ο καθένας με τον τρόπο του και κυρίως με την ενθάρρυνση τους με βοήθησαν να φέρω σε πέρας την εργασία αυτή.

Συντομογραφίες

AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptosis Activating Factor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC/C	Anaphase Promoting Complex / Cyclosome
AR	androgen receptor
ARF	Alternative Reading Frame
ARF-BP1	ARF Binding Protein 1
ASPP	Apoptosis Stimulating Protein of p53
ATFB1	Atrial Fibrillation, Familial, 1
BAD	BCL2 Antagonist of Cell Death
Bax	Bcl2-Associated X Protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xl	Basal cell lymphoma-extra large
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeats
BRS	Bombesin Receptor Subtype
cAMP	Cyclic Adenine Mono-Phosphate
CD40	Cluster of Differentiation 40
CDKs	cyclin-dependent kinase
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
Diablo	Direct IAP Binding protein with Low pI
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer 4
DR 4, 5	Death Receptor 4, 5
E2F	E2 Transcription Factor
ECE1	Endothelin Converting Enzyme 1
EDTA	Ethylene Diamine Triacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

ELAM1	Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1
ERG	ETS-Related Gene
ERM	Estrogen Receptor Methylation
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
ETV6	ETS Translocation Variant 6 (gene)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FoxO	Forkhead box O
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
GRP	Gastrin Releasing Peptide
GST	Glutathione-S-Transferase
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3-beta
HAUSP	Herpesvirus-associated Ubiquitin Specific Protease
hdm2	Human double minute 2
HIF	Hypoxia Induced Factor
HtrA2	High temperature requirement A2
IAPs	Inhibitors of Apoptosis
IBM	IAP Binding Motif
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule One
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Receptor
I κ B	Inhibitor of Kappa-B
I κ K	Inhibitor of Kappa-B Kinase
IL-1, -8	Interleukins 1 and 8
JNK	Jun N-terminal Kinase
KELL	Kell antigen system
KLF5	Kruppel Like Factor 5
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
Mdm2	Murine double minute 2

MEKK3	mitogen - activated protein kinase 3
MMAC1	Mutated in Multiple Advanced Cancers 1
MPF	Mitosis Promoting Factor
NEMO	NF-Kappa-B Essential Modulator
NFkB	Nuclear Factor Kappa B
NFKB1-NFKB2	Nuclear Factor Kappa-B, Subunit 1- Nuclear Factor Kappa-B, Subunit 2
NOXA= PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
p50	polypeptide of 50K
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3k	Phosphoinositol-3 kinase
PIA	Protein Interaction Analysis
PIG3	p53-Inducible Gene 3
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Protein Kinase B
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
PSA	Prostate-Specific Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog at chromosome 10
RB1	Retinoblastoma 1
RHD	REL homologue domain
RING	Really Interesting New Gene
SCF	Skpl/ Cullin/ F-box protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Siah-1	Seven in absentia, human homolog 1
SKP-2	S-Phase Kinase-Associated Protein 2

Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SKP2	S phase Kinase-associated Protein 2
TAB2	TAK1 binding protein 2
TAK 1	TGF Activated Kinase
TGF	Transforming growth factor
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAF6	TNF Receptor -Associated Factor 6
U-box	UFD2 homologous box
UPS	Ubiquitin Proteasome System
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule Number 1
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
β TrCP	Beta Transducin repeat Containing Protein
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πιο συνήθης σπλαχνικός καρκίνος στους άντρες και η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο σε άντρες πάνω από 50 ετών, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Είναι κατά κύριο λόγο μια νόσος των μεγαλύτερων σε ηλικία αντρών, με μια κορυφή συχνότητας μεταξύ των ηλικιών 65 και 75 ετών. Οι λανθάνοντες καρκίνοι του προστάτη είναι ακόμα πιο κοινοί από τους κλινικά εμφανείς, με μια συνολική συχνότητα που υπερβαίνει το 50% σε άντρες άνω των 80 ετών. (1)

Αν και η αιτιολογία του καρκίνου του προστάτη παραμένει άγνωστη, κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι ορμονικοί και γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν ρόλο στην παθογένεση του. Ο καρκίνος του προστάτη δεν αναπτύσσεται σε άντρες ευνουχισμένους πριν την εφηβεία, δείχνοντας ότι τα ανδρογόνα πιθανώς έχουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του. Υπέρ της ορμονικής επιρροής είναι και το γεγονός ότι η ανάπτυξη πολλών καρκινωμάτων του προστάτη μπορεί να ανασταλεί με ορχεκτομή ή με τη χορήγηση οιστρογόνων, όπως διαιθυλστυλβεστρόλης. Πάντως, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της οζώδους υπερπλασίας του προστάτη, ο ρόλος των ορμονών στην παθογένεση του καρκίνου του προστάτη δεν είναι πλήρως κατανοητός. (2)

Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν γίνει σημαντικές ανακαλύψεις πάνω στην μοριακή παθογένεση του καρκίνου του προστάτη. Έχει αποδειχτεί ότι διαφορετικοί καρκινικοί τύποι είναι πραγματικά μοριακά διαφορετικές ασθένειες που έχουν συγκεκριμένες γενετικές διαταραχές, γεγονός που βοηθά στην εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι και ιστολογικά ίδιοι τύποι καρκίνου συχνά είναι υπότυποι που μοριακά διαφέρουν (3). Αυτές οι διαταραχές συχνά αντικατοπτρίζουν διαφορετική κυτταρική προέλευση ή και διαφορετική γενετική διαταραχή (πίνακας 1). Η ταξινόμηση των καρκίνων με βάση τη μοριακή γενετική είναι πάρα πολύ σημαντική, γιατί έτσι θα μπορέσει να γίνει η διάγνωση του καρκίνου σε αρχικά στάδια και να επηρεαστεί σημαντικά η θεραπεία και η πρόγνωση του.

Στον καρκίνο του προστάτη εάν και έχουν περιγράψει ένας μεγάλος αριθμός γενετικών διαταραχών (πίνακας 1) δεν έχουν μέχρι πρόσφατα εξακριβωθεί τα συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Κλινικά ο καρκίνος του προστάτη είναι μια ετερογενής ασθένεια. Δηλαδή υπάρχουν άντρες που έχουν επιβιώσει χωρίς εμφανή

στοιχεία μεταστάσεων ακόμα και χωρίς θεραπεία, ενώ υπάρχουν άλλοι που οδηγούνται ταχύτατα στο θάνατο. Σήμερα οι κλινικές παράμετροι που περιλαμβάνουν και τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου αποτελούν το καλύτερο σύστημα ταξινόμησης. Παρόλο αυτά, είναι ο καρκίνος του προστάτη σαν αυτόν του μαστού που απαρτίζεται από ξεχωριστούς μοριακούς υπότυπους που καθορίζονται από διαφορετικά μοντέλα έκφρασης mRNA που ευθύνονται για την κλινική ετερογένεια; Ή μοιάζει περισσότερο με τον καρκίνο του παχέως εντέρου μια πιο μοριακά ομοιογενή ασθένεια με μια μόνο κυτταρική προέλευση και μοριακά γεγονότα που αργότερα συμβάλουν στην κλινική ετερογένεια; Οι έρευνες έχουν δείξει ότι οι διάφοροι τύποι καρκίνου του προστάτη (in situ, PIN και μεταστατικός) έχουν διαφορετικά μοντέλα έκφρασης (4-7). Ένας μεγάλος αριθμός μοριακών αλλαγών που ανιχνεύτηκαν στον καρκίνο του προστάτη, όπως χρωμοσωμικές μεταλλάξεις (μετατοπίσεις, ελλείψεις, διπλασιασμοί) και σωματικές μεταλλάξεις φαίνονται στον πίνακα 1. Επειδή οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε τα σημαντικά γονίδια (8).

Βλάβη	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
TMPRSS2- ERG, TMPRSS2- ETV1, TMPRSS2- ETV4 μετατοπίσεις	21q22 (μεταξύ του TMPRSS2 και του ERG)	<20% PIN ~60% του τοπικού και μεταστατικού καρκίνου
GSTπ απώλεια	Μεθυλίωση Υποκινητή	~ 5% PIA, ~50% PIN, ~90% καρκίνωμα
PTEN απώλεια	10q23 απώλεια, μεταλλάξεις, μειωμένη σταθερότητα	10%-60% με αυξημένη συχνότητα σε μεγαλύτερου βαθμού βλάβες και προχωρημένη ασθένεια
NKX3.1 απώλεια	Απώλεια του αλληλίου 8p21	60% καρκίνωμα, 85% καρκίνωμα

P27/Kip1 απώλεια	Απώλεια του αλληλίου 12q12, μειωμένη πρωτεϊνική σταθερότητα	Μειωμένη προοδευτικά έκφραση ανοσοιστοχημικά από PIN σε καρκίνωμα και μεταστατικές βλάβες.
Άγνωστο	6q14-21	Απώλεια στο 30% του καρκίνου του προστάτη
Άγνωστο(πιθανό ATFB1)	16q21-24 απώλεια	10% - 60%
Άγνωστο (πιθανόν RB1, KLF5)	13q13-21 απώλεια	40%, το δεύτερο πιο συχνό μετά το 8p21
AR γονίδιο	Xq12 , μετάλλαξη, υπερέκφραση	Τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται από τον τοπικό στον μεταστατικό καρκίνο
C-myc γονίδιο	8q24	

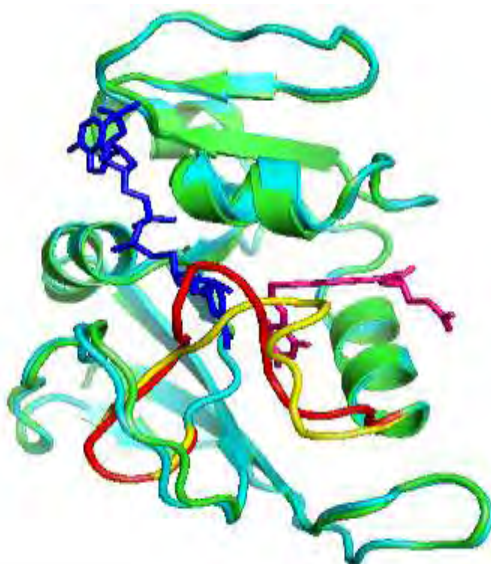
Πίνακας 1. Διάφορες μοριακές αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του προστάτη.

Ο ανδρογονικός υποδοχέας (AR) ο οποίος εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του Χ χρωμοσώματος Xq12, είναι μια πρωτεΐνη 110 kD και είναι ο υποδοχέας των στεροειδών ορμονών (9-10). Η σύνδεση του με τα ανδρογόνα ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που έχουν σχέση με την επιβίωση και την κυτταρική διαφοροποίηση των προστατικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι AR είναι απαραίτητοι τόσο για την ανάπτυξη του φυσιολογικού όσο και του κακοήγη προστατικού ιστού. Για αυτό οι άντρες με απενεργοποιημένους τους AR ή άντρες με ορχεκτομή σε νεαρή ηλικία δεν αναπτύσσουν καρκίνο του προστάτη. Οι ανδρογονικοί υποδοχείς διαδραματίζουν ένα κρίσιμο ρόλο τόσο στην παθογένεση στα αρχικά στάδια όσο και στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη στα προχωρημένα στάδια. Τα τρία γονίδια που έχουν μελετηθεί στο μονοπάτι των ανδρογονικών υποδοχέων, το AR, το CYP17 και το SRD5A2 έχουν δώσει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα (11). Έχει αποδειχτεί πάντως ότι η αυξημένη δραστηριότητα των ανδρογονικών υποδοχέων εκθέτει τους άντρες σε αυξημένο κίνδυνο

ασθένειας και τα φάρμακα που μπλοκάρουν αυτούς τους υποδοχείς παραμένουν τα κύρια φαρμακευτικά μέσα θεραπείας.

NEP (Neutral endopeptidase)

Η πρωτεόλυση διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και στον κυτταρικό θάνατο. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί πάνω από 300.000 πρωτεάσες, πολλές από τις οποίες ακόμα δεν έχουν μελετηθεί και μπορεί στο μέλλον να δώσουν λύσεις στη θεραπεία του καρκίνου. Μια οικογένεια τέτοιων πρωτεασών είναι μια οικογένεια μέταλλο - πεπτιδασών η NEP που έχει αποτελέσει ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο και στον καρκίνο του προστάτη (12). Η NEP (εικόνα 1) είχε αρχικά, πριν από 30 χρόνια, αναγνωριστεί σαν ένα αντιγόνο των νεφρικών μεμβρανών και τότε είχε συνδεθεί με τον μεταβολισμό της ινσουλίνης. Παρόλο αυτά ο ρόλος αυτός φαίνεται να επιτελείται από μια άλλη μέταλλο-πεπτιδάση IDE (ένζυμο αποδόμησης της ινσουλίνης) και όχι από το NEP (13).



Εικόνα 1. Η μέταλλο - πεπτιδάση NEP και πως αναδιπλώνεται στο χώρο (τριτοταγή δομή).

Η NEP είναι (ή αλλιώς γνωστό ως CD10, MME, EC 3.4.24.11) μια μεταλοπεπτιδάση που είναι μέλος της M13 οικογένειας στην οποία ανήκουν και τα ένζυμα που μετατρέπουν την ενδοθελίνη (ECE-1 και ECE-2), το KELL και το PEX. Η NEP σαν μια κλασική μέταλλο-πεπτιδάση περιέχει μια HexxH ψευδάργυρο-εξαρτώμενη δομή και μια καλά διατηρούμενη ακολουθία ExxA/GD στην οποία η γλουταμίνη υπηρετεί το τρίτο υπόστρωμα ψευδαργύρου. Είναι μια επιφανειακή 90 με 110 kDa πεπτιδάση, τύπου II παρεμβαλλομένη μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις δομές: ένα N -άκρο κυτοπλασματικό, μια υδροφοβική μεμβρανική δομή και μια μεγάλη εξωκυττάρια δομή που είναι υπεύθυνη για τη καταλυτική της δραστηριότητα. Το NEP εξαρτάται από τον ψευδάργυρο και διασπάει τον πεπτιδικό δεσμό στο αμινικό άκρο των υδροφοβικών αμινοξέων και απενεργοποιεί μια σειρά φυσιολογικά ενεργών πεπτιδίων όπως είναι η βομβεσίνη, η νευροτενσίνη, οξυτοκυνίνη, βραδυκινίνη και η ενδοθελίνη-1. Επομένως, η NEP μειώνει τη συγκέντρωση των νευροπεπτιδίων τοπικά εμποδίζει τη σύνδεση τους με τους κυτταρικούς τους υποδοχείς και τη μεταφορά του μιτογόνου σήματος τους (14). Η απώλεια του NEP ή και η μειωμένη έκφραση του επομένως έχει σαν αποτέλεσμα τα μιτογονικά αυτά πεπτιδία να διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση και να συμβάλουν στην ανάπτυξη του κυτταρικού καρκίνου. Απώλεια του NEP έχει αναφερθεί και στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Τα νευροπεπτιδία συμμετέχουν στην κυτταρική ανάπτυξη του ανδρογονοανεξάρτητου καρκίνου του προστάτη. Η βομβεσίνη, η νευροτενσίνη και η ενδοθελίνη-1 είναι μιτογόνοι παράγοντες και οι υποδοχείς τους συναντιούνται στον ανδρογονοανεξάρτητο καρκίνο του προστάτη (15-17). Η σύνδεση των νευροπεπτιδίων με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ρυθμίζεται αρνητικά εν μέρη από εξωκυττάρια ένζυμα τα οποία καταβολίζουν τα νευροπεπτιδία με υδρόλυση των πεπτιδικών τους δεσμών (18-19). Το NEP που φυσιολογικά εκφράζεται από τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα έχει σαν υποστρώματα την βομβεσίνη, την ενδοθελίνη και την νευροτενσίνη που έχουν συσχετισθεί σε ποικίλα στάδια του καρκίνου του προστάτη, συμπεριλαμβανομένου της καρκινικής ανάπτυξης, της μετάστασης και της

εξέλιξης σε ανδρογόνο - ανεξάρτητο καρκίνο (20-22). Γενικά η απώλεια της έκφρασης του NEP παρατηρείται πολύ συχνά στον καρκίνο του προστάτη και τα προστατικά καρκινικά κύτταρα αποτελούν ένα εξάισιο μοντέλο μελέτης της NEP και του ρόλου του στον καρκίνο (23-24). Αυτή η μείωση της έκφρασης της NEP μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη του καρκίνου επιτρέποντας τα νευροπεπτίδια να συνδέονται με τους υποδοχείς τους και να προάγουν μονοπάτια κυτταρικής ανάπτυξης (25).

Τα βιολογικά και ρυθμιστικά αποτελέσματα της NEP είναι αποτέλεσμα της ενζυμικής δραστηριότητας της πεπτιδάσης (18-19). Παρόλο αυτά μελέτες έχουν δείξει ότι της NEP έχει και άλλες βιολογικές ιδιότητες εκτός από την ικανότητα της να απενεργοποιεί υποστρώματα νευροπεπτιδίων. Δηλαδή η NEP από μόνο της επηρεάζει τη μεταγωγή σημάτων που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη (26-27) και απόπτωση (28). Συνολικά, οι αντί-καρκινικές δράσεις της NEP και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνει το ρόλο της φαίνονται στον πίνακα 2 και 3.

<i>NEP ΜΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</i>
1. Μειωμένη έκφραση στον καρκίνο του προστάτη
2. Αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και την ογκογένεση
3. Αναστέλλει την κυτταρική διήθηση και μετάσταση
4. Αναστέλλει την κυτταρική επιβίωση
5. Παρεμβάλλεται με άλλες πρωτεΐνες που καταστέλλουν τον όγκο
6. Αντί - αγγειογενετική δράση

Πίνακας 2. Λειτουργίες της NEP σαν αναστολέας του καρκίνου.

<i>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΤΟ NEP ΚΑΤΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ</i>
1. Καταλυτική διάσπαση των νευροπεπτιδίων, μπλοκάροντας την ενεργοποίηση του Src
2. Έμμεση σύνδεση με το PI3-k μέσω της κινάσης Lyn, μπλοκάροντας την ενεργοποίηση του FAK
3. Άμεση σύνδεση με τις ERM πρωτεΐνες που οδηγεί στην αναστολή της

επίδρασης των ERM πρωτεϊνών με το CD44

4. Άμεση συσχέτιση με το PTEN ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη δράση φωσφατάσης του PTEN

Πίνακας 3. Μηχανισμοί μέσω των οποίων η NEP αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου.

Η NEP έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με ένα μέλος της Src οικογένειας κινασών, τη Lyn και μια άγνωστη 75 - 85 KDa πρωτεΐνη των B- κυττάρων (26). Η NEP παρεμβάλλεται στη λειτουργία της φωσφατοιδουλοινισιτόλης 3 - κινάσης (PI3-k) μέσω της Lyn. Συγκεκριμένα, μειώνει τη φωσφορυλίωση της Lyn, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να συνδέεται με το p85 της PI3-k , σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο NEP - Lyn - PI3-k (29-30). Η PI3-k ενεργοποιεί την φωσφατοιδουλοινισιτόλη - 3, 4, 5 - τριφωσφατάση (PIP₃) φωσφορυλιώνοντας την φωσφατοιδουλοινισιτόλη - 4, 5 - διφωσφατάση (PIP₂). Η PIP₃ με τη σειρά του ενεργοποιεί πολλούς παράγοντες, όπως την Akt / PKB κινάση, την p70S6 - κινάση, την Tec - οικογένεια τυροσινικών κινασών και μια μικρή G - πρωτεΐνη Rac. Η Akt σερίνη θρεονίνη κινάση είναι ένα μόριο που ρυθμίζει την επιβίωση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη (31-32).

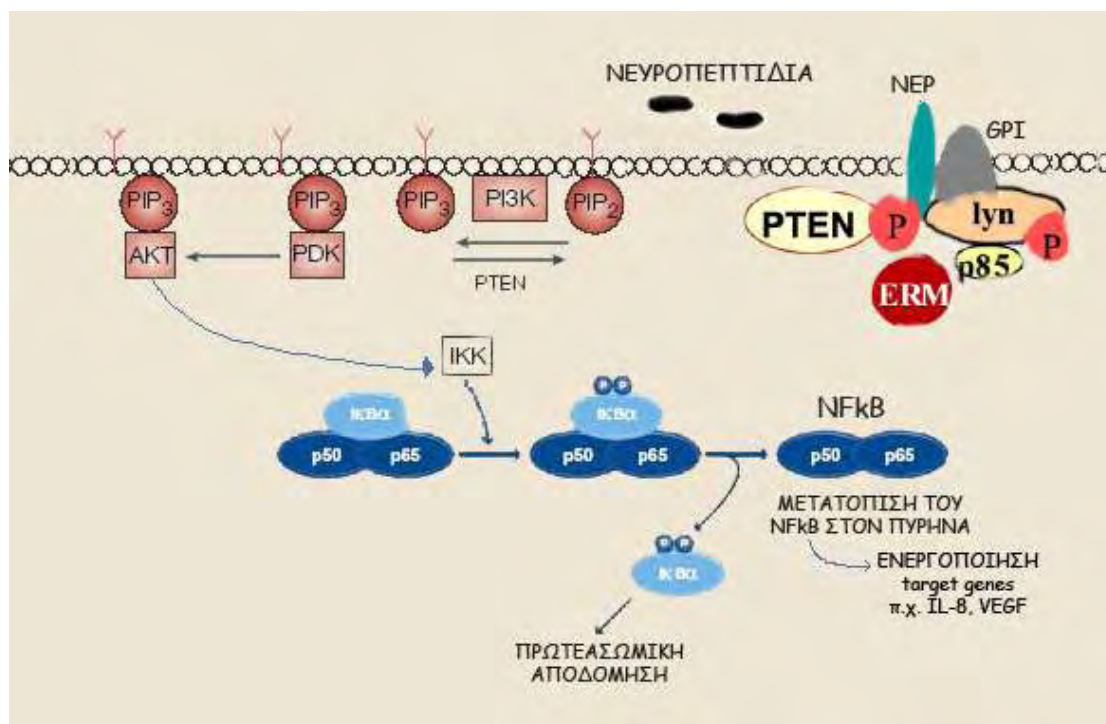
Το γονίδιο που ελέγχει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN (phosphatase and tensin homolog) γνωστό και ως MMAC1 (mutated in multiple advance cancers) αρχικά απομονώθηκε στους καρκίνους του μαστού και στο γλειοβλάστωμα (33). Συμμετέχει στην απόπτωση, στην κυτταρική ρύθμιση και διαφοροποίηση και πιστεύεται ότι είναι κλειδί για την καταστολή του καρκίνου. Το PTEN είναι το μοναδικό γονίδιο που εμφανίζεται σε όλους τους καρκίνους του προστάτη με χρωμοσωμικές ελλείψεις στο μακρύ βραχίονα του 10^{ου} χρωμοσώματος (10q23) (8). Ο χρόνος που συμβαίνει η απώλεια του PTEN μεταξύ της 22 και 25 θέσης δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί (σε αρχικά ή σε προχωρημένα στάδια). Πάντως είναι πιο συχνό να συμβαίνει σε προχωρημένα στάδια ή σε επιθετικές μορφές προστατικού καρκίνου. Η πλήρης απώλεια του PTEN έχει βρεθεί σε περισσότερους των 50% των καρκίνων με μεταστάσεις και 20% των τοπικών καρκίνων. Οι καρκίνοι που

είχαν στα αρχικά στάδια απώλεια του PTEN χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη πιθανότητα μετάστασης (34).

Το PTEN ανταγωνίζεται την δραστικότητα της PI3-k κινάσης κωδικοποιώντας μια λιπιδιακή φωσφατάση τις οποίας το υποστρώμα είναι η φωσφατοιδυλοινισιτόλη-3, 4, 5-τριφωσφατάση (PIP₃) αποφωσφορυλιώνοντας την σε PIP₂ (35). Η NEP και το PTEN έχουν άμεση συσχέτιση και πιο συγκεκριμένα η κυτταροπλασματική δομή του NEP με τα αμινοξέα 379 με 385 που εντοπίζονται στο καρβοξυλικό άκρο του PTEN (36). Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του PTEN είναι αυξημένα στα προστατικά καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν την NEP σαν αποτέλεσμα μειωμένης αποδόμησης της πρωτεΐνης και αυξημένης δραστικότητας της λιπιδιακής φωσφατάσης PTEN (37).

Η ενεργοποίηση του Akt που ακολουθεί την ενεργοποίηση της PI3-K οφείλεται σε πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο IGF-1 που συνδέεται με τους υποδοχείς IGF-1R και υποστρώματα που είναι συνδεδεμένα με G πρωτεΐνες που συνδέονται με τους υποδοχείς GPCRs. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η βομβεσίνη, η νευροτενσίνη και η ενδοθηλίνη-1 (38). Στα προστατικά καρκινικά κύτταρα έχει βρεθεί ότι η βομβεσίνη και η ενδοθηλίνη-1 μπορούν να προάγουν τη φωσφορυλίωση του IGF - 1Rβ και της Akt ανεξάρτητα από τα υποστρώματα IGF - 1 (39). Η ενεργοποίηση του Akt από τα νευροπεπτίδια γίνεται κυρίως από το Src και της PI3-k. Η NEP αναστέλλει την επίδραση που έχουν τα νευροπεπτίδια στους υποδοχείς GPCR και IGF-1R και επομένως μπλοκάρει την ενεργοποίηση του Akt και κυτταρική ανάπτυξη. (εικόνα 2).

Στον καρκίνο του προστάτη η NEP εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα LNCaP προστατικά καρκινικά κύτταρα (25) που είναι μια κυτταρική σειρά που εξαρτάται από τα ανδρογόνα. Τα LNCaP κύτταρα δε διηθούν και δεν προκαλούν μετάσταση σε αντίθεση με τα ανδρογόνο ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα PC-3 (10). Αυτή η καρκινική προστατική κυτταρική σειρά δεν εκφράζει την NEP και εμφανίζει σημαντική βιωσιμότητα. Μάλιστα η κυτταρική ανάπτυξη και η δυνατότητα μετάστασης σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη υποστρωμάτων της NEP, όπως είναι η βομβεσίνη και η ενδοθηλίνη-1 (40). Αυτή η συσχέτιση μπορεί να έχει να κάνει με την καταλυτική ικανότητα της NEP να διασπά τα νευροπεπτίδια που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη, όπως είναι η βομβεσίνη και η ενδοθηλίνη

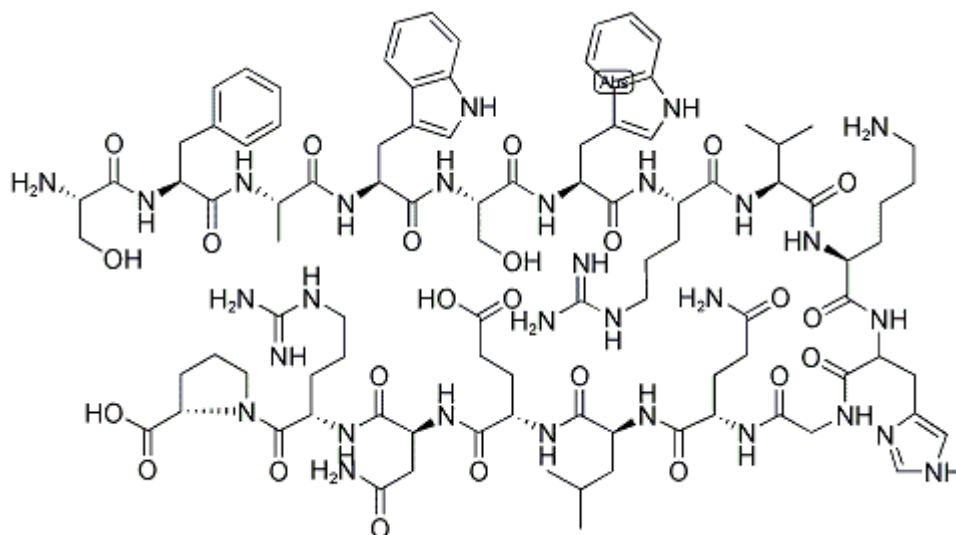


Εικόνα 2. Ο φυσιολογικός ρόλος της NEP είναι να αποδομεί τα νευροπεπτίδια όπως είναι η βομβεσίνη και η ενδοθελίνη. Επίσης σταθεροποιεί την λιπιδιακή φωσφατάση PTEN που αποφωσφορυλιώνει την φωσφατοιδυλοινισιτόλη - 3, 4, 5 - τριφωσφατάση (PIP₃) στην φωσφατοιδυλοινισιτόλη - 4, 5 - διφωσφατάση (PIP₂). Η απώλεια της NEP έχει σαν αποτέλεσμα τα νευροπεπτίδια να ενεργοποιούν την PI3k κινάση που φωσφορυλιώνει την PIP₂ σε PIP₃ και ενεργοποιεί την Akt. Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την IκK κινάση που φωσφορυλιώνει την IκB που οδηγείται σε αποδόμηση από το πρωτεάσωμα. Στη συνέχεια το αποδεσμευμένο NFκB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους του, όπως είναι το IL-8 και VEGF.

NFκB

Το NFκB (εικόνα 3) είναι ένας μεταγραφικός διμερής παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια Rel, η οποία περιλαμβάνει RelA (γνωστό και ως p65), c-Rel, Rel- B, p50 και p52 (41). Πρώτη φορά αναγνωρίστηκε στον πυρήνα των ώριμων B - λεμφοκυττάρων σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στο DNA σε μια αλληλουχία 11 βάσεων GGGACTTTCC (42). Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν 5 διακριτές υποομάδες NFκB με rel ομόλογες δομές που είναι απαραίτητες για τη σύνδεση του με το DNA και τη

ρύθμιση της μεταγραφής πάνω από 180 γονιδίων. Αυτές οι υποομάδες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δυο ομάδες, τη μια που περιέχει το NFκB1 (p105 / p50) και το NFκB2 (p100 / p52) και την άλλη που αποτελείται από το RelA (p65), το RelB και το c - Rel. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις πρόδρομες πρωτεΐνες p105 και p100 οι οποίες περιέχουν πέντε με επτά επαναλαμβανόμενες δομές που καλύπτουν το σήμα που προάγει τη μετατόπιση του στον πυρήνα (NLS). Με πρωτεόλυση που γίνεται από το πρωτεάσωμα δίνουν τις ενεργές μορφές p50 και p52 και είναι δυνατή η μετατόπιση του στον πυρήνα. Όλες οι NFκB πρωτεΐνες έχουν μια Rel ομόλογη δομή (RHD) η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το DNA, το διμερισμό, την πυρηνική μετατόπιση και τη σύνδεση με τις IκB πρωτεΐνες.



Εικόνα 3. Δομή NFκB και πως αναδιπλώνεται στο χώρο.

Οι IκB πρωτεΐνες περιλαμβάνοντας την IκBα, β και ε συνδέονται με το NFκB και μπλοκάρουν την πυρηνική του μετατόπιση και επομένως τη μεταγραφική του δραστηριότητα. Η ενεργοποίηση του NFκB περιλαμβάνει δυο μονοπάτια, το κανονικό που γίνεται με την αποδόμηση του IκB και το μη κανονικό που γίνεται την ενεργοποίηση του p100 (εικόνα 6) (43.). Στο κανονικό μονοπάτι, που είναι και το πιο συχνό, τα κύτταρα διεγείρονται με τη σύνδεση τους με διάφορους αγωνιστές, όπως ο παράγων νέκρωσης α (TNFα) ή η ιντερλευκίνη - 1β(IL-1β). Η σύνδεση του αγωνιστή με τον TNFR αυξάνει την πρωτεΐνη που συσχετίζεται με τον υποδοχέα θανάτου TRADD (TNF receptor - associated death domain) η οποία με τη σειρά της συνδεέται με το TRAF - 2 (TNF receptor - associated). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την

ενεργοποίηση μιας κινάσης της MAP3K (mitogen - activated protein kinase 3) που φωσφορυλιώνει και έτσι ενεργοποιεί το σύμπλοκο της IκK (44). Ένα σύμπλοκο που αποτελείται από δυο καταλυτικές υπομονάδες την IκKα και την IκKβ και μια ρυθμιστική υπομονάδα NEMO 9 γνωστή και ως IκKγ. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η IκKβ και όχι η IκKα φωσφορυλιώνει τις IκB πρωτεΐνες στις σερίνες 32 και 36. Η φωσφορυλίωση των IκB πρωτεϊνών τις οδηγεί στην πολυουβικιτινοποίηση τους, στις λυσίνες 21 και 22, με τη μεσολάβηση της E3 λιγκάσης βTrCP και στην αποδόμηση τους από το πρωτεάσωμα, απελευθερώνοντας έτσι το NFκB (45). Το μη κανονικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NFκB δεν απαιτεί την αποδόμηση των IκB πρωτεϊνών και συμβαίνει κυρίως στα B κύτταρα σαν απάντηση στην διέγερση των υποδοχέων της οικογένειας TNF, περιλαμβάνοντας τους υποδοχείς BAFF, λεμφοτοξίνη-β (LTβ) και CD40. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση NIK, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την IκKα. Αυτή στη συνέχεια φωσφορυλιώνει το p100 που οδηγεί στην εκλεκτική αποδόμηση από το πρωτεάσωμα της δομής που ομοιάζει με το IκB από το πρωτεάσωμα (46-47) και έτσι μετατρέπεται στη ώριμη υπομονάδα p52. Αυτή συνδέεται με την Rel - B και το διμερές μετατοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων του.

Η ενεργοποίηση του NFκB οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην αγγειογένεση και στη μετάσταση (48-49). Επίσης, η ενεργοποίηση του NFκB μπλοκάρει την κυτταρική απόπτωση και επάγει την κυτταρική ανάπτυξη (50-53). Τα καρκινικά κύτταρα όπως και κάθε άλλο κύτταρο χρειάζεται οξυγόνο για να επιβιώσει και αυτό περιορίζει την ανάπτυξη τους. Σε απόκριση σε διάφορες κυτοκίνες, όπως ο TNF, τα καρκινικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν διάφορους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως το VEGF και το MCP - 1, που είναι απαραίτητοι για το σχηματισμό νεοαγγείων στα καρκινικά κύτταρα (54-56). Το NFκB όμως, ρυθμίζει την έκφραση των διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης και κυτοκινών, όπως είναι το VEGF, ο TNF και ο MCP - 1, που είναι απαραίτητα για την αγγειογένεση (57-58). Οι μεταστάσεις του καρκίνου από την άλλη απαιτούν τη μεταφορά των καρκινικών κυττάρων τόσο ενδαγγειακά όσο και εξωαγγειακά. Η μεταφορά όμως διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων χρειάζεται διάφορα ειδικά μόρια

που παράγονται και από τα καρκινικά κύτταρα. Ανάμεσα σε αυτά είναι τα ICAM - 1, ELAM - 1, VCAM - 1 μόρια τα οποία παράγονται σαν απάντηση στην ενεργοποίηση του NFκΒ (59-61).

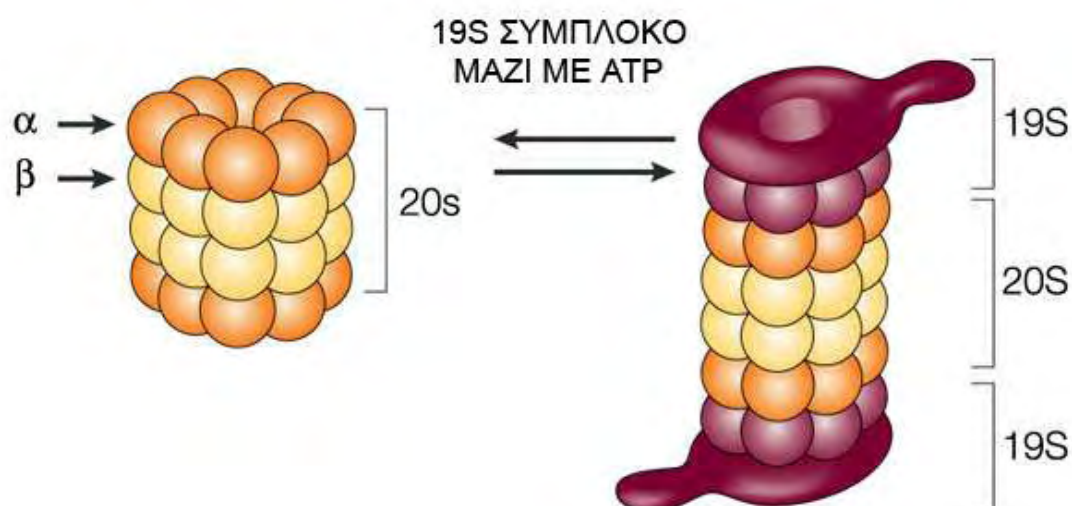
Τέλος το NFκΒ συνδέεται με το σύστημα πρωτεασώματος – ουβικουιτίνης και με άλλο μηχανισμό. Η πρωτεΐνη TRAF6 (TNRF - associated Factor 6) συντελεί στην ενεργοποίηση του υποδοχέα IL - 1R μετά τη σύνδεση του με την IL - 1. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια συνδέεται με την ουβικουιτίνη και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TAB2 (TAK1 binding protein 2) και την κινάση TAK1 (TGFβ activated kinase 1). Η ενεργοποίηση της TAK - 1 οδηγεί σε φωσφορυλίωση και επομένως ενεργοποίηση της IKK η οποία ως γνωστόν φωσφορυλιώνει την IκΒ και ότι αυτό συνεπάγεται. (62.)

ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑ

Η πρωτεόλυση είναι σημαντική για την κυτταρική λειτουργία και την κυτταρική ομοιόσταση. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το μονοπάτι ουβικουιτίνης πρωτεασώματος είναι ο πιο σημαντικός μη λυσοσωματικός τρόπος αποδόμησης πρωτεϊνών. Σε φυσιολογικές συνθήκες τα λυσοσώματα αποδομούν τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση ή πινोकύτωση, ενώ το πρωτεάσωμα τις ενδοκυττάρειες (63.). Οι πρωτεΐνες συνδέονται με την αλυσίδα πολυουβικουιτίνης και αποδομούνται.

Το 26S πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη υπομονάδα (1500 - 2000 KDa) που υπάρχει τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων (64.). Ο καταλυτικός πυρήνας του συμπλέγματος αναφέρεται ως 20S πρωτεάσωμα είναι μια κυλινδρική δομή που αποτελείται από τέσσερις επταμερείς δακτύλιους με α και β υπομονάδες (εικόνα 4). Οι β υπομονάδες βρίσκονται πιο κεντρικά στον κύλινδρο, ενώ οι α υπομονάδες πιο περιφερικά. Η ικανότητα να αναγνωρίζει και να συνδέεται με τις αλυσίδες πολυουβικιτίνης επιτελείται από τις 19S υπομονάδες (PA700) που είναι συνδεδεμένες με το 20S πρωτεάσωμα καλύπτοντας τα άκρα του 26S κυλίνδρου. Αυτές οι υπομονάδες ξεπακετάρουν τα υποστρώματα, με την βοήθεια ενός δακτύλιου 6 πρωτεϊνών τις AAA+ (ATPases που συσχετίζονται

με αρκετές κυτταρικές δραστηριότητες). Στη συνέχεια τα αποσυνδέουν από την ουβικουτίνη και τα διοχετεύουν στο 26S πρωτεάσωμα για αποδόμηση. Για να μπορέσει η 19S υπομονάδα να ξεδιπλώσει τα υποστρώματα χρειάζεται ενέργεια με την μορφή ATP (65., 66., 67.).



Εικόνα 4. Το 26S πρωτεάσωμα που αποτελείται από την 20S υπομονάδα μια κυλινδρική δομή που αποτελείται από τέσσερις επταμερείς δακτύλιους με α και β υπομονάδες και την 19S υπομονάδα.

Γενικά το πρωτεάσωμα έχει σαν υποστρώματα πολλούς παράγοντες της μεταγραφής, ρυθμιστών της μεταγραφής, κινάσες, αναστολείς των κινασών, πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση, την απόπτωση και την ομοίωση. (πίνακας 4) (68- 94).

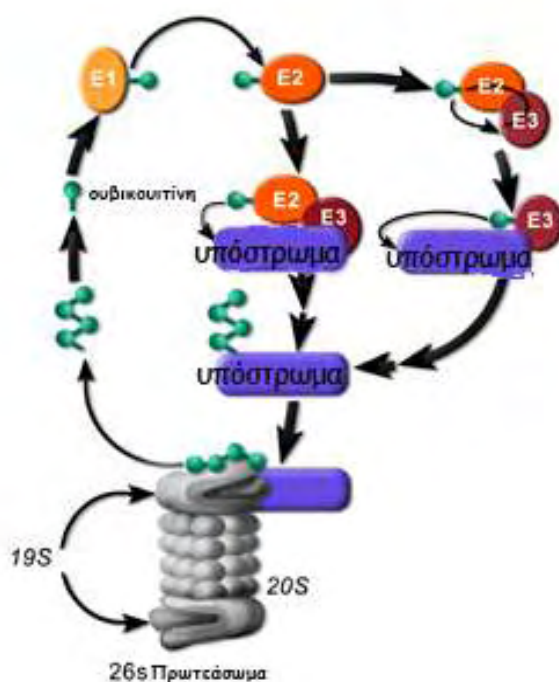
p21	Αναστολέας των CDK κινασών
c-myc	Παράγοντας μεταγραφής
C-jun, c-fos, fra-1	Υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα AP-1
p73	Ομόλογο του p53
E2F-1	Παράγοντας μεταγραφής
Iκ-Bα	Αναστολέας του NFκΒ

Smad4	Ρυθμιστής της διαμετάδοσης σήματος από τον TGFβ
HIF1	Παράγοντας μεταγραφής εμπλεκόμενος στην κυτταρική απάντηση στην υποξεία
p27	Αναστολέας των CDK κινασών
ASPP2/53BP2	Συμπαράγοντας του p53
PP2A	φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης
β-κατενίνη	Παράγοντας μεταγραφής και ρυθμιστής του κυτταρικού σκελετού
Emi1	Αναστολέας του APC (Anaphase promoting complex)
p53	Παράγοντας μεταγραφής
γ-κατενίνη	Ομόλογο της β-κατενίνης με ρόλο στις διακυτταρικές συνδέσεις και τα δεσμοσωμάτια
MATα2	Καταστολέας της μεταγραφής
EGFR, PDGFR	Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης
Mcl-1	Αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας του bcl-2
Επιθηλιακός διάυλος Na ⁺	Ρυθμιστής της συγκέντρωσης Na ⁺ που είναι μεταλλαγμένος στην κυστική ίνωση
Κυκλίνη A, Κυκλίνη B	Κυτταρική Ανάπτυξη
Cdc25	Φωσφατάση που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο
Κυκλίνη E, Κυκλίνη D, CDK4	Κυκλίνες και κινάση που τις ρυθμίζει
Τοποϊσομεράσες I και II	Ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και αποτελούν στόχους αντί-νεοπλασματικών

	φαρμάκων
Δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης	Ένζυμο της βιοσύνθεσης των πολυαμινών
Σταθμίνη	Ρυθμιστής του πολυμερισμού των μικροσωληναρίων του κυτταροσκελετού
APC	Ρυθμιστής της β-κατενίνης
Προλύλ-υδροξυλάσες 1 και 3	Ένζυμα που υδροξυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF
ERK3	Κινάση της οδού των MAPK
Rpn4	Πρωτεΐνη, μέρος του πρωτεασώματος
Akt	Κινάση που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση
Twist	Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας bHLH (basic helix-loop-helix)
DCC	Διαμεμβρανικός υποδοχέας της νετρίνης
PIN2/TRF1	Ρυθμιστής του μήκους των τελομερείων και του κυτταρικού κύκλου
Υποδοχέας της 1,4,5- τριφωσφορικής ινοσιτόλης	Υποδοχέας του ενδοπλασματικού δικτύου που ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις Ca^{++}
FoxO	Παράγοντας μεταγραφής, ρυθμιστής της β-κατενίνης
ERa	Παράγοντας μεταγραφής του τύπου των πυρηνικών υποδοχέων
RhoA	GTP-άση

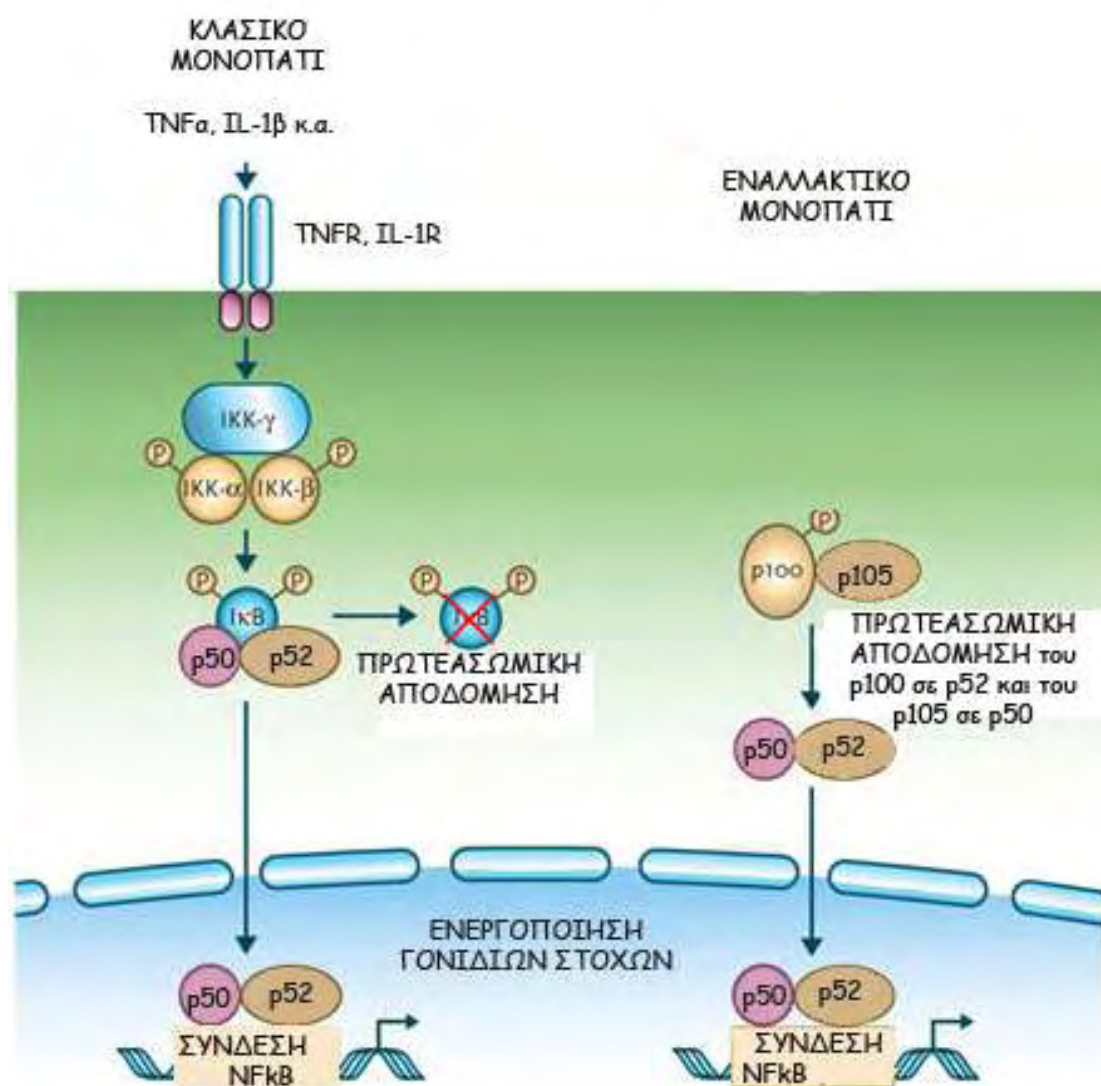
Πίνακας 4. Διάφορες πρωτεΐνες που έχει βρεθεί ότι είναι υπόστρωμα για το σύστημα του πρωτεασώματος-ουβικουιτίνης.

Η ουβικιτινοποίηση είναι μια αντιστρέψιμος διαδικασία που καταλύεται σε τρία ενζυμικά στάδια (95.). Στο πρώτο στάδιο η ουβικουιτίνη ενεργοποιείται από τα ένζυμα E1 (ubiquitin - activating enzyme) με μια αντίδραση που γίνεται με τη βοήθεια ATP μεταξύ της κυστεΐνης και των ένζυμων. Στο δεύτερο στάδιο, η ενεργοποιημένη ουβικουιτίνη συνδέεται με μια δεύτερη κατηγορία ένζυμων τα E2 (ubiquitin - conjugating enzyme), έχουν περιγραφεί 50 διαφορετικά τέτοια ένζυμα. Τέλος μια ουβικιτινοποιημένη πρωτεϊνική λιγκάση (E3) μεταφέρει την ενεργοποιημένη ουβικουιτίνη στην πρωτεΐνη στόχο (εικόνα 5). Για να γίνει αυτό η ε - αμίνη μιας λυσίνης του μορίου της πρωτεΐνης συνδέεται στην καρβοξυτελική γλυκίνη της ουβικουιτίνης (96). Η λιγκάση που καταλύει αυτήν την αντίδραση διακρίνεται σε τρεις οικογένειες. Αυτές που έχουν τομείς HECT (Homologous to E6 - associated protein C - terminus), αυτές με τομείς U - box (έχει περιγραφεί και στους μύκητες) και αυτές με τομείς RING (Really Interesting New Gene) (97). Η ουβικουιτίνη περιέχει επτά λυσίνες που μπορούν να συνδεθούν με άλλες ουβικουιτίνες και να σχηματίσουν μια αλυσίδα πολυουβικουιτίνης. Το πρωτεάσωμα με τη σειρά του συνδέεται με την ουβικουιτινική αλυσίδα και την αποδομεί με την προϋπόθεση ότι αυτή αποτελείται από τουλάχιστον 4 μόρια ουβικουιτίνης (98). Από την άλλη, ορισμένες φορές η σύνδεση της ουβικουιτίνης με τις πρωτεΐνες στόχους δεν οδηγεί στη αποδόμηση όταν η σύνδεση με τις πρωτεΐνες γίνει μέσω άλλων λυσίνων, όπως η K29 και η K63. Τότε η σύνδεση συντελεί στην επιδιόρθωση του DNA, στην ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών κ.α. (99-100)



Εικόνα 5. Η γενική αλληλουχία των ενζυμικών αντιδράσεων που χρειάζονται για να συνδεθεί μια πρωτεΐνη υπόστρωμα του πρωτεασώματος με την ουβικουιτίνη.

Η συνδυασμένη αποδόμηση των πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής από το πρωτεάσωμα ελέγχει πολλές σημαντικές διαδικασίες. Η ελεγχόμενη αποδόμηση των κυκλινών και των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες αναστολέων των κινασών είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη (101-103). Το πρωτεάσωμα ελέγχει την έκφραση των γονιδίων αποδομώντας μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το NF-κB, p53, c-Jun, c-Myc, c-Fos, HIF1α και το MATα2 (104-105). Ίσως αυτό που έχει χαρακτηριστεί καλύτερα είναι το NF-κB. Το ενεργό NF-κB είναι ένα διμερές που εντοπίζεται στον πυρήνα. Το πρωτεάσωμα είναι υπεύθυνο τόσο για την παραγωγή του από τις πρόδρομες μορφές όσο και για την ενεργοποίηση του αποδομώντας τον αναστολέα του το IκB (εικόνα 6) (106)



Εικόνα 6 Η ενεργοποίηση του NFκB με τη βοήθεια του πρωτεασώματος με το κλασικό και εναλλακτικό μονοπάτι.

Η απόπτωση έχει βρεθεί ότι δε λειτουργεί σωστά σε πολλές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η απόπτωση γενικά συντελείται με δυο μηχανισμούς που ονομάζονται εξωγενής και ενδογενής (107). Όμως και τα δυο μοριακά μονοπάτια σε κάποιο σημείο εμπλέκουν την ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεασών, τις κασπάσες, οι οποίες καταστρέφουν το κύτταρο με το να αποδομούν ρυθμιστικές και δομικές πρωτεΐνες (108-110). Στον πρώτο μηχανισμό, η σύνδεση με τους υποδοχείς θανάτου (TNF) της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην ενεργοποίηση των

κασπασών και κυρίως της κασπάσης - 8. Αυτές με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις εκτελεστικές κασπάσες 3 και 7 (111). Στο δεύτερο μηχανισμό, διάφορα μιτοχονδριακά σήματα οδηγούν στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών *apaf - 1*, *Smac / Diablo* και του κυτοχρώματος *c*. Οι πρωτεΐνες αυτές μπλοκάρουν τους αναστολείς απόπτωσης IAPs και έτσι ενεργοποιούν την κασπάση 9. Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες 3 και 7 (κοινό στάδιο των δυο μηχανισμών). Στη συνέχεια οι εκτελεστικές κασπάσες που ενεργοποιούνται είτε με τον ένα μηχανισμό είτε με τον άλλο πρωτολύνουν ένα σημαντικό αριθμό πρωτεϊνών οδηγώντας στη κυτταρική απόπτωση. Από την άλλη, το πρωτεάσωμα εμπλέκεται με πολλές από τις κύριες πρωτεΐνες απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *bcl - 2*, *Bax*, *Bad*, *Bid*, *Bik* και οι *Smac / Diablo* και οι αναστολείς της απόπτωσης IAPs είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος. Οι τομείς BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeats) που είναι αλληλουχίες 65 αμινοξέων πλούσιων σε κυστεΐνη, αποτελούν προϋπόθεση για να χαρακτηρισθεί μια πρωτεΐνη IAPs και είναι αυτοί που αλληλεπιδρούν με τις κασπάσες οδηγώντας στην αναστολή τους (112). Τα IAPs επίσης έχουν και τομείς RING, τομείς που συναντάμε σε μια οικογένεια των E3 λιγκασών. Έτσι έχουν την ενζυμική ικανότητα να μεταφέρουν την ουβικουιτίνη από τα E2 ένζυμα σύζευξης στην πρωτεΐνη στόχο (113-114). Συμπερασματικά, οι IAPs ελέγχουν την απόπτωση και εξουδετερώνουν φυσιολογικά σήματα που τυχαία απελευθερώνονται, όπως είναι το *Smac / Diablo* και ο AIF (Apoptosis Inducing Factor), που απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο, και θα οδηγούσαν στη έναρξη της κυτταρικής απόπτωσης χωρίς ουσιαστικό λόγο (115-116). Τα IAPs αλληλεπιδρούν και με το *Smac / Diablo* και με τις κασπάσες μέσω ενός τομέα BIR των IAPs και μια περιοχή 4 αμινοξέων, τομέας IBM (IAP - binding motif), που έχει το *Smac / Diablo* και μια ομόλογης περιοχής που συναντάμε στις κασπάσες (117-118). Όμως, όταν είτε από την εξωγενή είτε από την ενδογενή οδό υπάρχουν τα κατάλληλα σήματα ώστε το κύτταρο να πρέπει να οδηγηθεί στην απόπτωση, ο μηχανισμός ασφαλείας των IAPs αναστέλλεται (119). Τέλος, υπάρχει και μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα μικροσώματα που είναι συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου και έχει την ικανότητα, εφόσον αποδεσμευτεί να

αντιδράσει με τα IAPs και να μπλοκάρει τη σύνδεση τους με τις κασπάσες (120).

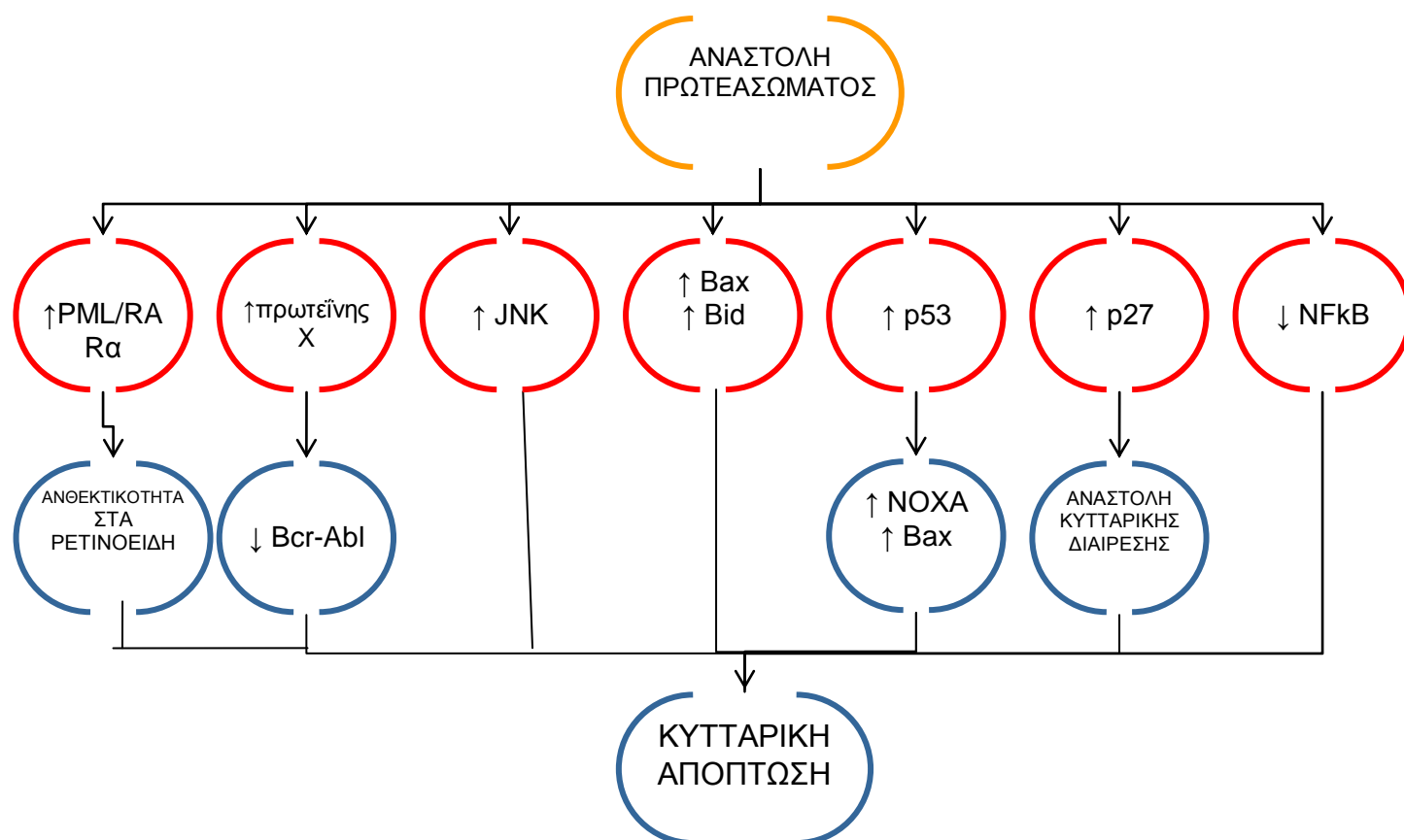
Από την άλλη οι κασπάσες μπορούν και να απενεργοποιήσουν το πρωτεάσωμα (121-122). Με το να αποδομήσουν τις υπομονάδες Rpt5, Rpn10 που συμμετέχουν στην αναγνώριση του υποστρώματος και της Rpn2 που συμμετέχει στη διατήρηση της συνοχής του 19 S πρωτεασώματος, το πρωτεάσωμα χάνει τη δράση της πεπτιδουλ - γλουτάμυλ - πρωτεάσης και χυμοτρυψίνης. Δηλαδή, στους ρόλους των ενεργοποιημένων εκτελεστικών κασπασών είναι και η αποδόμηση του πρωτεασώματος. Έτσι όμως, καταδεικνύεται και ο σημαντικός ρόλος που έχει το πρωτεάσωμα στην κυτταρική επιβίωση, καθώς η αναστολή της δράσης του είναι απαραίτητη για την κυτταρική απόπτωση (123).

Το σύστημα ουβικουιτίνης - πρωτεασώματος εμπλέκεται και άμεσα με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (124). Ο ρόλος αυτός του πρωτεασώματος επιτυγχάνεται χάρη σε δυο τύπους E3 λιγκασών, της APC/C (Anaphase Promoting Complex / Cyclosome) και της κατηγορίας SCF (Skp1/Cullin/ F- box protein) (125) Ως γνωστό στο τέλος της μιτωτικής μετάφασης όλες οι αδερφές χρωματίδες συνδέονται στο κεντρόσωμα με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Τότε, οι αδερφές χρωματίδες αποχωρίζονται, ώστε κάθε αδερφή χρωματίδα να μετακινηθεί στους αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και να εισέλθει το κύτταρο στην προτελευταία φάση του κυτταρικού κύκλου που είναι η ανάφαση. Οι αδερφές χρωματίδες παραμένουν ενωμένες χάρη στις πρωτεΐνες κοεζίνες. Η πρωτεάση που είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση τους και επομένως για την απελευθέρωση των αδερφών χρωματίδων στο τέλος της μετάφασης είναι μια πρωτεάση, η σεπεράση. Η σεκιουρίνη λειτουργεί σαν αναστολέας της πρωτεάσης αυτής. Στο τέλος της μετάφασης η E3 λιγκάση APC/C ενεργοποιείται και συνδέει την ουβικουιτίνη με την σεκιουρίνη και προωθείται για αποδόμηση. Έτσι η σεπεράση ενεργοποιείται και οι αδερφές χρωματίδες αποχωρίζονται (126). Επίσης η κυκλίνη B και η cdc2, που είναι δυο από τους πιο κύριους παράγοντες που προάγουν την μίτωση (MPF - Mitosis Promoting Factor), φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες ώστε το κύτταρο να περάσει από τη ενδιάμεση φάση, G₁, στη φάση G₂. Ο MPF αποτελεί και αυτός υπόστρωμα σύνδεσης με την ουβικουιτίνη της APC/C λιγκάσης (127).

Όταν φτάσει ο κυτταρικός κύκλος στο τέλος η κυκλίνη B ουβικουτινώνεται και αποδομείται επομένως από το πρωτεάσωμα, ώστε το κύτταρο να παραμείνει στην ενδιάμεση φάση G₁.

Όπως υπάρχουν πρωτεΐνες που συνδέουν την ουβικουτίνη με τις πρωτεΐνες υπάρχουν και πρωτεΐνες που επιτελούν τον ακριβώς αντίθετο ρόλο. Τα ανθρώπινα κύτταρα διαθέτουν περισσότερα από 70 τέτοια ένζυμα ακόμα και πάνω στο ίδιο το πρωτεάσωμα (1288-129). Έτσι υπάρχει το ένζυμο HAUSP (Herpesvirus - associated ubiquitin specific protease) το οποίο αποσυνδέει την ουβικουτίνη από το p53 (130). Επίσης υπάρχουν και παρόμοια αποδεδμευτικά ένζυμα (υποομάδες) ενσωματωμένα στο πρωτεάσωμα (131-132) και οι πρωτεΐνες αυτές εξυπηρετούν στην ανακύκλωση της ουβικουτίνης, που αφού επιτελέσει το ρόλο της ξαναχρησιμοποιείται για να σημάνει άλλες πρωτεΐνες.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων διάφοροι αναστολείς του πρωτεασώματος προάγουν την απόπτωση (εικόνα 7). Γενικά οι αναστολείς του πρωτεασώματος οδηγούν στην κυτταρική απόπτωση μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται σε κυτταρική ανάπτυξη (133). Το p27 και το p21 είναι δυο πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο με το να αναστέλλουν τις κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες και οδηγούν στην κυτταρική ανάπτυξη. Τα κυτταρικά επίπεδα και των δυο πρωτεϊνών ελέγχονται από το σύστημα ουβικουτίνης - πρωτεασώματος (134.) και επομένως η αναστολή του επιτρέπει το κύτταρο να ελέγξει τον κυτταρικό κύκλο.



Εικόνα 7. Μηχανισμοί που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση μετά την χορήγηση αναστολέων του πρωτεασώματος. Είναι πιθανό σε άλλο τύπου κύτταρα οι αναστολείς να οδηγούν σε απόπτωση με διαφορετικούς μηχανισμούς.

Η αναστολή του πρωτεασώματος αυξάνει την δραστικότητα του p53

Το p53 είναι μια πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε στα μέσα του προηγούμενου αιώνα (135-136). Σε πολλούς καρκινικούς τύπους συχνά συναντάμε μεταλλάξεις του p53 (137). Το p53 είναι μια πρωτεΐνη πολύ σημαντική που προλαμβάνει την ανώμαλη κυτταρική ανάπτυξη και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού γονιδιώματος σε συνθήκες κυτταρικού στρες (138-139). Πάρα ταύτα είναι αναλώσιμο όταν το κύτταρο αναπτύσσεται σε φυσιολογικές συνθήκες (140). Σε συνθήκες φυσιολογικής ανάπτυξης επειδή δεν είναι τόσο σημαντικό, τα επίπεδα του είναι χαμηλά λόγω της γρήγορης αποδόμησης του. Όταν το κύτταρο όμως εκτεθεί σε συνθήκες υποξίας, νουκλεοτιδικών απωλειών, υπερέκφραση

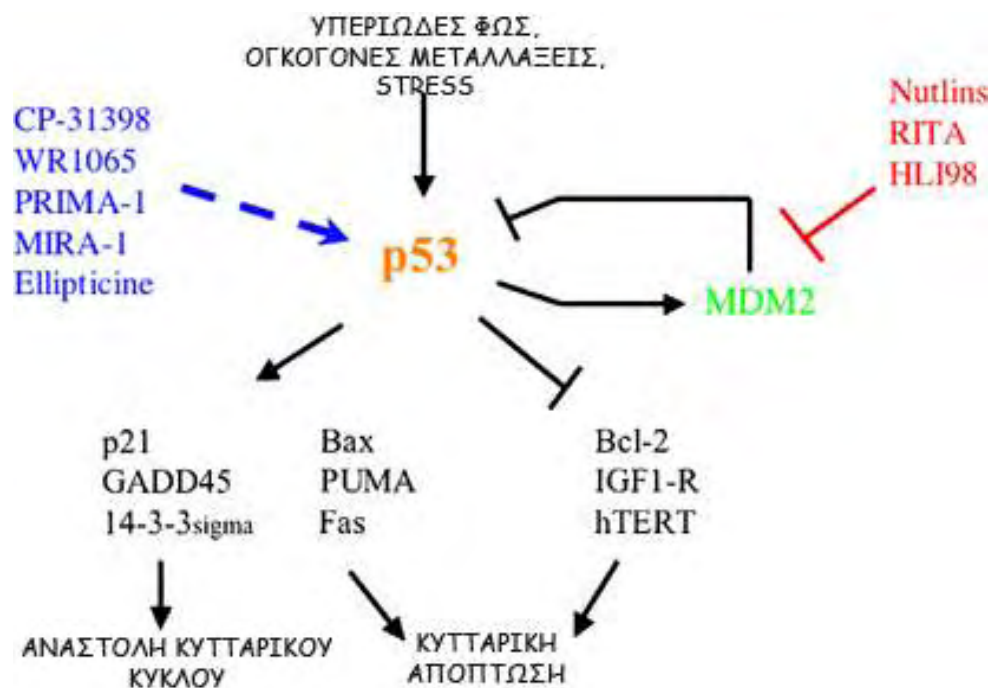
ογκογονιδίων τότε το p53 υφίσταται μετά - μεταφραστικές τροποποιήσεις, με διάφορες κινάσες όπως η ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), η GSK3β, το p38 και η JNK. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη σύνδεση του με το DNA και την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του (138, 139). Τα γονίδια στόχοι ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών διαδικασιών ανάμεσα στις οποίες είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου και η κυτταρική απόπτωση (Πίνακας 5) (141-144) .

Η ρύθμιση του p53 είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει μηχανισμούς μετά - μεταφραστικούς, φωσφορυλιώσεις, ακετυλιώσεις, ουβικουιτινώσεις κ.α. Το mdm2 (murine double minute 2) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής σταθερότητας του p53 και της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Το mdm2 είναι μια E3 λιγκάση της ουβικουιτίνης που σε συνεργασία με την jun κινάση οδηγεί στην πρωτεασωματική αποδόμηση του p53 με τη σύνδεση του με την ουβικουιτίνη. Έχει αναφερθεί ότι για την αποδόμηση του p53 είναι απαραίτητη η μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, δηλαδή τα κυτταροπλασματικό και όχι τα πυρηνικό πρωτεάσωμα είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του. Ο αναστολέας του mdm2 από την άλλη, είναι η πρωτεΐνη p14 που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (9p). Το p53 συνδέεται στο DNA μέσω ενός τετραμερούς σε μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία RRCC (A / T) (T / A) GYYY (σαν R συμβολίζονται οι πουρίνες και σαν Y οι πυριμιδίνες). Το καρβοξυτελικό άκρο του p53 μέσω τριών λυσινών συνδέεται μη ειδικά με το DNA, γεγονός που προλαμβάνεται από το p300 που ακετυλιώνει αυτές τις λυσίνες και επομένως τη φυσιολογική σύνδεση του p53. Ο p300 βοηθά και στη σύνδεση του p53 με την ουβικουιτίνη και στην ακόλουθη αποδόμηση του, εφόσον φυσικά πρώτα έχει δράσει το mdm2. (145-149)

Το p53 συμμετέχει και στον ενδογενή, που αποτελεί κύριο ρυθμιστικό στοιχείο, αλλά και στον εξωγενή μηχανισμό απόπτωσης, που απλά συμμετέχει. Το p53 μπορεί να διεγείρει την κυτταρική απόπτωση της εξωγενούς οδού με την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπως είναι το Fas, το DR4 και το DR5. Το DR4 και το DR5 ρυθμίζονται άμεσα από το p53 και μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση ή να ενισχύσουν την κυτταρική απόπτωση που

οφείλεται είτε στο TRAIL είτε σε χημειοθεραπευτικά μέσα (150-151). Εάν και το p53 μπορεί να ενεργοποιήσει το Fas, η παραγωγή του Fas προκαλείται από την καταστροφή του DNA και ανεξάρτητα από το p53 (152-153). Στον ενδογενή μηχανισμό, έχει βρεθεί ότι αρκετές πρωτεΐνες της οικογένειας του Bcl - 2, όπως το Bax, και άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες ρυθμίζονται από το p53 (154). Το p53 ελέγχει την έκφραση πρωτεϊνών που εμφανίζουν BH3 δομές και συμμετέχουν στην αύξηση του BAX / BAK. Επίσης, μετά από την καταστροφή του DNA ενεργοποιεί το Noxa και το PUMA το οποίο με τη σειρά του οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση πολύ γρήγορα, σε λίγες ώρες από την ενεργοποίησή του (155-156).

Η σύνδεση του p53 στο DNA ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό βοηθητικών παραγόντων της μεταγραφής (co - factors). Η μετά - μεταφραστικές τροποποιήσεις του p53 είναι ανάλογες με το ερέθισμα που οδήγησαν στην ενεργοποίησή του. Οι βοηθητικοί παράγοντες από την άλλη συνδέονται με το συνδεδεμένο με το DNA p53 ανάλογα με τις μετά - μεταφραστικές τροποποιήσεις που αυτό έχει υποστεί. Συνεπώς, ένα κύτταρο ανάλογα με το αίτιο ενεργοποίησης του μπορεί να υποστεί απόπτωση ή να ανασταλεί ο κυτταρικός του κύκλος. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of p53), ASPP1 και ASPP / Bbp ενεργοποιούν τα προαποπτωτικά γονίδια Bax και PIG3, αλλά όχι το mdm2, την κυκλίνη G ή το p21 (157-158). Παρομοίως, η πρωτεΐνη JMY, το Stat -1 σε συνεργασία με το p53 και οι πρωτεΐνες της οικογένειας του p53, p63 και p73 οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του Bax, του PUMA, του Noxa, του Fas, του PERP και του DR 4/5 (159-160). Αντιθέτως το c - myc, το p300 και το hDaxx μέσω του p21, του Gadd45 κ.α. οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου (161.). Οι στόχοι του p53 μπορούν να διακριθούν σε ξεχωριστές κατηγορίες με βάση τη δράση τους σε αυτά τα μοριακά μονοπάτια. (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Η ρύθμιση και απεικόνιση σχηματικά της ρύθμισης και λειτουργίας του p53. Το p53 σε αντίδραση με διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, μετάλλαξη ενεργοποιείται και οδηγεί είτε στο μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων πρωτεϊνών, όπως το p21, είτε στην κυτταρική απόπτωση ενεργοποιώντας διάφορες πρωτεΐνες, όπως το Bad.

Η αναστολή του 26S πρωτεασώματος έχει σαν αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση των επιπέδων του p53 (162-164) και την παραγωγή των πρωτεϊνών στόχων του p53 όπως το p21, το mdm2 και το Bax (165). Επιπρόσθετα ορισμένοι κυτταρικοί τύποι έχει δειχτεί ότι υφίστανται απόπτωση μετά τη χορήγηση αναστολέων του πρωτεασώματος (166-167) μέσω του p53 (168). Παρόλο αυτά η αύξηση των επιπέδων του p21, του mdm2 και του Bax δεν οφείλεται αποκλειστικά στο p53 (169-170). Ένας πιθανός μηχανισμός είναι ότι αυτές οι πρωτεΐνες αποδομούνται από το σύστημα ουβικουΐνης πρωτεασώματος και η πιθανή αναστολή του έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής τους και επομένως των επιπέδων τους (171).

Η πρωτεΐνη p21 ανήκει στην οικογένεια Kip/Cip των αναστολέων των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες CDKs (cyclin-dependent kinase). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εντοπίζεται στο 21 χρωμόσωμα (6p21). Έχει αποδειχτεί ότι το p21 αναστέλλει την δραστικότητα πολλών μελών των κινασών CDKs. Σε φυσιολογικά κύτταρα το p21 σχηματίζει τετραμερή σύμπλοκα με την CDK, την κυκλίνη και το PCNA (proliferative cell nuclear antigen). Μάλιστα, είναι ενδιαφέρον ότι ανάλογα με τη στοιχειομετρία

του cyclin/CDK/p21 σύμπλοκου, μπορεί να λειτουργήσει σαν παράγοντας που διεγείρει τις κινάσες ή τις αναστέλλει (172). Εκτός από την αναστολή των κινασών εμπλέκεται και με το σύμπλοκο PCNA (μεταγραφικό πυρηνικό αντιγόνο) - DNA πολυμεράση δ και επηρεάζει την επιδιόρθωση και την αντιγραφή του DNA (173). Όταν υπάρχουν λάθη στο DNA το p21 μπλοκάρει την κυτταρική διαίρεση και το κύτταρο παραμένει στην G1 φάση. Η έκφραση του ελέγχεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (πίνακας 5) (174). Επιπρόσθετα το p53 και το p21 αποτελούν πρωτεΐνες που ελέγχουν εάν το κύτταρο θα εισέλθει στην G2 φάση και επομένως εάν θα διαιρεθεί (175). Επιπλέον το p21 ενεργοποιείται και ανεξάρτητα από το p53 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης (176). Το p21 επιδρά και σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η κυτταρική γήρανση και απόπτωση. Παρόλο αυτά ο ρόλος του p21 στη απόπτωση παραμένει αντιφατικός (177).

Η σημασία του p21 στον καρκίνο του προστάτη είναι προς έρευνα, καθώς οι μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί στο p21, παρά τις μεταλλάξεις που παρατηρούνται στο γονίδιο του p53, είναι ελάχιστες (178). Στα προστατικά καρκινικά κύτταρα το p21 έχει μια ανασταλτική επίδραση στην κυτταρική αύξηση, αλλά σε κλινικές μελέτες ο ρόλος του p21 δεν έχει αποσαφηνιστεί (179). Επίσης η σχέση του p21 και του p53 είναι προς συζήτηση. Μια σαφή συσχέτιση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών έχει βρεθεί σε καρκίνους του μαστού, αλλά όχι του παγκρέατος. Η σχέση του p21 και του p53 φαίνεται να είναι σύνθετη και έχει να κάνει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Ο Aaltoma et al. δε βρήκε σύνδεση του p21 και του καρκίνου του προστάτη (180). Ο Osman et al. βρήκε σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης του mdm2 και του p21. Φαίνεται ότι η ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη έχει να κάνει με την απενεργοποίηση του p53 λόγω της υπερέκφρασης του mdm2 και η απενεργοποίηση του p21 γίνεται μέσω ενός ανεξάρτητου με το p53 μονοπατιού (181.).

ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ ΤΟΥ p53	
Bad	Μέλη της οικογένειας του bcl - 2 που προάγουν την απόπτωση
Bax	Μέλη της οικογένειας του bcl - 2 που προάγουν την απόπτωση

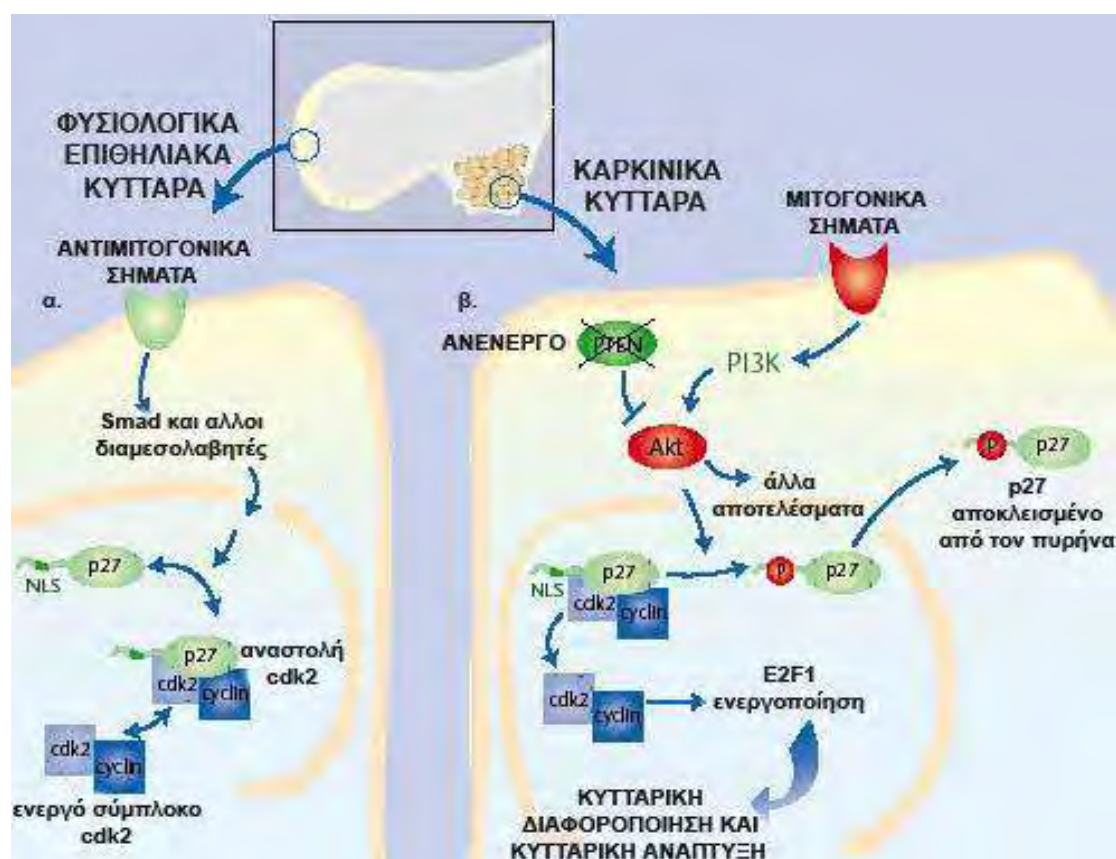
Puma	Μέλη της οικογένειας του bcl - 2 που προάγουν την απόπτωση
Noxa	Μέλη της οικογένειας του bcl - 2 που προάγουν την απόπτωση
Fas	Υποδοχείς θανάτου (Death Receptors)
DR4	Υποδοχείς θανάτου (Death Receptors)
DR5	Υποδοχείς θανάτου (Death Receptors)
PIDD	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τις κασπάσες
p21	Αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs)
14 - 3 - 3σ	Ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου
Gadd45	Ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου
Siah 1	E3 λιγκάση
mdm2	E3 λιγκάση

Πίνακας 5. Γονίδια στόχοι του p53

Η αναστολή του πρωτεασώματος και του μονοπατιού PI3k/Akt αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27

Η πρωτεΐνη p27^{kip1} (p27) ανήκει στην CIP/KIP οικογένεια των κινασών που εξαρτώνται από κινάσες (CDKs). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 (12p13) (182). Η έκφραση του γονιδίου του p27 ελέγχεται από συγκεκριμένους αναπτυξιακούς παράγοντες (π.χ. TGF-beta, IL-2, cAMP κ.α.). Η έκφραση του p27 είναι μεγαλύτερη σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και σε κύτταρα που διαφοροποιούνται. Η πρωτεΐνη p27 συσσωρεύεται στη G1 φάση της μεσόφασης και εμποδίζει το κύτταρο να διαιρεθεί. Όταν στο κύτταρο επιδρούν αντί-μιτογονικά σήματα, όπως το TGFβ και η IL6, ενεργοποιείται το αποθηκευμένο p27 και συνδέεται με το σύμπλοκο cdk2, μια πυρηνική πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες της S φάσης της μεσόφασης οδηγώντας το κύτταρο στην κυτταρική διαίρεση (183). Σε περιόδους κυτταρικής αύξησης το p27 αποκλείεται από τον πυρήνα, αποδομείται και δεν αναστέλλει το σύμπλοκο κυκλίνη E/cdk2 (εικόνα 9). Το Akt μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από το μονοπάτι της PI3k (εικόνα 9)

εμποδίζει την είσοδο του p27 στον πυρήνα (184-186). Το Akt μπορεί να φωσφορυλιώσει άμεσα το p27 και επομένως να εμποδίσει την είσοδο του στον πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο που κωδικοποιεί το p27 είναι γονίδιο στόχος των FOXO μεταγραφικών παραγόντων (187-189). Η φωσφορυλίωση τους συντελείται από το ενεργοποιημένο Akt και οδηγεί στην απενεργοποίησή τους και στον κυτταροπλασματικό εγκλωβισμό τους (190-191). Ένα δεύτερο μονοπάτι που έχει προταθεί για την αποδόμηση του p27 είναι μέσω Skp-2 εξαρτώμενη ουβικιτινοποίηση (192-193). Το Skp-2 είναι το κατάλληλο μόριο για την αποδόμηση του p27, εφόσον έχει φωσφορυλιωθεί από τη Thr187 (194). Το PTEN/PI3k μπορεί να ρυθμίζει την αποδόμηση του μέσω της ουβικιτινοποίησης του (195-197). Εκτός όμως από το ρόλο του να εμποδίζει την κυτταρική διαίρεση, το p27 έχει και άλλους ρόλους όπως το να λειτουργεί σαν επικουρικός παράγοντας της απόπτωσης, να επηρεάζει την χημειοανθεκτικότητα των συμπαγών όγκων κ.α.



Εικόνα 9 Το p27 είναι μια πρωτεΐνη καταστολέας του καρκίνου. α. Σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, διάφορα αντί-μιτογονικά σήματα, όπως το TGFβ και η IL6 αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη. Ενεργοποιούν το p27 που εισέρχεται στον πυρήνα και μπλοκάρει το σύμπλοκο cdk, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων της S φάσης και παγιδεύοντας το κύτταρο στην G1 φάση

του κυτταρικού κύκλου. β. Σε πολλά καρκινικά κύτταρα το μονοπάτι του PI3K/Akt ενεργοποιείται μέσω του μπλοκαρίσματος του PTEN. Αυτό με τη σειρά του φωσφορυλιώνει το p27 εμποδίζοντας το να εισέλθει στον πυρήνα και να μπλοκάρει τις CDKs κινάσες. Οι CDKs ενεργοποιούν το E2F και το κύτταρο οδηγείται στην κυτταρική διαίρεση.

Αποσαφηνίζοντας το ρόλο του p27 σαν αναστολέας των CDK σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα έχει δείχτεί ότι η απώλεια της πρωτεϊνικής έκφρασης του έχει σαν αποτέλεσμα να αναπτύσσεται και να εξελίσσεται ο καρκίνος πιο εύκολα. Η απουσία του p27 στους καρκίνους έχει συσχετισθεί με μειωμένη πρόγνωση εάν και παραδόξως λίγες μεταλλάξεις του p27 έχουν περιγραφεί γενικά σε διάφορους τύπους καρκίνου (198). Μειωμένα επίπεδα p27 στους όγκους οφείλονται κυρίως σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο πιθανώς λόγω αυξημένης αποδόμησης του από το μονοπάτι ουβικουιτίνης / πρωτεασώματος. Συνεπώς η αναστολή του πρωτεασώματος έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p27 που αποτελεί υπόστρωμα του (πίνακας 4). Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός που συμβάλει στην αποδόμηση του p27 είναι και η φωσφορυλίωση του. Ανάμεσα γενικά σε όλους τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων του p27 είναι η μεθυλίωση του και η ρύθμιση της πρωτεϊνικής του σύνθεσης σε διάφορα επίπεδα (σταθερότητα mRNA, μετατόπιση του στο κυτταρόπλασμα και μετάφραση του) (199).

Η πραγματική διαγνωστική και προγνωστική σημασία της έκφρασης του p27 σε διάφορους καρκίνους έχει γίνει πρόσφατα αντικείμενο μελέτης. In vivo μελέτες έχουν δείξει χαμηλή έκφραση του p27 σε πιο επιθετικούς καρκίνους και αρκετές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τη σημασία του p27 σαν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό αλλά και διαγνωστικό δείκτη σε ένα μεγάλο φάσμα καρκίνων περιλαμβάνοντας το καρκίνωμα του μαστού, καρκίνο του παχέως εντέρου, αδеноκαρκίνωμα του προστάτη, μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, κακοήθες μελάνωμα, αδеноκαρκίνωμα του οισοφάγου και καρκίνων των ενδοκρινών αδένων (200-201). Η απενεργοποίηση του γονιδίου του p27 λόγω μεταλλάξεων στον καρκίνο του προστάτη δεν είναι συχνή. Εάν και έχουν παρατηρηθεί, μεθυλιώσεις CpG, αυτές δεν είναι συχνές και δε φαίνεται να είναι ο κυρίως μηχανισμός για τη μείωση των επιπέδων του p27 (202). Άλλες μεταλλάξεις για το p27 δεν έχουν βρεθεί (203).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναλύουν την έκφραση του p27 στα αδενοκαρκινώματα του προστάτη. Ο Guo et al. για παράδειγμα πρώτος έδειξε τη συσχέτιση μεταξύ της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης και της αυξημένης διαφοροποίησης και επιθετικότητας του καρκίνου (204). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έχουν επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες οι οποίες σύνδεσαν εμμέσως την έκφραση του p27 με αυξημένο Gleason score, με την πιθανότητα μετάστασης και την ανευπλοειδία (205-206). Επίσης έχει δείχτει ότι η χαμηλή έκφραση του p27 είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τη πρόβλεψη της θεραπείας που εφαρμόζεται στον καρκίνο και τις πιθανότητες υποτροπής και βιωσιμότητας (207-208). Ο Codon-Cardo et al. βρήκαν μηδαμινή έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του p27 σε καλοήγη υπερπλαστικά κύτταρα προστάτη, δεδομένα που καταδεικνύουν ότι η BPH (benign prostatic hyperplasia) δεν είναι προάγγελος για τον καρκίνο του προστάτη (209).

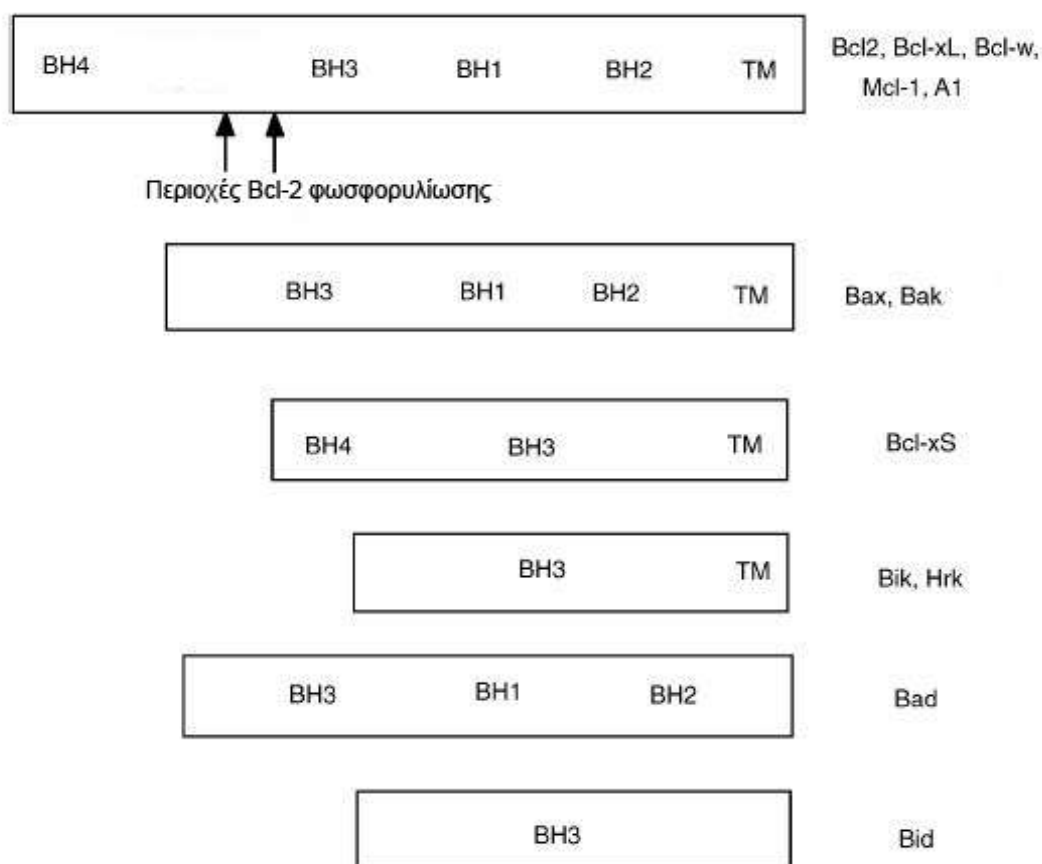
Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl και η σχέση τους με τα κυτταρικά μονοπάτια στον καρκίνο του προστάτη.

Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 θεωρούνται κλειδιά στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης (210). Σε πολλές *in vitro* μελέτες τονίστηκε ο αποπτωτικός ρόλος των Bcl-2 πρωτεϊνών (211-216). Η πρωτεΐνη Bcl-2 ανακαλύφθηκε σε μελέτες των γνωστών μετατοπίσεων που παρατηρούνται στα μη Hodgkin λεμφώματα (t 14;18) αλλά και στα θυλακιώδη λεμφώματα τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση του γονιδίου Bcl-2 και ανθεκτικότητα στην απόπτωση (217-219). Διάφορα γονίδια έχουν αναγνωρισθεί ότι ανήκουν στην οικογένεια με βάση κατά πόσο είναι ανάλογα με το Bcl-2 (εικόνα 10). Τα προ-αποπτωτικά και τα αποπτωτικά μέλη σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή που με τη σειρά τους ρυθμίζουν εάν το κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση ή όχι. Για παράδειγμα το Bcl-2 μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή με άλλα μόρια Bcl-2 ή να σχηματίσει ετεροδιμερή με το Bax. (220.) Το Bcl-2 γενικά προάγει την κυτταρική ανάπτυξη εμποδίζοντας την απόπτωση.

ΠΥΘΜΙΣΤΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	Βιβλιογραφία
Αναστολείς κυτταρικού θανάτου	
Bcl-2	Khurram et al. (221.)
Bcl-X _L	Boise et al. (222.)
Mcl-1	Zhou et al. (223.)
Bcl-w	Gibson et al. (224.)
A1	Lin et al. (225.)
Προαγωγείς κυτταρικού θανάτου	
Bax	Oltvai et al. (226.)
Bak	Chittenden et al. (227.)
Bad	Yang et al. (228.)
Bcl-X _S	Boise et al. (222)
Bik	Boyd et al. (229.)
Bid	Wang et al. (230.)
Harakiri	Inohara et Al (231.)

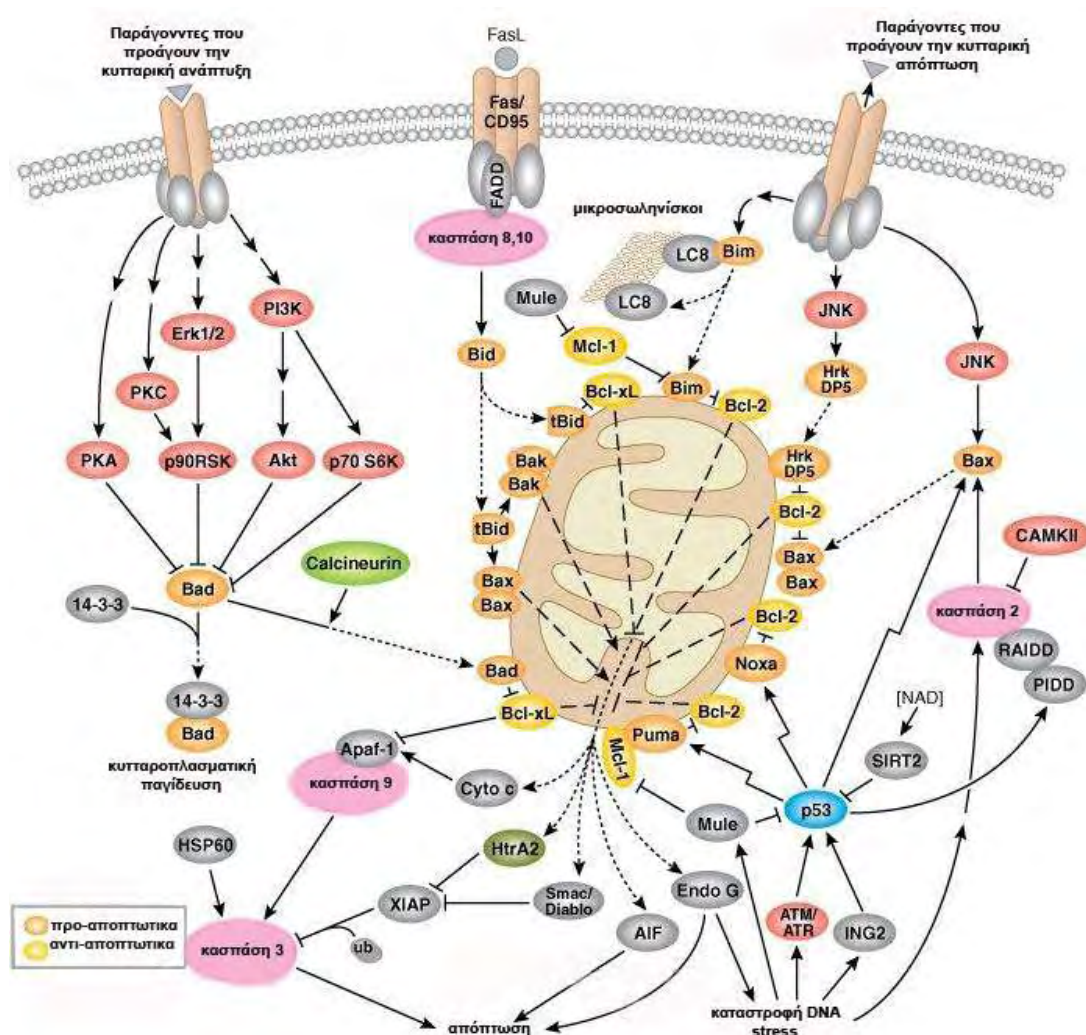
Πίνακας 6. Πρωτεΐνες της οικογένειας του Bcl-2

Η ανάλυση ακολουθιών στις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 έχει βρει τέσσερις καλά διατηρούμενες περιοχές (domains) που πρόσφατα έχουν ονομαστεί BH1 έως και BH4 (το BH συμβολίζει ότι είναι ανάλογη για το Bcl-2 περιοχή), όπως προτάθηκε από τον Oltvai et al. (226). Αυτές οι δομές έχουν μεγάλη σημασία για τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, καθορίζοντας τον τρόπο δράση τους είτε ως αναστολείς είτε ως επαγωγείς του κυτταρικού θανάτου (πίνακας 6). Τα πιο πολλά μέλη της Bcl-2 οικογένειας έχουν μια περιοχή από υδροφοβικά αμινοξέα στο καρβοξυτελικό τους άκρο που καθορίζει τη θέση τους στην μεμβράνη των κυτταρικών οργανιδίων.



Εικόνα 10. Βασική δομή οργάνωσης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. (BH = Δομή ανάλογη με το Bcl-2, TM = Διαμεμβρανική περιοχή) (232)

Το Bcl-2 εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και πρόσφατα έχει προταθεί ότι ρυθμίζει την ενεργοποίηση των κασπασών που είναι υπεύθυνες για τα τελευταία στάδια της κυτταρικής απόπτωσης (233-234). Πιο συγκεκριμένα, εμποδίζει την απόπτωση καταστέλλοντας την απελευθέρωση της πρωτεΐνης κυτόχρωμα c που ενεργοποιεί τις κασπάσες (235). Από την άλλη, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bad, Bid, Bax και Bim εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια μετά από διάφορα σήματα και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Εκεί προάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και επομένως την ενεργοποίηση των κασπασών (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Η οικογένεια Bcl-2 ρυθμίζει την απόπτωση ελέγχοντας τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα. Οι αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL εντοπίζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και εμποδίζουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bad, Bid, Bax και Bim εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα αλλά μπορεί να μεταβούν στα μιτοχόνδρια κατόπιν ενός σήματος που προάγει την κυτταρική απόπτωση και συντελούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το Bad μετατοπίζεται στο μιτοχόνδριο και μετατρέπεται στο αποπτωτικό σύμπλοκο Bcl-xL. Αυτή η μετατόπιση εμποδίζεται από τους αναπτυξιακούς παράγοντες που προάγουν την φωσφορύλωση του Bad και επομένως την κυτταροπλασματική του εντόπιση. Εάν και ακόμη οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα στο κυτόχρωμα c δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, το Bcl-xL, το Bcl-2 και το Bax διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.

Σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης του μοριακού μονοπατιού PI3-kinase/NF-kB και τα αυξημένα επίπεδα του Bcl-2 (236-238). Επίσης έχει βρεθεί ότι η απώλεια του PTEN συνδέεται με την έκφραση του Bcl-2 και επομένως με την PI3-kinase (239).

Το Bcl-2 στα καρκινικά κύτταρα δεν παρέχει μόνο το πλεονέκτημα της αυξημένης επιβίωσης αλλά και την ανθεκτικότητα απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών θεραπειών, όπως είναι η κυκλοφωσφαμίδη, η ετοποσίδη, η μεθοτρεξάτη, η δεξαμεθαζόνη και η ακτινοθεραπεία. Το Bcl-X_L επίσης έχει βρεθεί ότι αποτρέπει το αποπτωτικό αποτέλεσμα αρκετών από αυτά τα φάρμακα, πιθανώς μέσα από ένα κοινό μονοπάτι.

Αντιθέτως η μείωση των επιπέδων του Bcl-2 μπορεί να οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα, μετατρέποντας τα κύτταρα από χημειοανθεκτικά σε χημειοευαίσθητα. Παράλληλα η αύξηση των επιπέδων των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως το Bax, το Bcl-X_s και το Bak αυξάνουν την χημειοευαισθησία. Η λειτουργία του Bcl-2 είναι μοναδική επειδή δεν επηρεάζει την φαρμακοκινητική των φαρμάκων αλλά μπλοκάρει τη μεταγωγή των σημάτων που οδηγούν στην απόπτωση, επιτρέποντας έτσι το κύτταρο να επιβιώσει (240-248).

Το μοριακό μονοπάτι του NEP - NFκB - πρωτεάσωμα και η σχέση του με τον καρκίνο του προστάτη

Η NEP είναι μια μέταλλο-πεπτιδάση που εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των προστατικών επιθηλιακών κυττάρων και ο ρόλος της είναι να κόβει και να απενεργοποιεί επομένως τα νευροπεπτίδια, όπως η βομβεσίνη και η ενδοθελίνη-1, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ανδρογόνο-ανεξάρτητου καρκίνου (249-250). Τα νευροπεπτίδια έχουν συσχετισθεί με πολλές διαδικασίες στον καρκίνο του προστάτη συμπεριλαμβανομένου της μετάστασης και της μετατροπής του σε ανδρογόνο-ανεξάρτητο. Εάν δεν απενεργοποιηθούν από την NEP, συνδέονται με τους GPCRs (G protein - coupled receptors) και ενεργοποιούν πολλά μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική ανάπτυξη (251). Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιούν το NFκB μέσω του PI3k/Akt μοριακού μονοπατιού. Η μείωση των επιπέδων του NEP οδηγεί στην ενεργοποίηση της PI3k κινάσης που συντελεί στη φωσφορυλίωση της φωσφατοιδυλοινισιτόλη-4, 5-διφωσφατάση (PIP₂) σε φωσφατοιδυλοινισιτόλη - 3, 4, 5 - τριφωσφατάση (PIP₃) (252) και την ενεργοποίηση της IκK κινάσης που φωσφορυλιώνοντας το IκB το οδηγεί στην

αποδόμηση του από το πρωτεάσωμα, στην απελευθέρωση του NFκB και την πυρηνική του μετατόπιση, του τελευταίου.

Το NFκB είναι ένας διμερής μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στη Rel οικογένεια, όπως το Crel, το Rel-B, το p50 και το p52, και περιέχει μια Rel-homology δομή (RHD) που ευθύνεται για τη σύνδεση του με το DNA, την πυρηνική του μετατόπιση και τις αλληλεπιδράσεις με τις IκB πρωτεΐνες (41). Το ενεργοποιημένο και πυρηνικό NFκB προάγει την κυτταρική ανάπτυξη σε βάρος της απόπτωσης μέσω μηχανισμών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην αγγειογένεση και στη μετάσταση, όπως είναι η απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως το VEGF και το MCP - 1, και την αύξηση της έκφρασης διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης και κυτοκίνων, όπως είναι το VEGF, ο TNF και ο MCP - 1.

Η χορήγηση από την άλλη αναστολέα του πρωτεασώματος οδηγεί στο μπλοκάρισμα του NFκB μέσω πολλών μεταβολικών μονοπατιών. Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του αναστολέα του NFκB, του IκB που αποδομείται από το πρωτεάσωμα. Το NFκB αδυνατεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα και παραμένει ανενεργό. Επιπλέον, σταθεροποιεί τη β-κατενίνη η οποία μέσω αλληλεπίδρασης με τον NFκB αναστέλλει τη δράση του (253). Ακόμα, ο αναστολέας του πρωτεασώματος μπλοκάρει την απελευθέρωση των προσταγλανδινών που είναι ένα μονοπάτι ενεργοποίησης του PI3k/Akt, που οδηγεί στην φωσφορυλίωση του IκB, την απελευθέρωση του NFκB και την πυρηνική του μετατόπιση. Επομένως, η αναστολή του πρωτεασώματος οδηγεί μέσω πολλών μεταβολικών μονοπατιών στην αναστολή της ενεργοποίησης του NFκB και ότι αυτό σημαίνει.

Το πρωτεάσωμα παράλληλα, είναι υπεύθυνο και για την αποδόμηση πολλών πρωτεϊνών, ανάμεσα στις οποίες ανήκουν και οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση, όπως είναι το p21, το p27 και το p53 και η αναστολή του επομένως οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων τους (254). Το p53 είναι μια πρωτεΐνη σημαντική για κυτταρική ανάπτυξη και για την διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού γονιδιώματος σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Σε συνθήκες στρες η ημίσεια ζωή της πρωτεΐνης αυξάνεται σημαντικά και εισέρχεται στον πυρήνα όπου συνδέεται με το DNA (255-256). Οι μηχανισμοί που αυξάνουν τη

σταθερότητα του δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά είναι πιθανόν να συμμετέχει και το ίδιο στην αυτορύθμιση του (257.). Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του, όπως και το p21, που διεγείρουν την κυτταρική απόπτωση μέσω της εξωγενής και της ενδογενούς οδού. Πιο συγκεκριμένα, με την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπως είναι το Fas, το DR4 και το DR5 και αρκετών πρωτεϊνών της οικογένειας του Bcl - 2, όπως το Bax (258.). Το Bad, μια άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας του Bcl-2, φωσφορυλιώνεται υπό την επίδραση αναπτυξιακών παραγόντων, όπως η βομβεσίνη και η ενδοθελίνη. Επομένως παραμένει στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας έτσι την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση διαφόρων κασπασών που οδηγούν το κύτταρο στην κυτταρική απόπτωση. Αυτά με τη σειρά τους είναι υπεύθυνα για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης προάγοντας την κυτταρική απόπτωση ή το μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου (259.). Επίσης, η αναστολή του πρωτεασώματος αυξάνει τα επίπεδα του p27, μέσω της απενεργοποίησης του μονοπατιού PI3k/ Akt αποτρέποντας την κινάση Akt να το φωσφορυλιώσει και να αποτρέψει έτσι την είσοδο του στον πυρήνα.

Η διερεύνηση επομένως των σχέσεων των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με το σύστημα πρωτεασώματος / NFκB στον καρκίνο του προστάτη αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την αποσαφήνιση των μοριακών γεγονότων που συντελούνται στον καρκίνο του προστάτη και στη θεραπεία του. Ως γνωστών, ο καρκίνος του προστάτη καθώς εξελίσσεται μετατρέπεται σε ανδρογονοανεξάρτητο, γεγονός που οδηγεί στη μείωση της έκφρασης της NEP, που μπλοκάρει την PI3k. Έχει αποδειχτεί ότι εάν και στον ανδρογόνο-εξαρτώμενο καρκίνο η PI3k είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη, η απουσία ανδρογόνων υπερευαίσθητοποιεί τα κύτταρα στην κυτταρική ανάπτυξη που προκαλεί. (260.). Επιπλέον, ενεργοποιεί την Akt / PKB κινάση που με τη σειρά της ενεργοποιεί την IKK κινάση, που φωσφορυλιώνει το IκB, αποσυνδέοντας το από το NFκB (261.). Αυτό με τη σειρά του μεταφέρεται στον πυρήνα και οδηγεί το κύτταρο στην κυτταρική ανάπτυξη, με την αύξηση των κυτταρικών επιπέδων πρωτεϊνών, όπως το bcl-2 που υπερνικά τον αποπτωτικό ρόλο πρωτεϊνών, όπως το p53 (262.).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Σκοπός αυτής της έρευνας είναι να μελετήσει το σύστημα πρωτεασώματος ουβικουΐνης σε σχέση με τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Στον καρκίνο του προστάτη έχει βρεθεί ότι η αύξηση της δραστηριότητας του NFκΒ και του συστήματος πρωτεασώματος - ουβικουΐνης έχει αντίστροφη σχέση με τους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και κατά συνέπεια με το κλινικό αποτέλεσμα. Για να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο επιλέξαμε την ενδοθηλίνη-1 (EDN1, GenBank ID :1906) και την βομβεσίνη (GRP, GenBank ID: 2922), ένα πεπτίδιο που σχετίζεται με την απελευθέρωση της γαστρίνης. Δηλαδή, να επιβεβαιωθεί το υποθετικό μοντέλο που θέλει η μειωμένη εκφραστικότητα ή δραστηριότητα του NEP να έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα της ενδοθηλίνης 1 και της βομβεσίνης ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο την 3 φωσφορική κινάση της φωστοτοιδυλινισιτόλης (PI3k). Αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση της σερίνης - θρεονίνης (Akt) που ενεργοποιεί το σύμπλεγμα της IKK που φωσφορυλιώνει την IκΒ απελευθερώνοντας τον μεταγραφικό διμερή παράγοντα, NFκΒ. Το οποίο θα εισέλθει στον πυρήνα θα οδηγήσει στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην αγγειογένεση και στη μετάσταση, καταστέλλοντας όλες εκείνες τις πρωτεΐνες που σαν στόχο έχουν την κυτταρική απόπτωση και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

Η σύγχρονη θεραπευτική στην ογκολογία επιβάλλει όλο και περισσότερο την χρησιμοποίηση στοχευμένης θεραπείας. Δηλαδή μιας θεραπείας που θα επιτίθεται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, θα έχει τις λιγότερες παρενέργειες για τον ασθενή αλλά με καλύτερα αποτελέσματα. Για αυτό ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες πάνω στην μοριακή γενετική του καρκίνου, με σκοπό να διερευνηθούν τα μοριακά μονοπάτια που ακολουθεί ο καρκίνος και η θεραπεία του έτσι να γίνει πιο αποτελεσματική. Σε αυτή τη λογική είναι και αυτή η μελέτη.

Όπως έγινε σαφές το σύστημα πρωτεασώματος και ουβικουΐνης εμπλέκεται σε πολλά μοριακά μονοπάτια και οι λειτουργίες του κυττάρου εξαρτώνται από τη λειτουργία του τόσο άμεσα όσο και έμμεσα, αφού ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και την κυτταρική απόπτωση (263). Η αναστολή του

μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών κατά την διαδικασία της απόπτωσης (264) όσο και φαρμακευτικά με την μπορτεζομίπη που χρησιμοποιείται πλέον σαν μέσο θεραπείας στο πολλαπλό μυέλωμα ακόμα και σε προχωρημένα στάδια (265). Βέβαια τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ενθαρρυντικά σε συμπαγείς όγκους (266-267).

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αρκετή έρευνα γύρω από τους αναστολείς του πρωτεασώματος, τις ιδιότητες τους και τους μηχανισμούς δράσης τους (268-270). Διάφοροι καινούριοι αναστολείς του πρωτεασώματος έχουν αναφερθεί, όπως η εποξυμικίνη και η επονεμυκίνη, αλλά αυτοί οι αναστολείς ακόμα δε χρησιμοποιούνται κλινικά (271). Αντιθέτως η μπορτεζομίπη είναι το πρώτο και το μοναδικό, μέχρι σήμερα, που χρησιμοποιείται κλινικά σαν αναστολέας του πρωτεασώματος - ουβικουτίνης. Προέρχεται από το βορονικό οξύ (N - πυραζίν - καρβονύλ - L - φαινυλαλανίνη - L - λευκίνη βορονικό οξύ) και ανήκει στις πεπτιδουλ - αλδεύδες. Στην κατηγορία αυτή, στην οποία ανήκει και η λιουπεπτίνη και η παπαΐνη, η αναστολή του πρωτεασώματος είναι μερική. Δηλαδή αναστέλλει ειδικά την ενζυμική δραστηριότητα χυμοθρυψίνης που έχει το πρωτεάσωμα, ενώ δεν επηρεάζει τη δράση άλλων σημαντικών ένζυμων για το κύτταρο, όπως είναι η τρυψίνη, η θρομβίνη, η χυμοτρυψίνη, η καθεψίνη B, η ελαστάση και οι καλπαΐνες I και II, καθιστώντας το λιγότερο τοξικό (272-273).

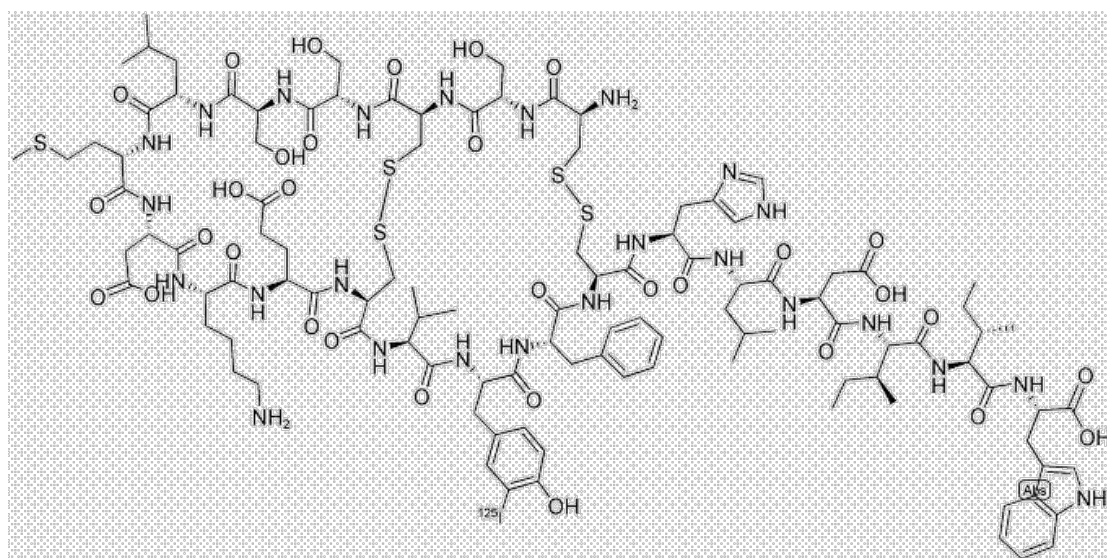
Η μπορτεζομίπη που χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε πολλές κυτταρικές σειρές συμπεριλαμβανομένου και των 60 κυτταρικών σειρών του Αμερικάνικου NCI (National Cancer Institute). Στις φαρμακοκινητικές μελέτες που έχουν γίνει έχει δείξει ότι η μπορτεζομίπη ακολουθεί διφασική μείωση μετά από χορήγηση μιας δόσης. Αδυνατεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ ο καταβολισμός της γίνεται με οξειδωτική αφαίρεση του βορονικού οξέος, υδροξυλίωση των αποβοριωμένων παραγωγών και ηπατική και νεφρική απέκκριση. Σε δόσεις μεταξύ 1,04 και 1,38 mg / m² η πρωτεασωμική αναστολή που παρατηρείται είναι της τάξης του 60 με 70% (274).

Όσο σημαντικό είναι το μοριακό μονοπάτι του πρωτεασώματος - ουβικουτίνης άλλο τόσο σημαντικό είναι και αυτό του μεταγραφικού διμερή παράγοντα NFκΒ που και αυτός με τη σειρά του εμπλέκεται σε πολλά μοριακά μονοπάτια σημαντικά για την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη. Η

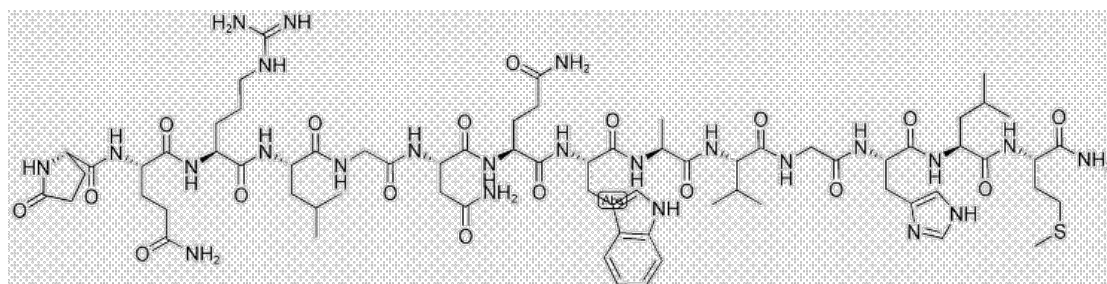
ενδοθηλίνη-1 είναι ένας αγγειοσυσταλτικός παράγοντας που έχει ενοχοποιηθεί τα τελευταία χρόνια στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη. Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) όπως και η ET-2 και η ET-3 είναι ένα πεπτίδιο 21 αμινοξέων που χαρακτηρίζεται από δυο δισουλφιδικούς δεσμούς και από μια δομή α - έλικας. Το πρόδρομο προϊόν της μετάφρασης του γονιδίου της ενδοθηλίνης αποτελείται από 212 αμινοξέα και με τη βοήθεια μιας ενδοπεπτιδάσης δίνει μια πρόδρομη μορφή με 38 αμινοξέα. Τελικά παίρνουμε την ενεργή μορφή με την βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (ECE) (275). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στην κυκλοφορία είναι επτά λεπτά (276). Αύξηση της σύνθεσης της έχουμε από μια σειρά κυτοκινών και παραγόντων ανάπτυξης, όπως η IL - 1β (277-278), ο TNF - α (279), ο TGF - β, PSA (prostate specific antigen) (280) και η βαζοπρεσίνη (281) Συνδέεται χωρίς ειδικότητα με τους υποδοχείς ET-A και ET - B που τους συναντάμε και στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη αλλά και στα κύτταρα του στρώματος. Αντίθετα με το φυσιολογικό προστατικό ιστό οι ET-B υποδοχείς απουσιάζουν στον καρκίνο του προστάτη και στις μεταστάσεις του (282). Το γονίδιο του ET - B βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 στο μακρύ βραχίονα (13q22) το οποίο συχνά υφίσταται απώλεια στον καρκίνο του προστάτη (283). Έχει βρεθεί ότι η ET-1 εκτός από τον αγγειοσυσπαστικό της ρόλο, προκαλεί και τη σύνθεση DNA προκαλώντας μιτογένεση, αγγειογένεση, οστεογένεση μειώνοντας έτσι την κυτταρική απόπτωση (284). Σε αυτή τη μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση του με το μονοπάτι του NFκB

Με το ίδιο σκεπτικό χρησιμοποιήθηκε και ένα άλλο νευροπτίδιο η βομβεσίνη. Η βομβεσίνη ανήκει σε μια οικογένεια πεπτιδίων που το περίεργο όνομα τους το οφείλουν στο γεγονός ότι αρχικά απομονώθηκαν από το δέρμα του βάτραχου, *Bombina bombina* (285-287). Η βομβεσίνη είναι ένα πεπτίδιο δεκατεσσάρων αμινοξέων και είναι λειτουργικά ομόλογο του πεπτιδίου GRP (Gastrin Releasing peptide) και NMB (neuromedin) των θηλαστικών (288). Το GRP είναι ένα πεπτίδιο 27 αμινοξέων που αρχικά απομονώθηκε από το στομάχι των χοίρων και μοιράζεται τα ίδια επτά τελικό - καρβοξυτελικά αμινοξέα με την βομβεσίνη. Το NMB είναι ένα δεκαπεπτίδιο που απομονώθηκε από την σπονδυλική στήλη των χοίρων. Τα ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν το NMB και το GRP εντοπίζονται στους μακρούς βραχίονες του 15 και του 18 χρωμοσώματος αντίστοιχα. Το NMB γονίδιο κωδικοποιεί μια

πρόδρομη πρωτεΐνη 148 αμινοξέων και το GRP μια πρόδρομη πρωτεΐνη 117 αμινοξέων (289). Στους ανθρώπους υπάρχουν τρεις κατηγορίες υποδοχέων, οι GRPR που αποτελούνται από 384 αμινοξέα, οι NMBR που αποτελούνται από 390 αμινοξέα και οι BRS-3 που αποτελούνται από 399 αμινοξέα. Η βομβεσίνη και το GRP συνδέονται με τους GRP - R με τους οποίους έχουν μεγάλη συγγένεια, ενώ το NMB με τους NMBR. Πειραματικά, ιστολογικά αλλά και κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η βομβεσίνη και ανάλογα της διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρολό στη βιολογία του προστάτη. Ο Λογοθέτης και ο Hoosein (290) έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με ανδρογόνο - ανεξάρτητο καρκίνο του προστάτη συναντάμε πεπτίδια ανάλογα της βομβεσίνης 40%. Ο Levine (291) σε μελέτη του έδειξε ότι η βομβεσίνη συσχετίζεται άμεσα με τον παράγοντα NFκB.



Εικόνα 12. Η χημική δομή του νευροπεπτιδίου ET-1 και πως διατάσσεται στο χώρο.



Εικόνα 13. Η χημική δομή του νευροπεπτιδίου της βομβεσίνης και πως διατάσσεται στο χώρο.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν δυο από τις κυριότερες προστατικές καρκινικές σειρές η LNCaP και η PC - 3. Η κυριότερη διαφορά που χαρακτηρίζει τις δυο κυτταροσειρές είναι ότι μια, LNCaP, εκφράζει τον ανδρογόνο-εξαρτώμενο καρκίνο και η άλλη, PC - 3, εκφράζει τον ανδρογόνο-ανεξάρτητο και πιο επιθετική μορφή καρκίνου. Δηλαδή τα LNCaP εκφράζουν την επιφανειακή μέταλλο-πτεπτιδάση NEP (γνωστή και ως CD10, MME, EC 3.4.24.11) που απενεργοποιεί με τη διάσπαση τους τα νευροπεπτίδια, ενώ τα PC - 3 δεν την εκφράζουν (292). Επίσης στην επιθετική μορφή καρκίνου συναντάμε μεταλλαγμένο και το p53, ενώ το p21 δεν εκφράζεται (πίνακας 7).

	LNCaP	PC - 3
	ΑΝΔΡΟΓΟΝΟ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ	ΑΝΔΡΟΓΟΝΟ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ
NEP ΕΚΦΡΑΣΗ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟ
NEP ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	-
p21	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΔΕΝ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ
p53	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟ
p27	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ

Πίνακας 7. Η σύγκριση των μοριακών βλαβών που υπάρχουν στις δυο κυτταροσειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των πειραμάτων. (293-296)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια κυττάρων

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές προστατικές καρκινικές σειρές LNCaP και PC3 που αποκτήθηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιιεργειών ECACC (European Collection of animal Cell Cultures, Salisbury, U.K.). Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκε σαν καλλιιεργητικό υλικό RPMI (Euroclone, Pero, Italy) με

την προσθήκη βοΐου εμπορικού όρου (FBS), πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης στους 37° C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Οι φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των 25 ml και τα κύτταρα βρίσκονταν σε μια πυκνότητα της τάξης του 30%.

Δοκιμασία Μεθύλ - τριαζολύλ - τετραζολίου (MTT)

Σε τριβλία 96 θέσεων κύτταρα και από τις δυο καρκινικές σειρές τοποθετήθηκαν με μια συγκέντρωση $10 \cdot 10^3$ σε κάθε θέση και αφέθηκαν τα LNCaP για 48 ώρες και τα PC3 για 24 ώρες για να προσκολληθούν. Όπως φαίνεται στον πίνακα προστέθηκαν φάρμακα σε διάφορες συγκεντρώσεις και με διαφορετικό χρόνο επώασης σε κάθε πηγαδάκι (πίνακας 8). Μετά από 48 ώρες προστέθηκαν 10 μl αντιδραστηρίου MTT (R&D Systems, Abington, U.K.) σε κάθε θέση του τριβλίου και το μείγμα αφέθηκε να επωαστεί για τέσσερις ώρες στους 37° C. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 100 ml του αντιδραστηρίου ανίχνευσης του MTT (R&D Systems) και εφόσον προστατεύτηκε το τριβλίο από το φως τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Τέλος, με τη βοήθεια μιας συσκευής πολλαπλών μετρήσεων τη Victor 1420 (Wallac, Turku, Finland) έγιναν μετρήσεις απορρόφησης του φωτός σε μήκος κύματος 570 nm χρησιμοποιώντας σαν αναφορά τα 650 nm. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ
bbs(100nM)	48 h
bbs(100nM) και RC(10 nM)	48 h
RC(10 nM)	1 h και 45 min
endothelin(100nM)	48 h

Endothelin(100nM) και BQ (1μM)	48 h
BQ (1μM)	30 min
Bortezomib(1μM)	24 h
Bortezomib(1μM) και endothelin(100nm)	24 h
Bortezomib(1μM) και bbs(100nm)	24h
Bay (20μM)	16 h
Wedelactone (50μM)	1h και 30 min

Πίνακας 8. Η χρήση διαφόρων φαρμάκων σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στις δυο προστατικές καρκινικές σειρές LNCaP και PC3. Τα LNCaP επωάστηκαν για συνολικά 96 ώρες (4 ημέρες) και τα PC3 για 72 ώρες (3 ημέρες) στους 37° C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂

Δοκιμασία βιωσιμότητας των κυττάρων με τον αποκλεισμό του κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue)

Κύτταρα και από τις δυο κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν χωρίς φάρμακα και με την παρουσία μπορτεζομίμπης για εικοσιτέσσερις ώρες. Στη συνέχεια εκτέθηκαν στο κυανό του τρυπανίου για περίπου δέκα λεπτά και με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer Improved, Brand, Weilthelm, Germany) καταμετρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα προσκολλημένα κύτταρα όσο και τα αποκολλημένα και αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό. Σε κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 200 κύτταρα από κάθε σειρά και για κάθε συνθήκη.

Δοκιμασία κατακερματισμένου DNA

Κύτταρα και από τις δυο κυτταροσειρές εφόσον επωάστηκαν με μπορτεζομίμπη σε συγκέντρωση 1 μM για εικοσιτέσσερις ώρες και λύθηκαν

σε ρυθμιστικό διάλυμα, που περιείχε Tris - HCl σε συγκέντρωση 10 mM, 400 mM χλωριούχο νάτριο (NaCl), 2 mM νατριούχου αιθυλέν - διάμινο - τέτρα - οξικό οξύ (EDTA, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) και pH ίσο με 8.2, και με τη βοήθεια 50 μl πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, Sigma - Aldrich), 10 μl RNAσης (Invitrogen, Carlsbad, CA) και 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate). Το DNA απομονώθηκε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις από φαινόλη σε χλωροφόρμιο και τελικά καθίζηση σε αιθανόλη. Στη συνέχεια ίσες ποσότητες DNA (10 μl) ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma - Aldrich) και φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός.

Δοκιμασία πρωτεασωματικής δραστηριότητας

Με τη βοήθεια εμπορικώς διαθέσιμων αντιδραστηρίων και της φθοριομετρικής μεθόδου, όπως της Chemicon International (Temecula, CA), μετρήθηκε η πρωτεασωματική δραστηριότητα. Στις δυο κυτταροσειρές χορηγήθηκε βομβεσίνη ή ενδοθελίνη σε συγκεντρώσεις από 20nm έως 120 nm για 48 ώρες. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροσειρές χωρίς τα φάρμακα. Τα δείγματα που ήταν περίπου 600.000 κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml κρύο νερό και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000g. Στη συνέχεια το υπερκείμενο ψύχθηκε και υπερθερμάνθηκε για τρεις κύκλους και μετά φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 για 45 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο προτού χρησιμοποιηθεί αποθηκεύτηκε στους -80° C. Σε τριβλία 96 θέσεων τοποθετήθηκε προς ανάλυση 10 μl συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος (10x), 10 μl του πρωτεασωματικού υποστρώματος LLVY - AMC (λευκίνη - λευκίνη - βαλίνη - τυροσίνη - 7 - αμινο - 4 - μέθυλ - κουμαρίνη), 20 μl από το δείγμα μας και 60 μl αποσταλμένου ύδατος, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 100 μl. Στις θέσεις που υπήρχαν οι μάρτυρες με υπόστρωμα αντί να τοποθετηθεί δείγμα προστέθηκαν 10 μl αποσταγμένο ύδωρ, ενώ εκεί που δεν υπήρχε και υπόστρωμα προστέθηκαν 20 μl αποσταγμένο ύδωρ, ώστε οι τελικοί όγκοι όλων των δειγμάτων να είναι ίσοι και 100 μl. Τα δείγματα επωάστηκαν για δυο ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκαν σε μια συσκευή πολλαπλών μετρήσεων τη Victor 1420 (Wallac, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 380 nm. Οι τελικές τιμές για τα δείγματα υπολογίστηκαν μετά την αφαίρεση των τιμών των μαρτύρων με και χωρίς υπόστρωμα και στη συνέχεια

με τη βοήθεια προκατασκευασμένου διαγράμματος φθορισμού - πρωτεασωμικής δραστηριότητας υπολογίστηκε η πρωτεασωμική δραστηριότητα.

Απομόνωση πρωτεϊνών και Western blotting.

Οι δυο κυτταροσειρές LNCaP και PC3 καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό στο οποίο τις τελευταίες εικοσιτέσσερις ώρες επώασης προστέθηκε βομβεσίνη σε συγκέντρωση 100 nM, ενδοθηλίνη σε συγκέντρωση 100 nM και μπορτεζομίπη σε συγκέντρωση 1 μM καθώς και ο συνδυασμός τους (πίνακες 9 και 10). Στη συνέχεια εφόσον ξεπλύθηκαν δυο φορές με PBS (Phosphate - buffered Saline) στα κυτταρικά ιζήματα προστέθηκε διάλυμα λύσης και τρεις αναστολείς πρωτεασών η λιουπεπτίνη, η απροτινίνη και το PMSF (φαίνυλ - μέθυλ - σουλφονυλ - φθόριο). Το διάλυμα λύσης περιείχε Tris HCl 10mM, EDTA 50mM, χλωριούχου νατρίου 150 mM, γλυκερίνη 10% και Triton X-100 1%. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών υπολογιστήκαν με τη μέθοδο της Bradford (Biorad, Hercules, CA) και 25 μg από κάθε πρωτεΐνη προστέθηκε σε γέλη 10% SDS - πολυακρυλαμιδίου. Από τη γέλη οι πρωτεΐνες με τη βοήθεια της συσκευής μεταφοράς (Biorad) μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες Western Blotting. Στη συνέχεια οι μεμβράνες εφόσον ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS / Tween επωάστηκαν σε 5% μη λιπαρό γάλα σε θερμοκρασία δωματίου για δυο ώρες. Έπειτα αφού ξεπλύθηκαν και πάλι τρεις φορές με PBS / Tween επωάστηκαν με το πρωτοταγές αντίσωμα στους 4 ° C για δεκαέξι ώρες με ελαφρά ανάδευση. Χρησιμοποιηθήκαν διάφορα πρωτοταγή αντισώματα όπως : p21 (sc - 817, mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), p27 (sc - 1641, mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), p53 (sc - 126, mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), Bad (sc - sc8044, mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), Bcl - 2 (BD Pharmingen, San Diego, Calif), NFκB (F-6, mouse monoclonal and C-20, goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), caspase-3 (sc-7272 mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA) and actin (sc-8432, mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA and clone AC-40, mouse monoclonal, Sigma Aldrich, UK). Οι μεμβράνες ξαναξεπλύθηκαν και επωάστηκαν για δυο ώρες με το δευτεροταγές αντίσωμα GAM (goat anti -

mouse, Santa Cruz Biotechnology) σε θερμοκρασία δωματίου και ελαφρά ανάδευση. Τέλος με το σύστημα της φωταύγειας από την εταιρεία Biorad έγινε η ανίχνευση των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαληθεύτηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΑ	LNCaP
ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΩΑΣΗ	96 ΩΡΕΣ (4 ημέρες)
ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΠΩΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΦΑΡΜΑΚΟ
bbs(100nM)	24h
endothelin(100nM)	24h
Bortezomib(1μM)	24h
Bortezomib(1μm) + endothelin(100nm)	24h+1h
Bortezomib(1μm) + bbs(100nm)	24h+1h

Πίνακας 9. Συνθήκες καλλιέργειας στην LNCaP κυτταροσειρά.

ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΑ	PC 3
ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΩΑΣΗ	72 ΩΡΕΣ (3 ημέρες)
ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ
bbs(100nM)	24h
endothelin(100nM)	24h
Bortezomib(1μM)	24h

Bortezomib(1μm) + endothelin(100nm)	24h+1h
Bortezomib(1μm) + bbs(100nm)	24h+1h

Πίνακας 10. Συνθήκες καλλιέργειας στην PC3 κυτταροσειρά.

Δοκιμασία ενζυμικής δραστηριότητας του NEP

Η LNCaP κυτταροσειρά επωάστηκε για τέσσερις ημέρες και στη συνέχεια εφόσον ξεπλύθηκε δυο φορές με PBS (Phosphate - buffered Saline) στα κυτταρικά ιζήματα προστέθηκε διάλυμα λύσης και δυο αναστολείς πρωτεασών την λιουπεπτίνη και το PMSF (φαίνυλ - μέθυλ - σούλφονυλ - φθόριο). Το διάλυμα λύσης περιείχε Tris HCl 50mM, χλωριούχου νατρίου 150 mM και 0,5% chap.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα μείγμα που περιείχε 200 μl Tris Buffer με pH 7.5 , 10 μl APM (ενζυματικό διάλυμα), 10 μl υπόστρωμα 20 mM suc-ala-Phe και 30 μl από το κάθε δείγμα. Αυτό το μείγμα παρέμεινε στους 37° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl 10% TCA και έγινε φυγοκέντρηση στα 3500g για 5 λεπτά. 250 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε νέους σωλήνες και προστέθηκαν 250 μl NaNO₂ και έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl θειικού αμμωνίου και έγινε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά. Τέλος, 500 μl NNEDA προστέθηκαν και 250 μl από το κάθε δείγμα μετρήθηκε σε μια συσκευή πολλαπλών μετρήσεων τη Victor 1420 (Wallac, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 540 nm.

Δοκιμασία RT - PCR

Οι δυο κυτταροσειρές LNCaP και PC3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό στο οποίο τις τελευταίες εικοσιτέσσερις ώρες επώασης προστέθηκε βομβεσίνη σε συγκέντρωση 100 nM, ενδοθηλίνη σε συγκέντρωση 100 nM και μπορτεζομίπη σε συγκέντρωση 1μM. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταροσειρές χωρίς φάρμακα. Το συνολικό mRNA απομονώθηκε από όλες

τις κυτταροσειρές χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit (της εταιρείας Biorad Biorad, Hercules, CA). Συγκεκριμένα περίπου 2.000.000 κύτταρα από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 g και στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκε διάλυμα λύσης RNA (παρερχομένου από το kit) και ισοπροπανόλη 100% και ομογενοποιήθηκε. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 g και στο ίζημα προστέθηκε 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 13.000 g. Τέλος, αφού το ίζημα στέγνωσε (περίπου 30 λεπτά) ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια του RNA hydration διαλύματος και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

Στα δείγματα RNA έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης με τη βοήθεια φωτόμετρου και 1 μg χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία μονόκλωνου cDNA με τη βοήθεια του εμπορικού kit (Biorad, Hercules, CA) που περιείχε το Script Read Mix και το Script Reverse Transfer. Στη συνέχεια το cDNA υπεβλήθη σε PCR σε τελικό όγκο 50 μl και που περιείχε 1x Reaction Buffer, 0,2 mM dNTPs, 2mM MgCl_2 , 1U Platinum Taq DNA πολυμεράση και 0.25 M από κάθε primer και αποϊονισμένο νερό. Η PCR για το VEGF είχε ως εξής: αρχική αποδιάταξη (Denaturation) στους 94°C για 5 λεπτά και μετά 37 κύκλοι με 30 δευτερόλεπτα αποδιάταξη στους 94°C , 30 δευτερόλεπτα πρόσδεσης υποκινητή (Annealing) στους 56°C και με 30 δευτερόλεπτα επιμήκυνσης (Elongation) στους 72°C . Τελικώς, υπήρχε ακόμα ένα στάδιο επιμήκυνσης 10 λεπτών στους 72°C . Η PCR για το IL-8 και το GAPDH είχε ως εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά και μετά 35 κύκλοι με 30 δευτερόλεπτα αποδιάταξη στους 94°C , 1 λεπτό πρόσδεσης υποκινητή στους 58°C και με 30 δευτερόλεπτα επιμήκυνσης στους 78°C . Τελικώς, υπήρχε ακόμα ένα στάδιο επιμήκυνσης 10 λεπτών στους 72°C . Για το GAPDH από την άλλη υπήρχαν 35 κύκλοι με 30 δευτερόλεπτα μετουσίωση (Denaturation) στους 94°C , με 1 λεπτό Annealing στους 56°C και με 30 δευτερόλεπτα διάσπαση (Extension) στους 78°C . Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για το VEGF ήταν 5'-TGC ACC CAT GGC AGA AGG AGG-3' (sense) και 5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3' (antisense), για το IL - 8 ήταν 5'- CTT TCA GAG ACA GCA GAG CAC 3' (sense) και 5'- ACT GTG AGG TAA GAT GGT GGC 3' (antisense) και για το GAPDH 5'- GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA 3' (sense) και 5'- GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC 3' (antisense).

Στη συνέχεια ίσες ποσότητες DNA (10 μ l) παρουσία DNA ladder ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% w/v που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma - Aldrich) και το DNA φωτογραφήθηκε με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Graph Instat Statistical των Windows. Τα δεδομένα εκφράστηκαν σαν μέσος ορός και τυπική απόκλιση (SD). Η ανάλυση διασποράς με μέθοδο Bonferroni χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν τα δεδομένα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο σημείο $p < 0,05$.

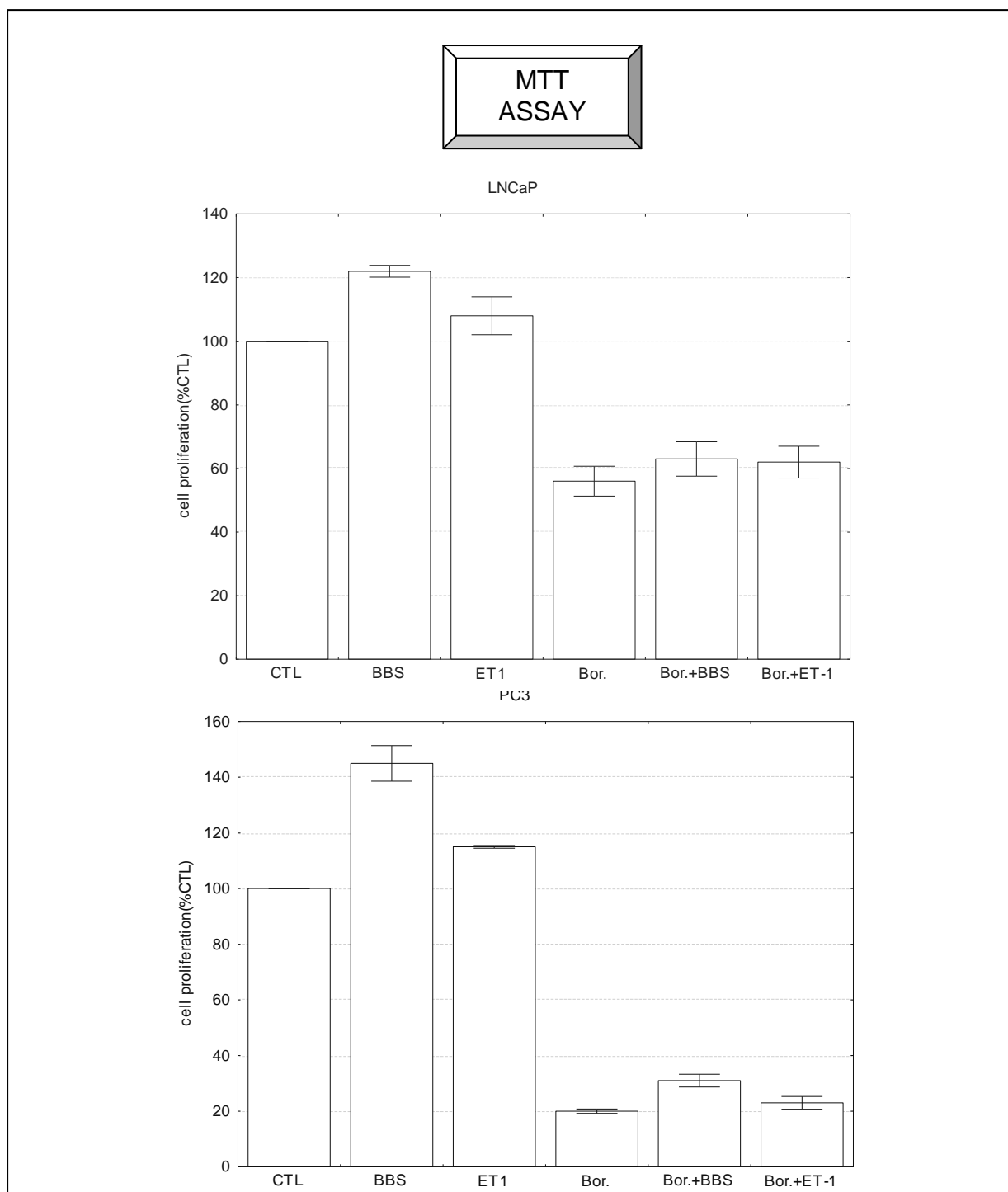
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επίδραση των νευροπεπτιδίων στην κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλεται από την χρήση της μπορτεζομίμης.

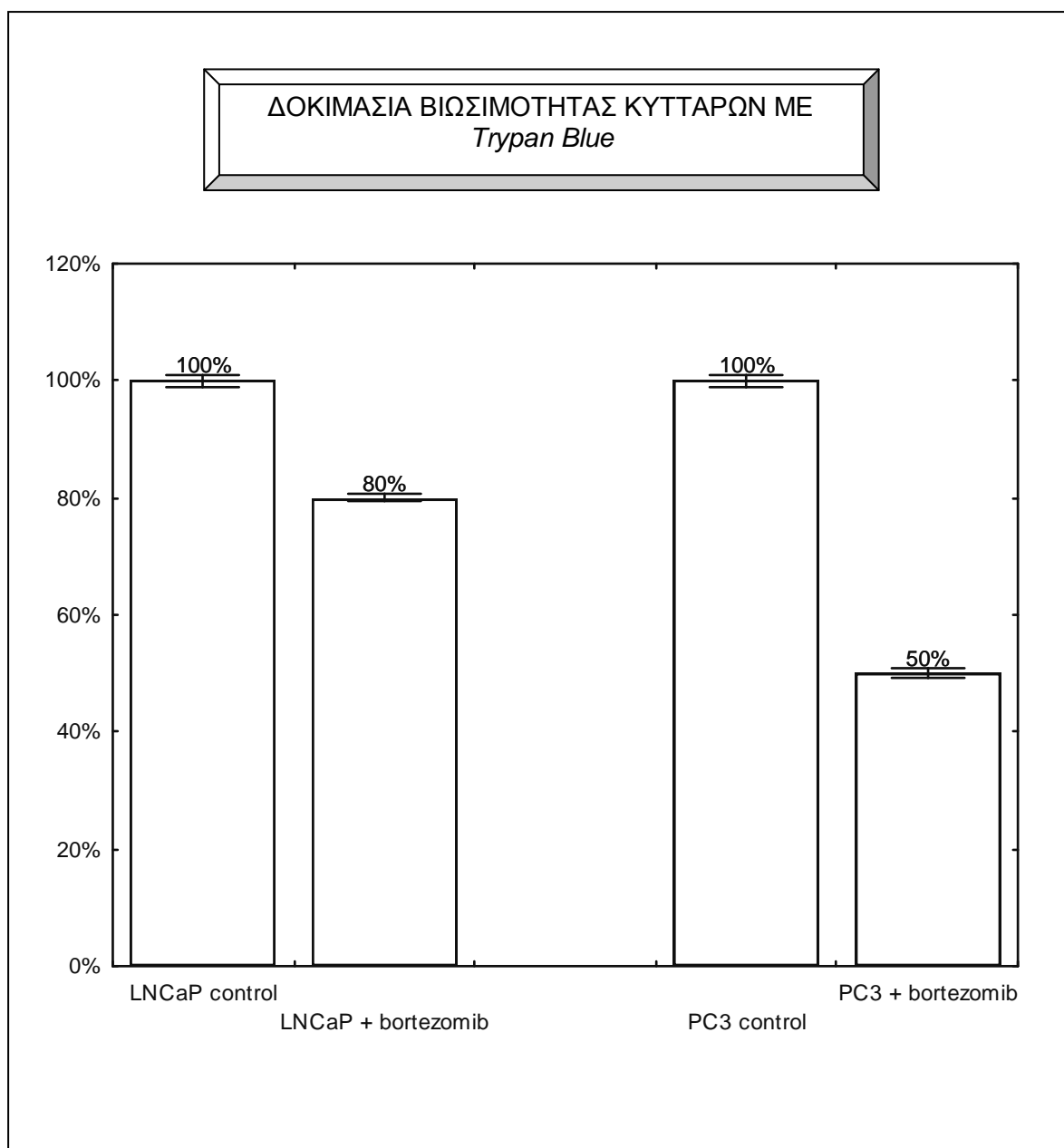
Στα ανδρογόνο - εξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα LNCaP η χορήγηση ενδοθηλίνης-1 (ET-1) δεν έχει καμία σημαντική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη, ενώ η χορήγηση βομβεσίνης (BBS) έχει μια μέτρια επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη (εικόνα 14), η οποία αναστέλλεται από τη χορήγηση μπορτεζομίμης. Στα ανδρογόνο - ανεξάρτητα καρκινικά κύτταρα (PC3) τα νευροπεπτίδια επάγουν σε μεγαλύτερο βαθμό την κυτταρική ανάπτυξη και μάλιστα η βομβεσίνη πιο εμφαντικά. Η συνχορήγηση όμως και στις δυο κυτταρικές σειρές του αναστολέα του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμης, αντιστρέφει αυτό το αποτέλεσμα. Από την άλλη, η χορήγηση και στις δυο κυτταρικές σειρές μόνο του αναστολέα του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης, μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό στα PC3 παρά στα LNCaP, γεγονός που δείχνει ότι αυτή η κυτταρική σειρά είναι πιο ευαίσθητη στη χρήση της (εικόνα 15). Παράλληλα, η χορήγηση της μπορτεζομίμης και στις δυο σειρές επάγει την απόπτωση όπως φαίνεται και από τη δοκιμασία του κατακερματισμένου DNA (εικόνα 16), τη δοκιμασία αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου (εικόνα 15) και της αποπτωτικής μορφολογίας που παρουσιάζουν στο οπτικό μικροσκόπιο (εικόνα 16) .

Τα νευροπεπτίδια δεν καταφέρνουν να αναστείλουν την απόπτωση που προκαλεί η μπορτεζομίμη

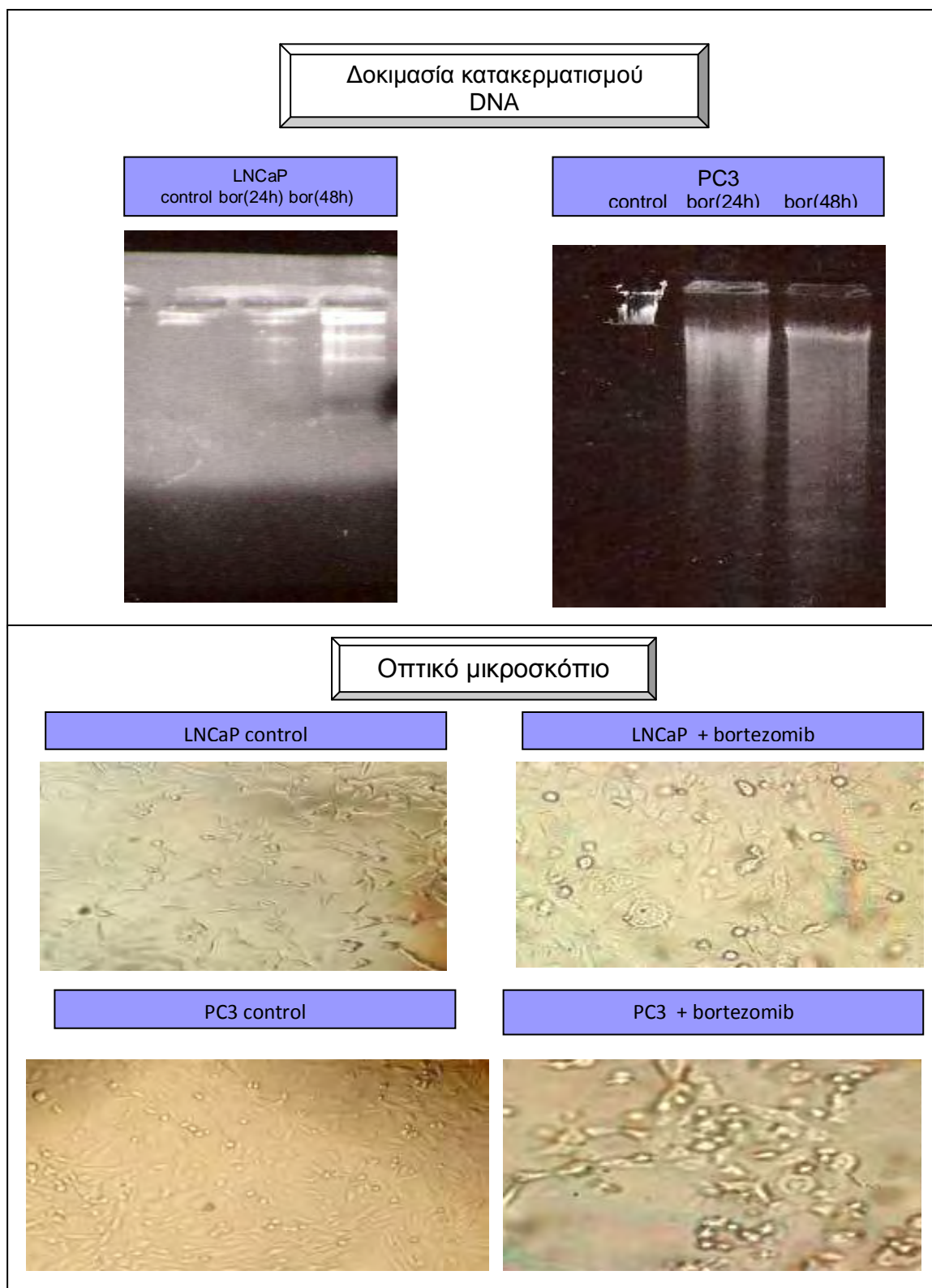
Η χορήγηση στα κύτταρα είτε ET-1 είτε BBS δεν είχε κανένα αποπτωτικό αποτέλεσμα στην LNCaP και στην PC3 κυτταροσειρά. Η χορήγηση της μπορτεζομίμης από την άλλη, οδηγεί στην κυτταρική απόπτωση όπως φαίνεται από μετατροπή της προκασπάσης σε κασπάσης τόσο στα LNCaP όσο και στα PC3 κύτταρα. Η συνχορήγηση τέλος, των νευροπεπτιδίων με την μπορτεζομίμη δεν ήταν αρκετή να σώσει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλεί η μπορτεζομίμη (εικόνα 17).



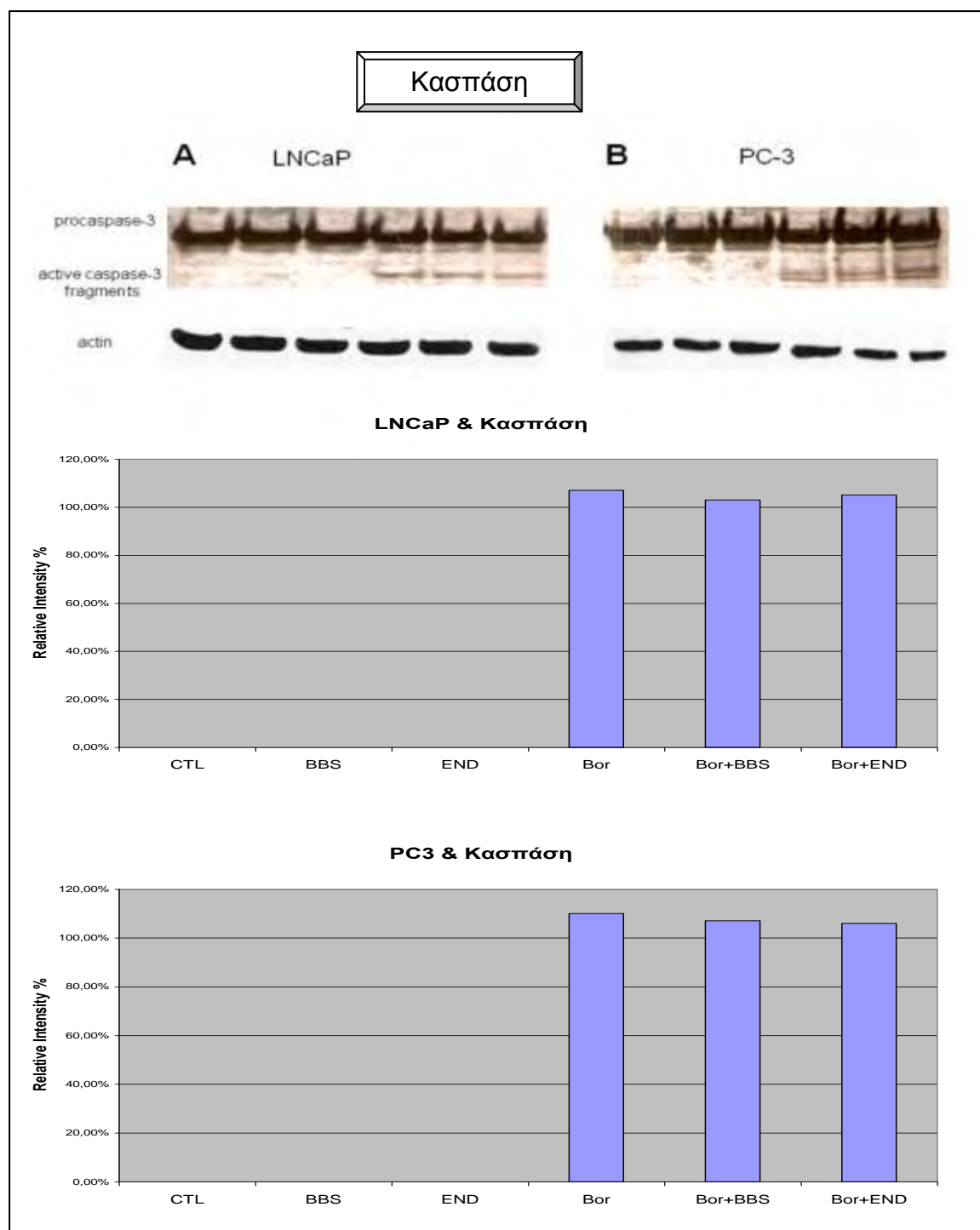
Εικόνα 14. Η επίδραση των νευροπεπτιδίων, βομβεσίνης και ενδοθελίνης, στην κυτταρική ανάπτυξη και στις δυο κυτταρικές σειρές, LNCaP (πάνω) και PC3(κάτω), με τη δοκιμασία του μέθυλ-τριαζολύλ-τετραζολίου (MTT). Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων, LNCaP και PC3, ήταν 10.000 σε κάθε θέση και μετά από 48 και 24 ώρες αντίστοιχα, προστέθηκαν τα φάρμακα. Συγκεκριμένα στη πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, στη θέση δυο βομβεσίνη 100nM για 48 ώρες, στη θέση τρία ενδοθελίνη 100nM για 48 ώρες, στη θέση τέσσερα μπορτεζομίμη 333nM για 48 ώρες, στη θέση πέντε μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM μαζί για 48 ώρες και μπορτεζομίμη 333nM μόνη της για 1 ώρα και στη θέση έξι μπορτεζομίμη 333nM και ET-1 100nM μαζί για 48 ώρες και μπορτεζομίμη 333nM μόνη της για 1 ώρα



Εικόνα 15. Η αποπτωτική δράση της μπορτεζομίμπης αποφαίνεται με τη δοκιμασία αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου στα LNCaP (αριστερά) και στα PC3 (δεξιά). Οι δυο κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν χωρίς φάρμακα και με την παρουσία μπορτεζομίμπης 333nM για 24 ώρες. Στη συνέχεια εκτέθηκαν στο κυανό του τρυπανίου για περίπου δεκάλεπτα και με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου (Neubauer Improved, Brand, Weiltheim, Germany) καταμετρήθηκαν τουλάχιστον 200 κύτταρα από κάθε σειρά και για κάθε συνθήκη στο οπτικό μικροσκόπιο. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα προσκολλημένα κύτταρα όσο και τα αποκολλημένα και αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό. Η μπορτεζομίμπη προκαλεί μεγαλύτερη απόπτωση στα PC3 (50%) σε σχέση με τα LNCaP (20%).



Εικόνα 16. Ο αποπτωτικός ρόλος της μπορτεζομίμπης όπως αναδεικνύεται με τη δοκιμασία του κατακερματισμού του DNA (δύο πάνω εικόνες) και της μορφολογίας των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο (κάτω εικόνες). Στη δοκιμασία κατακερματισμού το DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης σε φαινόλη/χλωροφόρμιο και αιθανόλη. Όπως φαίνεται η χορήγηση μπορτεζομίμπης για 24 και ακόμα παραπάνω για 48 ώρες προκαλεί κατακερματισμό του DNA. Όσον αφορά τη μορφολογία σε φωτογραφία στο οπτικό μικροσκόπιο σε κύτταρα χωρίς φάρμακο και κύτταρα με τη χορήγηση μπορτεζομίμπης 333nM για 24 ώρες, η συνοχή, ο αριθμός και το σχήμα των κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά.



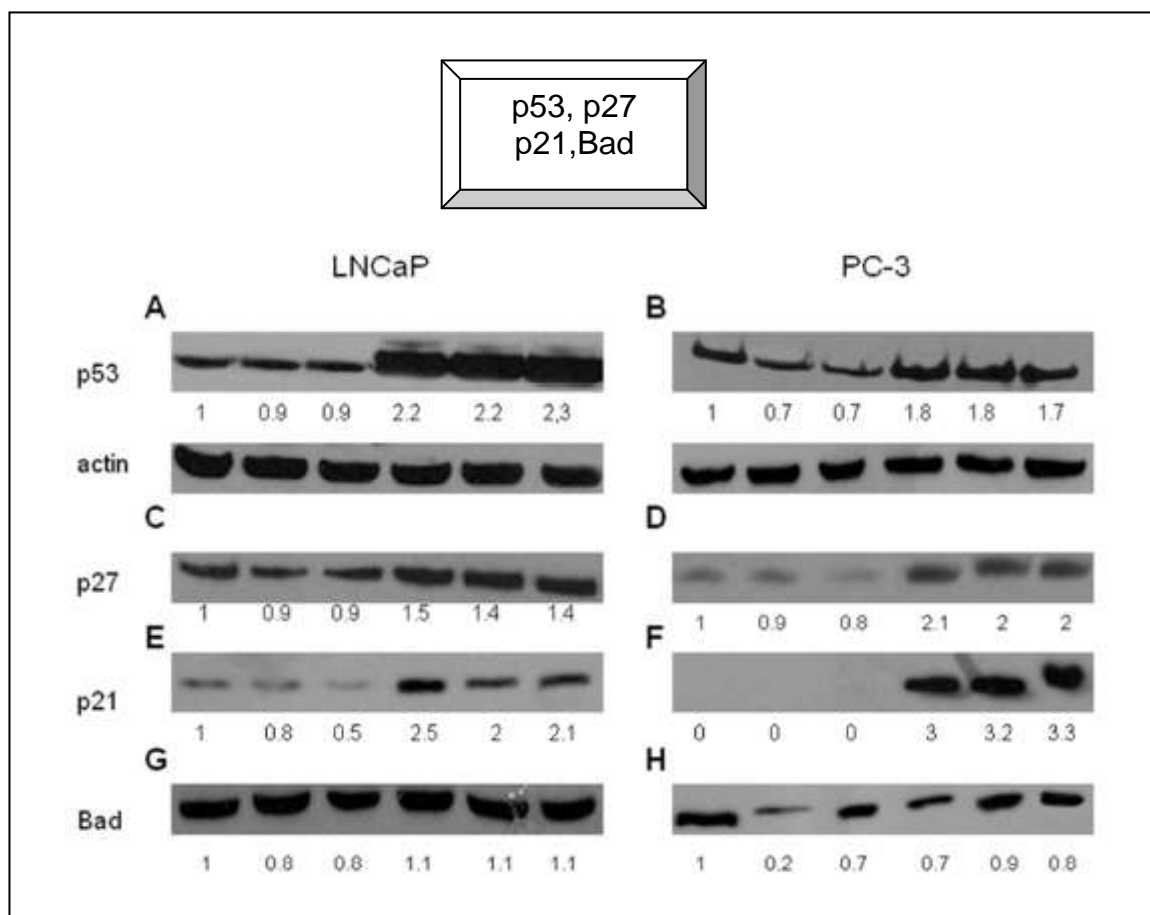
Εικόνα 17. Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων LNCaP και PC3 (δεξιά στήλη) με αντισώματα κατά της πρωτεΐνης κασπάσης και ανάλυση του αποτελέσματος με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Η σειρά των φαρμάκων για κάθε εξάδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα. Η χρήση της μπορτεζομίμης ενεργοποιεί της προ-κασπάση σε κασπάση και η χρήση νευροπεπτιδίων δεν μπορεί να αναστρέψει το αποτέλεσμα της.

Η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση p53, p21, p27 και Bad με τη χορήγηση νευροπεπτιδίων και του αναστολέα του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμπη.

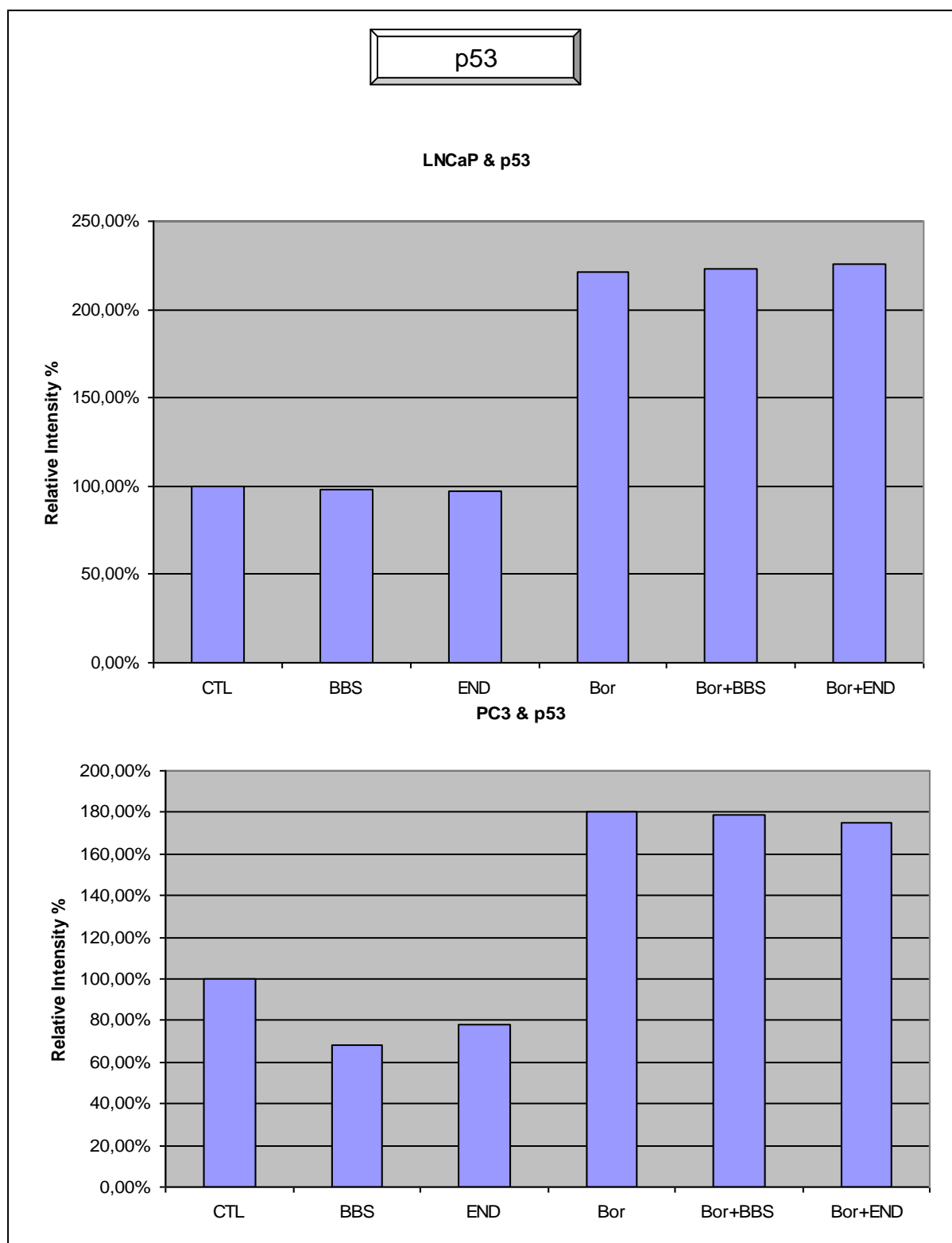
Μετά από τη χορήγηση βομβεσίνης και ET-1, η έκφραση της πρωτεΐνης καταστολέα του κυτταρικού κύκλου p53 παραμένει αναλλοίωτη στα LNCaP κύτταρα, ενώ στα PC3 μειώνεται η έκφραση της σε σχέση πάντα με τα βασικά επίπεδα έκφρασης (εικόνα 18, 19). Αντιθέτως, η έκφραση του p53 αυξάνει και στις δυο κυτταροσειρές με τη χορήγηση της μπορτεζομίμπης, ένα αποτέλεσμα που διατηρείται και με την συν-χορήγηση νευροπεπτιδίων (εικόνα 18, 19).

Η πρωτεΐνη αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες, p21, εκφράζεται στα LNCaP, αλλά όχι στα PC3 σε βασικές συνθήκες καλλιέργειας. Η έκφραση της παρουσίασε μείωση στην LNCaP κυτταροσειρά με τη χορήγηση των νευροπεπτιδίων και στη PC3 κυτταροσειρά η έκφραση της, μη ανιχνεύσιμη, δεν παρουσίασε μεταβολές. Αντιθέτως, όταν χορηγήθηκε ο αναστολέας του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμπη, η LNCaP κυτταροσειρά αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του p21, ενώ πλέον στη PC3 κυτταροσειρά άρχισε να ανιχνεύεται, ένα αποτέλεσμα που δε μεταβλήθηκε με τη συν-χορήγηση νευροπεπτιδίων (εικόνα 18, 21). Μια άλλη πρωτεΐνη αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από κινάσες, η p27, εκφράζεται και στις δυο κυτταροσειρές σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης, αλλά σε μικρότερο βαθμό στα LNCaP, ελαττώνεται ελάχιστα με την χορήγηση νευροπεπτιδίων στην LNCaP κυτταροσειρά. Επίσης και στην PC3 κυτταροσειρά τα νευροπεπτιδία δεν προκαλούν ιδιαίτερες αλλαγές στην έκφραση της. Από την άλλη, η χορήγηση μπορτεζομίμπης αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης ακόμα και με την συν-χορήγηση των νευροπεπτιδίων και στις δυο κυτταροσειρές (εικόνες 18, 20).

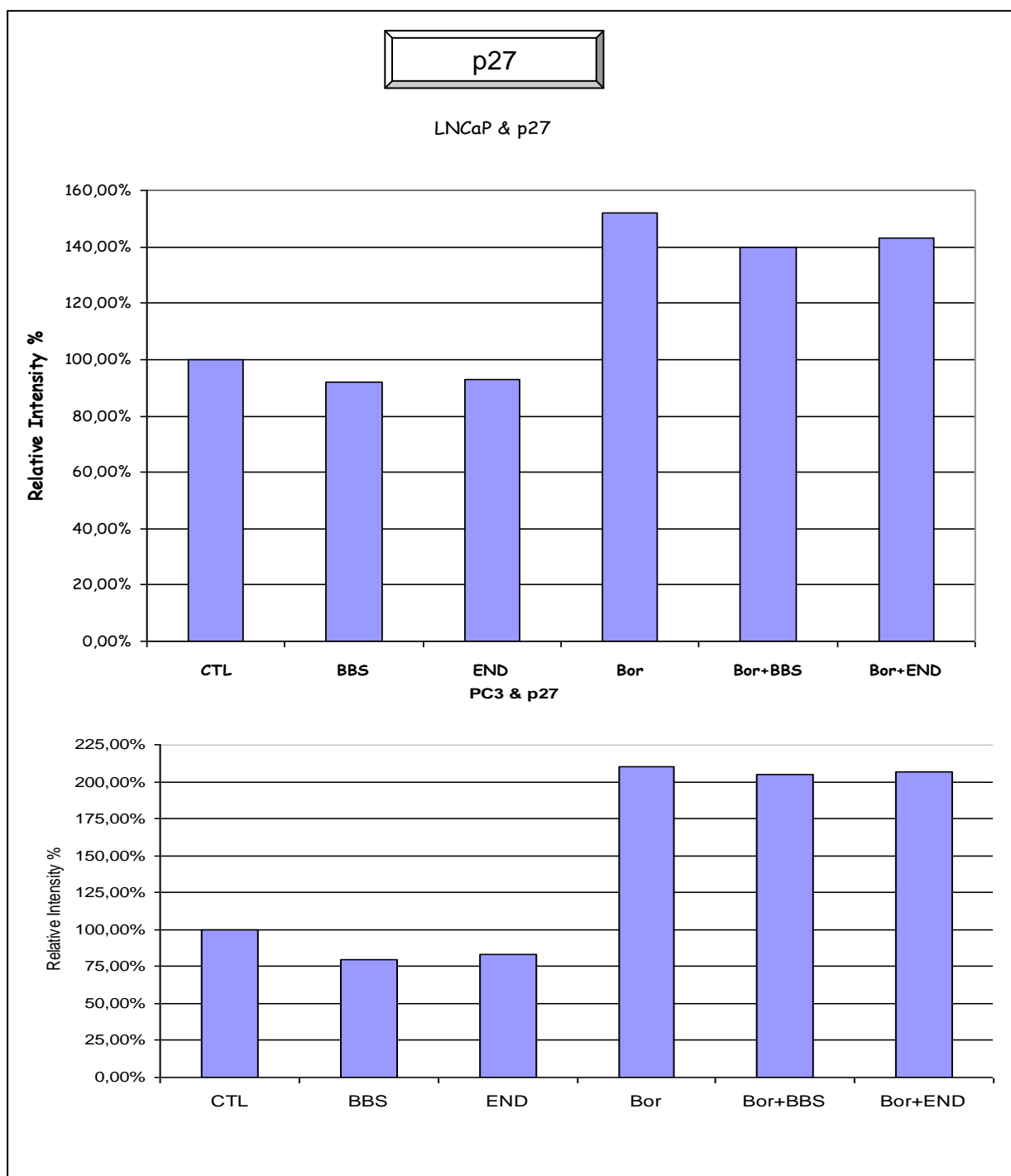
Τέλος, η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bad στα LNCaP δεν επηρεάζεται ούτε από τη χορήγηση νευροπεπτιδίων ούτε από τη χορήγηση μπορτεζομίμπης. Σε αντίθεση όμως στη PC3 κυτταροσειρά με τη χορήγηση βομβεσίνης μειώνει την έκφραση της, ενώ η συν-χορήγηση μπορτεζομίμπης μπλοκάρει αυτό το αποτέλεσμα (εικόνα 18, 22). Η πρωτεΐνη Bad επηρεάζεται σε λιγότερο βαθμό από τη χορήγηση ET-1 ή/και μπορτεζομίμπης στην ίδια κυτταροσειρά.



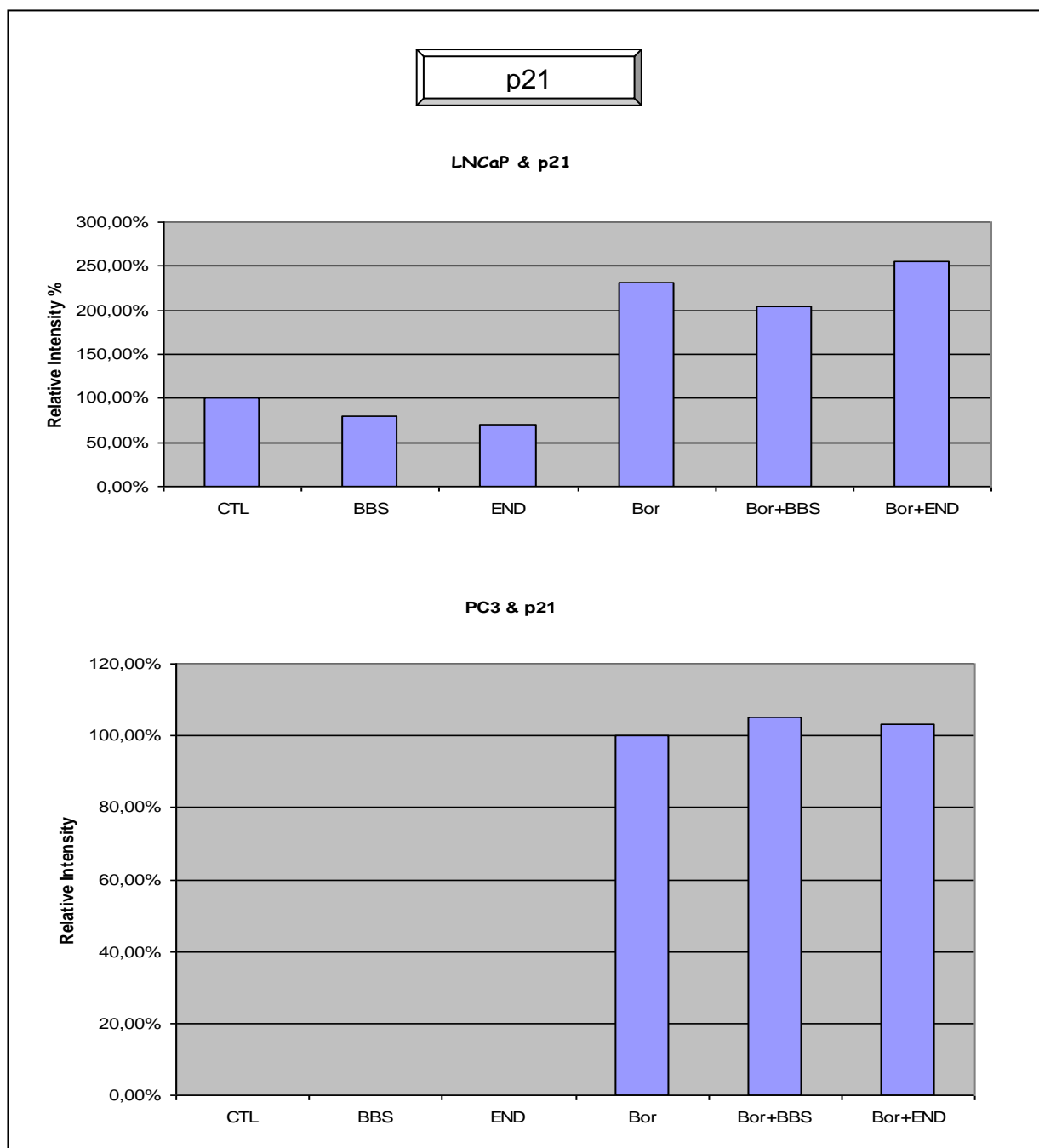
Εικόνα 18. Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων LNCaP (αριστερή στήλη) και PC3 (δεξιά στήλη) με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών p53, p27, p21 και Bad. Η σειρά των φαρμάκων για κάθε εξάδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθελίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθελίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα.



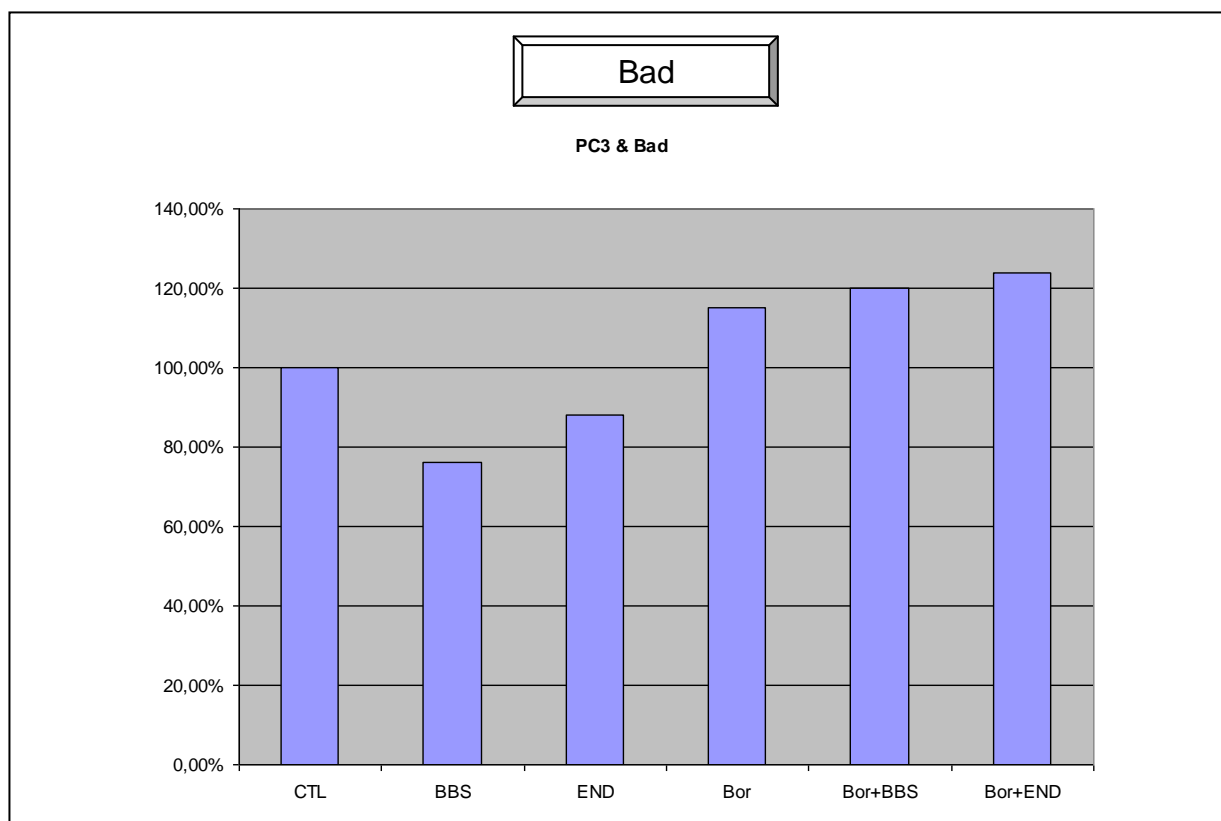
Εικόνα 19 Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων LNCaP και PC3 με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης p53 με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Η σειρά των φαρμάκων είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα. Το p53 εκφράζεται και στις δυο κυτταρικές σειρές και δεν επηρεάζεται με τη χρήση νευροπεπτιδίων στα LNCaP ενώ στα PC3 μειώνεται η έκφραση του. Από την άλλη η χρήση μπορτεζομίμης και στις δυο κυτταρικές σειρές επάγει την έκφραση του ακόμα και με τη χρήση νευροπεπτιδίων.



Εικόνα 20. Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων LNCaP και PC3 με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης p27 με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Η σειρά των φαρμάκων είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα. Το p27 εκφράζεται και στις δυο κυτταρικές σειρές και δεν επηρεάζεται με τη χρήση νευροπεπτιδίων στα LNCaP ενώ στα PC3 μειώνεται η έκφραση του. Από την άλλη η χρήση μπορτεζομίμης και στις δυο κυτταρικές σειρές επάγει την έκφραση του ακόμα και με τη χρήση νευροπεπτιδίων.



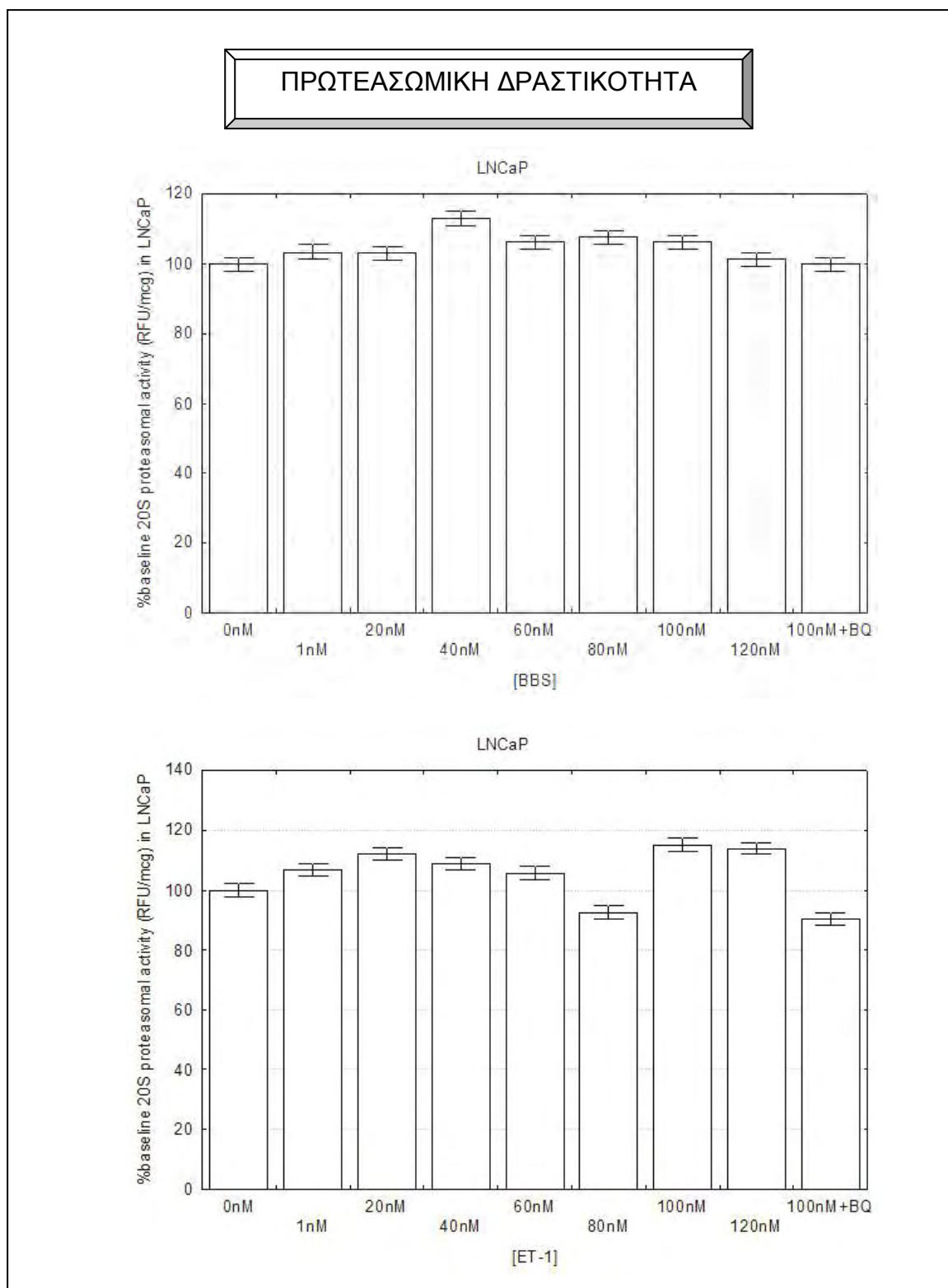
Εικόνα 21 Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων LNCaP και PC3 με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης p21 με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Η σειρά των φαρμάκων είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα. Το p21 εκφράζεται μόνο στα LNCaP και η χρήση μπορτεζομίμης επάγει την έκφραση του ακόμα και με τη χρήση νευροπεπτιδίων. Στα PC3 που δεν εκφράζεται η χρήση μπορτεζομίμης επάγει την έκφραση του ακόμα και με τη χρήση νευροπεπτιδίων.



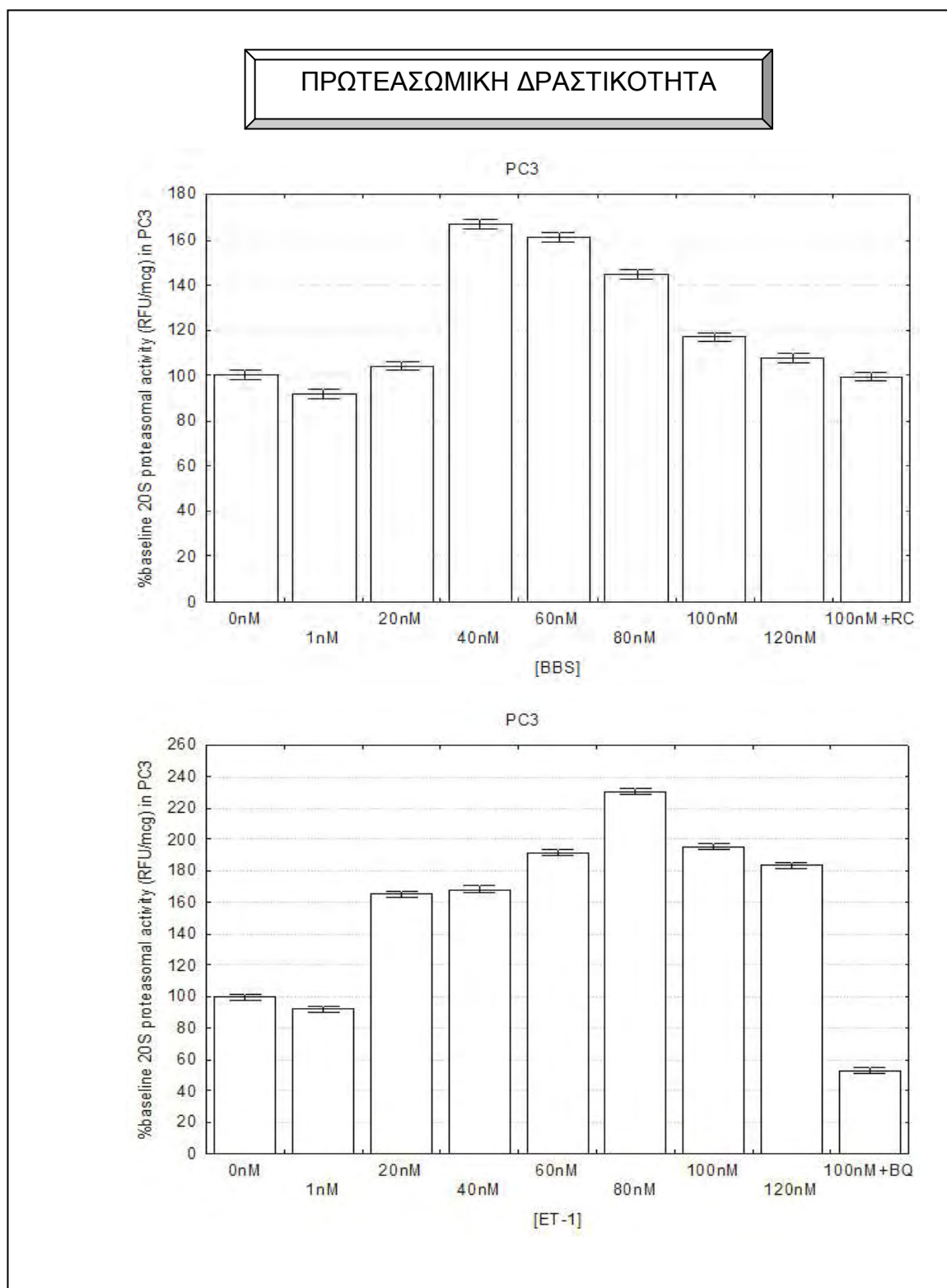
Εικόνα 22 Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων PC3 με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης Bad με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. Η σειρά των φαρμάκων είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 333nM για 24 ώρες, πέμπτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα και έκτη θέση μπορτεζομίμη 333nM και ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες μαζί και μπορτεζομίμη μόνη της για 1 ώρα. Το Bad δεν επηρεάζεται στα LNCaP από τη χρήση είτε της μπορτεζομίμης είτε των νευροπεπτιδίων, αλλά στα PC3 η βομβεσίνη μειώνει την έκφραση του σημαντικά, ενώ η συνχορήγηση του με μπορτεζομίμη αντιστρέφει αυτό το αποτέλεσμα.

Η πρωτεασωματική δραστηριότητα αυξάνεται από τη χορήγηση νευροπεπτιδίων στην PC3 κυτταροσειρά.

Η χορήγηση νευροπεπτιδίων στην LNCaP σειρά σε συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεν μεταβάλλει σχεδόν καθόλου την πρωτεασωματική δραστηριότητα (εικόνα 23). Αντιθέτως στην PC3 κυτταροσειρά η χορήγηση διάφορων συγκεντρώσεων βομβεσίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτεασωματικής δραστηριότητας που κορυφώνεται όταν χορηγούνται 40 nM βομβεσίνης. Η ET-1 από την άλλη έχει μια πιο σταδιακή αύξηση της πρωτεασωματικής δραστηριότητας και έχει τη μέγιστη επίδραση στο πρωτεάσωμα στα 80 nM (εικόνα 24). Τέλος, τα PC3 κύτταρα έχουν πιο ενεργό πρωτεάσωμα, ίσως λόγω των παραπάνω υποστρωμάτων (εικόνα 25)

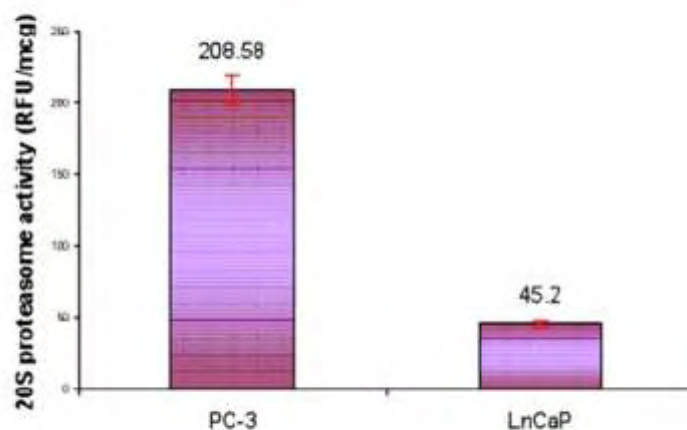


Εικόνα 23. Δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα LNCaP χορηγώντας διάφορες συγκεντρώσεις από τα νευροπεπτίδια. Από αριστερά προς τα δεξιά: βασικές συνθήκες, για 1 ώρα ET-1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και BQ123 (1 μ M για 30min) με ET-1 (100 nM για 45min).



Εικόνα 24. Δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστηριότητας στη PC3 κυτταροσειρά χορηγώντας διαφορές συγκεντρώσεις από τα νευροπεπτίδια. Από αριστερά προς τα δεξιά: βασικές συνθήκες, για 1 ώρα BBS σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και RC-3095 (10nM για 1h) με BBS (100 nM για 1h).

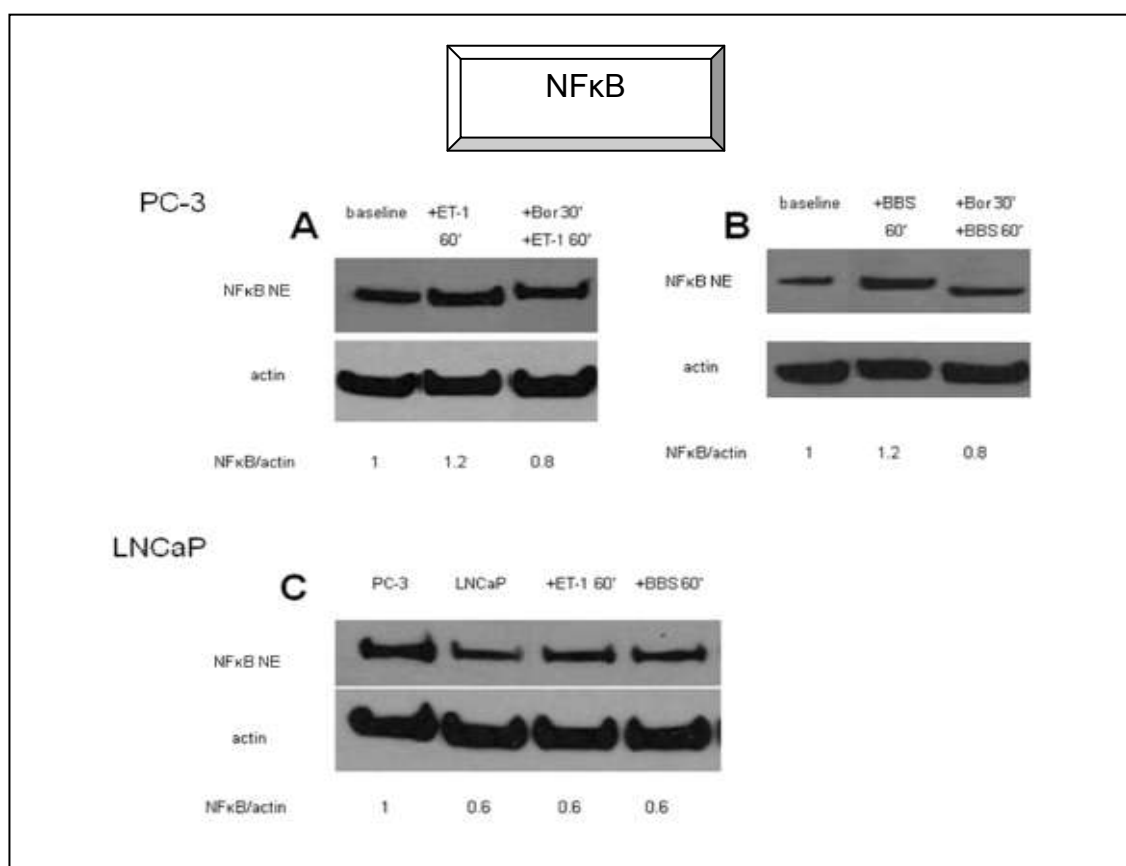
ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ



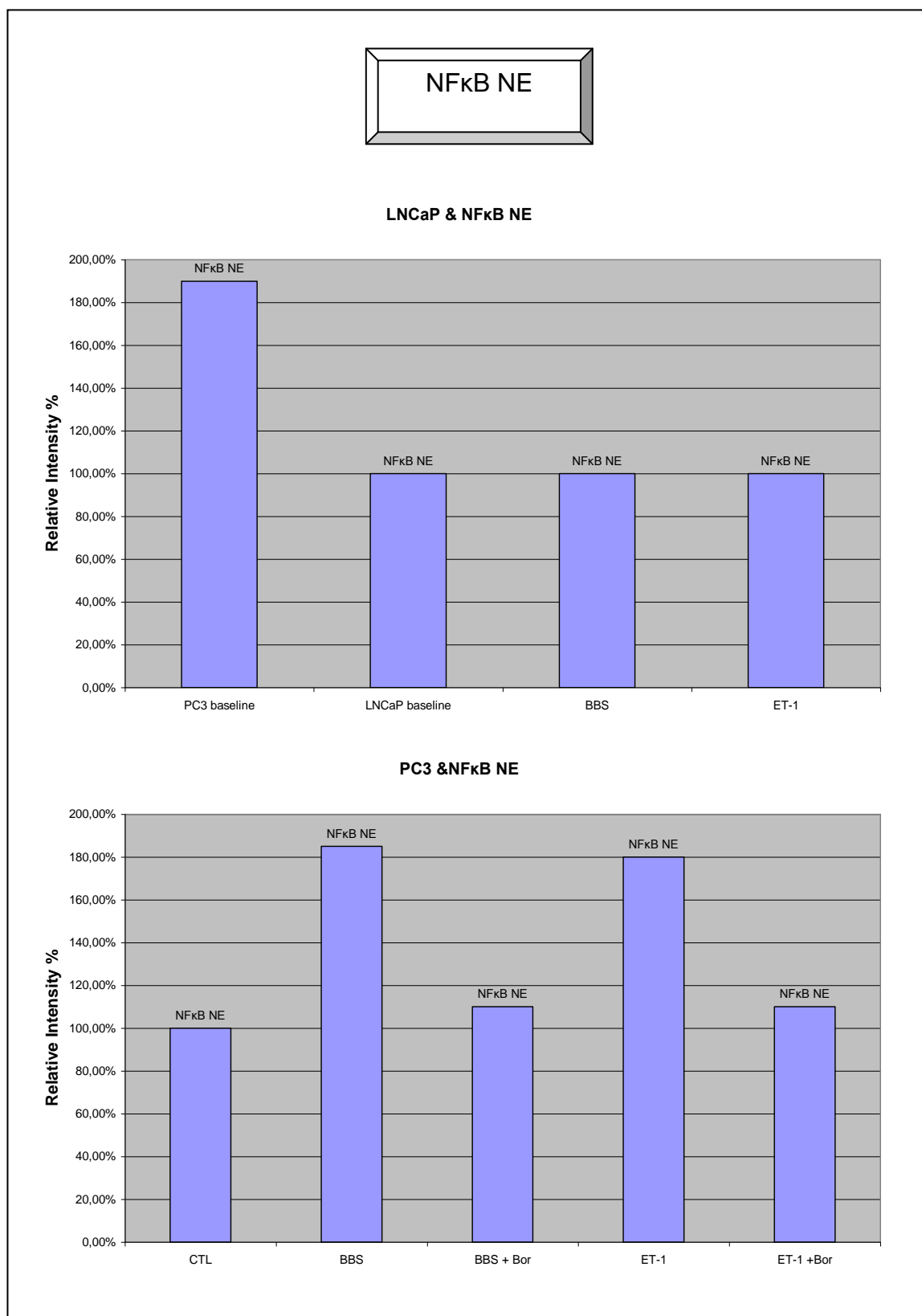
Εικόνα 25. Δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα LNCaP και στα PC3 κύτταρα. Η PC3 κυτταροσειρά έχει μεγαλύτερη πρωτεασωμική δραστηριότητα σε σχέση με την LNCaP.

Η μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα από τα νευροπεπτίδια μπλοκάρεται από την μπορτεζομίμη στη PC3 κυτταροσειρά.

Η χορήγηση στη PC3 κυτταροσειρά ET-1 σε συγκέντρωση 100nM για 60 λεπτά έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πυρηνικού NFκB. Παρόμοια αύξηση του πυρηνικού NFκB παρατηρείται και όταν χορηγείται και βομβεσίνη. Η μπορτεζομίμη από την άλλη προλαμβάνει αποτελεσματικά τη μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα από τα νευροπεπτίδια (εικόνα 26, 27). Τέλος, τα νευροπεπτίδια δεν έχουν κανένα αποτέλεσμα στην LNCaP κυτταροσειρά στην ίδια συγκέντρωση και στον ίδιο χρόνο (εικόνα 26, 27).



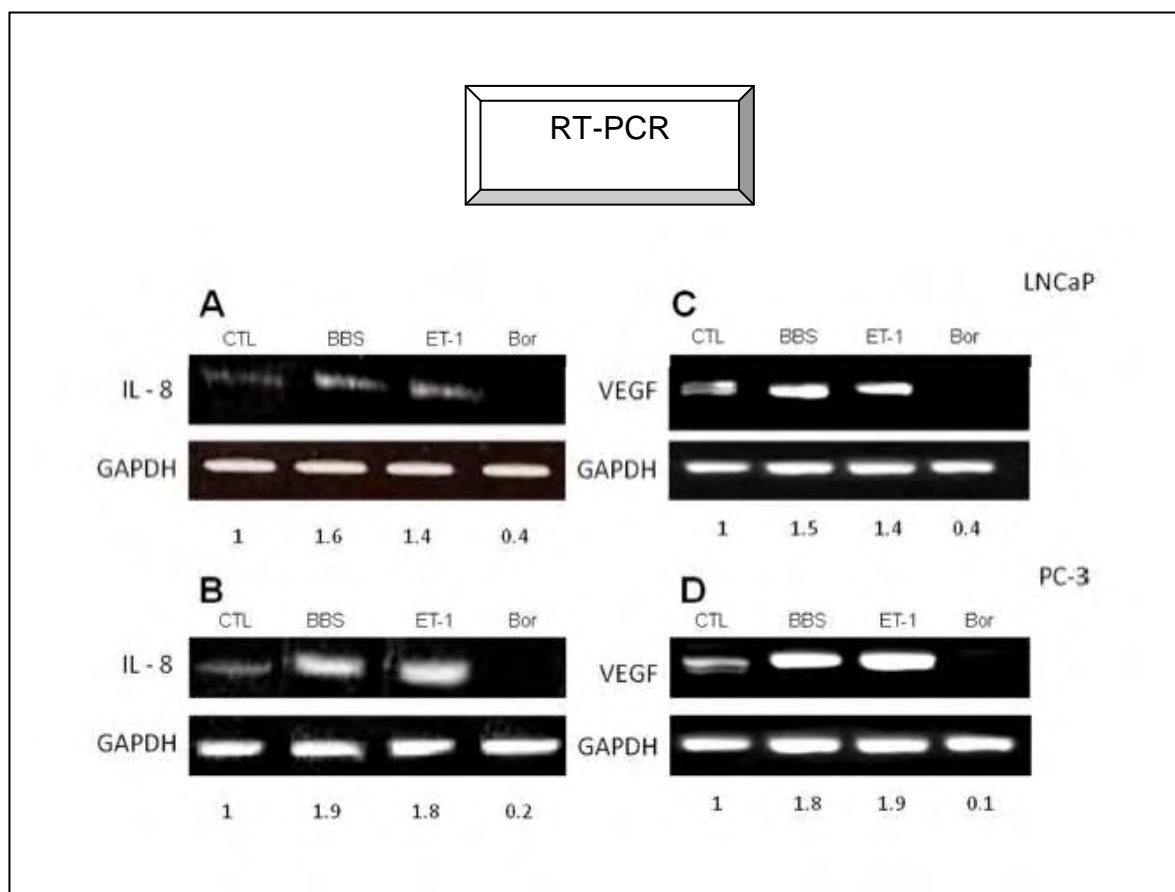
Εικόνα 26. PC3 κύτταρα, από αριστερά προς τα δεξιά: βασικές συνθήκες, ET-1 (100nM για 60 λεπτά), χορήγηση μπορτεζομίμης αρχικά (1μM για 30 λεπτά) και στη συνέχεια συνεχής χορήγηση ET-1 (100nM για 60 λεπτά), (B) (A) PC3 κύτταρα, από αριστερά προς τα δεξιά: βασικές συνθήκες, BBS (100nM για 60 λεπτά), χορήγηση μπορτεζομίμης αρχικά (1μM για 30 λεπτά) και στη συνέχεια συνεχής χορήγηση BBS (100nM για 60 λεπτά) (C) (A) από αριστερά προς τα δεξιά: PC3 κύτταρα σε βασικές συνθήκες, LNCaP κύτταρα σε βασικές συνθήκες, LNCaP και ET-1 (100nM για 60 λεπτά) LNCaP και BBS (100nM για 60 λεπτά).



Εικόνα 27 Ανάλυση western blotting με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. LNCaP κύτταρα: βασικές συνθήκες, LNCaP με ET-1 (100nM για 60 λεπτά) LNCaP με BBS (100nM για 60 λεπτά). PC3 κύτταρα: βασικές συνθήκες, BBS (100nM για 60 λεπτά), χορήγηση μπορτεζομίμπης αρχικά (1μM για 30 λεπτά) και στη συνέχεια συνεχής χορήγηση BBS (100nM για 60 λεπτά), ET-1 (100nM για 60 λεπτά), χορήγηση μπορτεζομίμπης αρχικά (1μM για 30 λεπτά) και στη συνέχεια συνεχής χορήγηση ET-1 (100nM για 60 λεπτά).

Η διαφορετική επίδραση των νευροπεπτιδίων, βομβεσίνη και ET-1, και του αναστολέα του πρωτεασώματος, μπορτεζομίμη, στην έκφραση των γονιδίων στόχων του NFκB, IL-8 και VEGF.

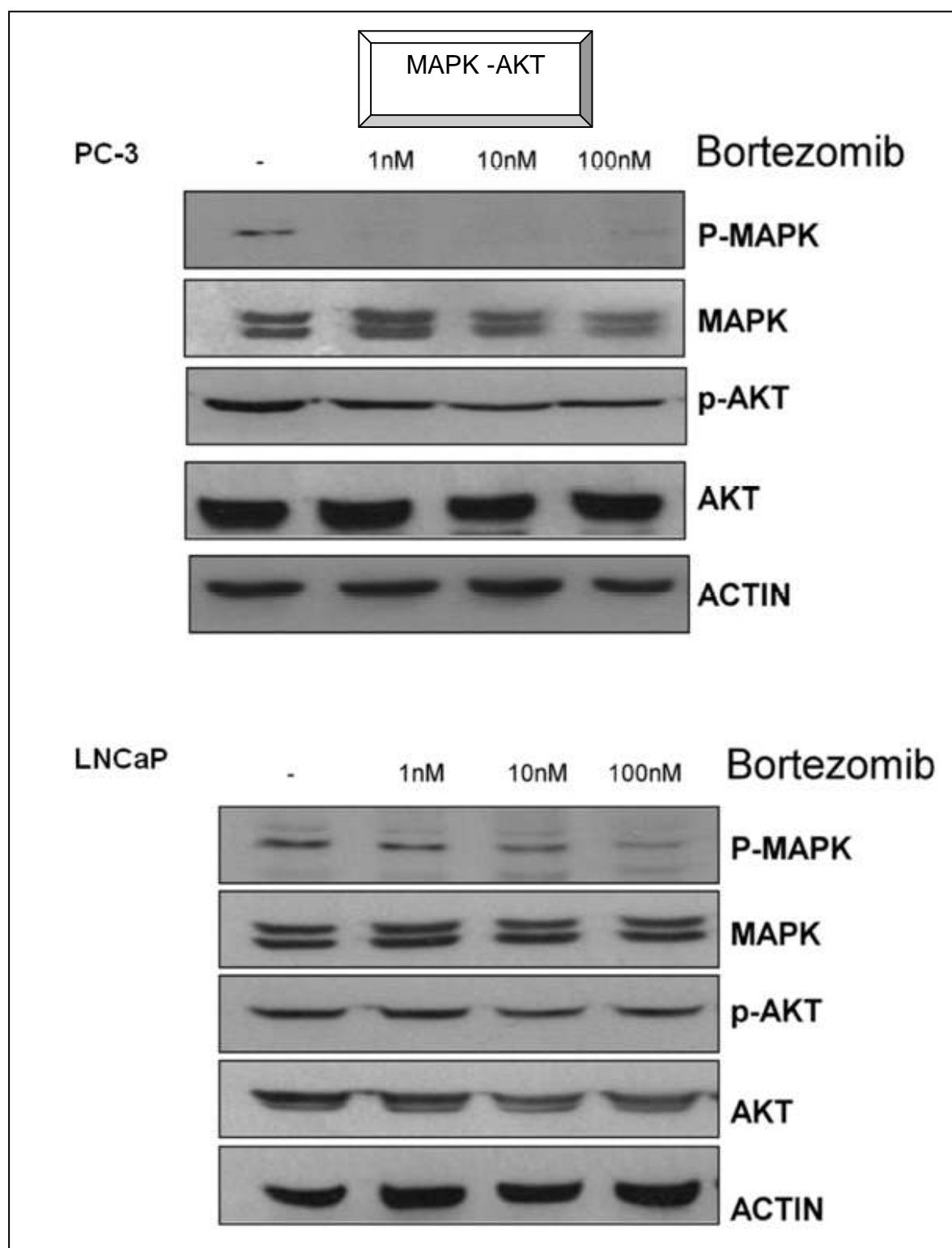
Στην προσπάθεια να αποδείξουμε εάν η παρατηρούμενη μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα σχετίζεται με μια πραγματική μεταγραφική ενεργοποίηση του, έγινε RT-PCR στα γονίδια IL-8 και VEGF, τα οποία κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά ενεργοποιούνται από το NFκB. Τα επίπεδα των mRNA και των δυο γονιδίων στόχων του NFκB αυξάνονται σημαντικά σε σχέση με την έκφραση τους σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης όταν χορηγείται βομβεσίνη και ET-1. Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA και των δυο γονιδίων μειώνονται όταν στις κυτταροσειρές χορηγείται ο αναστολέας του πρωτεασώματος μπορτεζομίμη, σε επίπεδα που δεν είναι πλέον ορατά (εικόνα 28).



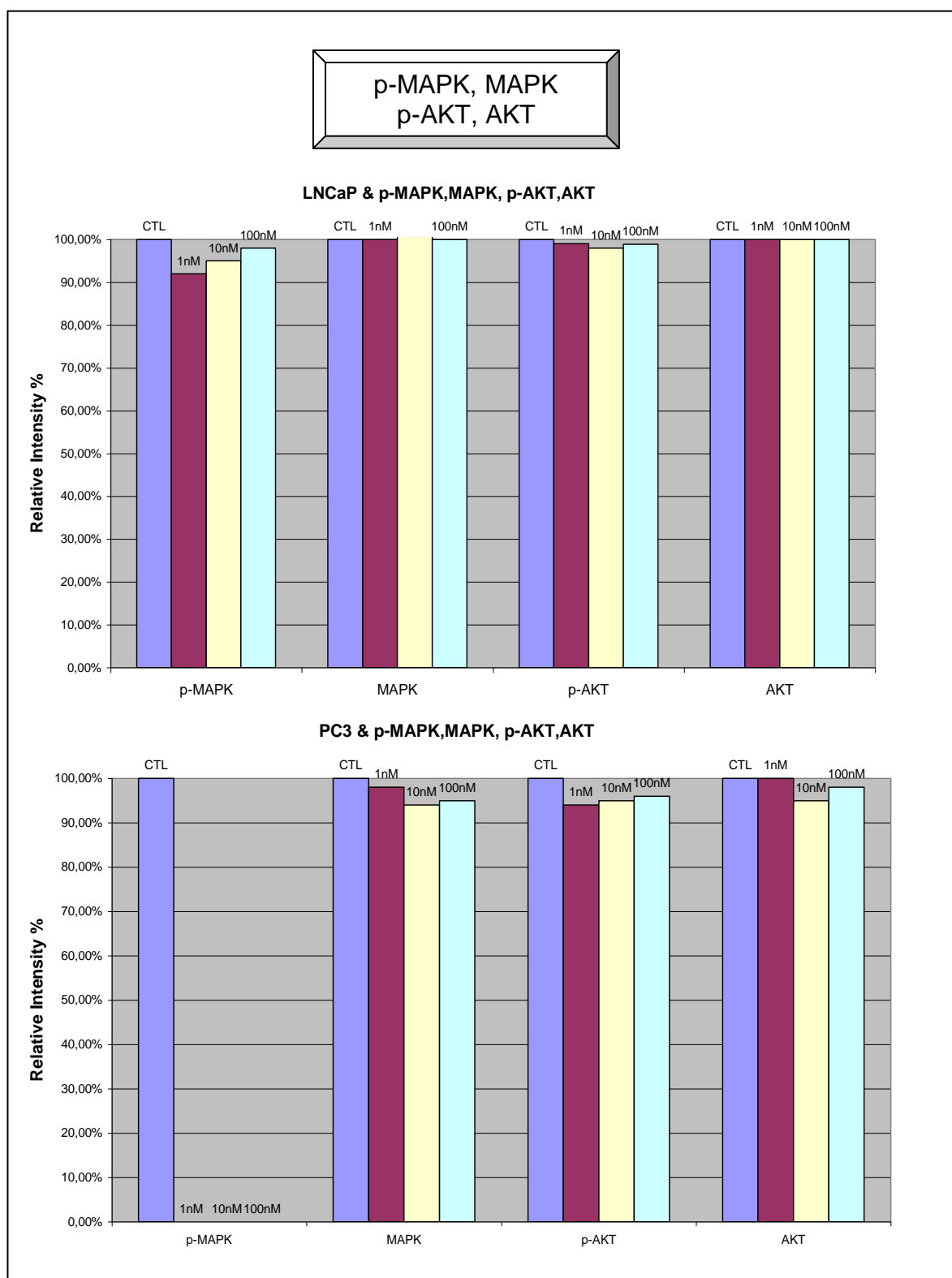
Εικόνα 28. Ανάλυση RT-PCR στα IL-8 και VEGF, γονίδια στόχους του NFκB, στα LNCaP και στα PC3 κύτταρα σε σύγκριση με το γονίδιο GAPDH και για τις δυο σειρές. Η σειρά φαρμάκων είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση βομβεσίνη 100nM για 24 ώρες, τρίτη θέση ενδοθηλίνη-1 100nM για 24 ώρες, τέταρτη θέση μπορτεζομίμη 1μM για 24 ώρες.

Η μπορτεζομίμπη εμποδίζει τη δράση της MAPK και στα ανδρογόνο-ανεξάρτητα και στα ανδρογόνο-εξαρτώμενα κύτταρα.

Στην προσπάθεια να είναι πιο εμφανής ότι η κυτταροτοξική δράση της μπορτεζομίμπη, σχετίζεται κατά ένα μέρος με την αναστολή των νευροπεπτιδίων, προσπαθήσαμε να αναζητήσουμε εάν η μπορτεζομίμπη επηρεάζει την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της AKT και της p44/42 MAPK, που ως γνωστόν ενεργοποιούνται από τα νευροπεπτίδια. Παρόλο, που δεν υπάρχει σημαντική μείωση των επιπέδων του p-Akt, μια σημαντική μείωση της φωσφορυλιωμένης p44/42 MAPK παρατηρείται. Αυτό είναι πιο εμφανές στην PC3 κυτταροσειρά που μια ελάχιστη δόση 1 nM είναι αρκετή να καταργήσει την φωσφορυλίωση της MAPK και αυτό το αποτέλεσμα διατηρείται και όταν χορηγείτε μπορτεζομίμπη, ενώ η LNCaP κυτταροσειρά εμφανίζει μια δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της MAPK (εικόνα 29 - 30).



Εικόνα 29. Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων από LNCaP και PC3 κύτταρα με τη χορήγηση μορτεζομίμπης, για 16 ώρες σε αυξανόμενη συγκέντρωση, για p-MAPK, MAPK, p-Akt και Akt. Από αριστερά προς δεξιά: βασικές συνθήκες, χορήγηση μορτεζομίμπης για 16 ώρες σε αυξανόμενη συγκέντρωση (1 nM, 10 nM, 100 nM).



Εικόνα 30. Ανάλυση western blotting με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ με τη χορήγηση μορτεζομίνης, για 16 ώρες σε αυξανόμενη συγκέντρωση. Από αριστερά προς δεξιά για κάθε τετράδα πρωτεΐνης (p-MAPK, MAPK, p-AKT, AKT): βασικές συνθήκες, χορήγηση μορτεζομίνης για 16 ώρες σε συγκέντρωση 1 nM, 10 nM, 100 nM, αντίστοιχα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μετατροπή των προστατικών κυττάρων σε ανδρογόνο-ανεξάρτητα εμπεριέχει αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με όλους εκείνους τους παράγοντες, που σχετίζονται τόσο με την κυτταρική ανάπτυξη όσο και με την καταστολή του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και των παραγόντων PTEN και HER-2/neu, που ενεργοποιεί το μονοπάτι της PI3K/AKT, το οποίο με τη σειρά του μπλοκάρει την προαποπτωτική δράση των πρωτεϊνών Bad και p27, ενώ από την άλλη ενεργοποιεί τον παράγοντα NFκB που οδηγεί στην επιβίωση του κυττάρου (300). Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού του NFκB, το οποίο κυρίως εξαρτάται από το σύστημα πρωτεασώματος - ουβικουΐνης, αποτελεί σημείο κλειδί, το οποίο είναι ενεργοποιημένο κατά τη διάρκεια της πρώιμου καρκίνου του προστάτη, τόσο *in vitro* (301) όσο και *in vivo* (302) και αποτελεί σημαντικό παράγοντα της μετατροπής των καρκινικών κυττάρων σε ανδρογόνο-ανεξάρτητα (303).

Η φαρμακολογική αναστολή του πρωτεασώματος με τη χρήση μπορτεζομίμπης έχει σημαντικά αποτελέσματα τόσο στον ανδρογόνο-ανεξάρτητο όσο και στον ανδρογόνο-εξαρτώμενο καρκίνο σε προκλινικά μοντέλα (102, 304-305). Η αντικαρκινική δράση της μπορτεζομίμπης στα προστατικά κύτταρα έχει προταθεί ότι επιτελείται μέσω της αύξησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου και του p53 και του p21 (305), σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών και πρωτεϊνών, κυρίως του NFκB και των στόχων του, συμπεριλαμβανομένου, αλλά όχι μόνο, της IL-8, του VEGF και της IL-6 (279, 305). Σύμφωνα, με μια πρόσφατη *in vitro* έρευνα, η συνχορήγηση στα ανδρογονοανεξάρτητα προστατικά κύτταρα (PC3) μπορτεζομίμπης και ντοσεταξέλης, είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της επαγόμενης από την ντοσεταξέλη παραγωγή IL-6 μέσω της αναστολής του NFκB (306). Μια φάσης 1 έρευνα, που υπολόγιζε εβδομαδιαία την μπορτεζομίμπη για να εξετάσει τη μέγιστη δόση μπορτεζομίμπης που είναι ανεκτή σε ασθενείς με ανδρογόνο-ανεξάρτητο καρκίνο έδειξε ότι το φάρμακο έχει μια βιολογική ενεργότητα και αποκάλυψε μια συσχέτιση μεταξύ της δόσης του φαρμάκου, της αναστολής του πρωτεασώματος και της μείωσης της IL-6, σαν αποτέλεσμα της μείωσης του παράγοντα NFκB (225). Συχνά, ο παράγοντας TRAIL, που ανήκει στην μεγάλη οικογένειας TNF, εμφανίζει ένα συνεργικό προαποπτωτικό ρόλο με

την μπορτεζομίμπη (307-309) στα προστατικά κύτταρα, το οποίο έχει αποδοθεί στη μέσω της μπορτεζομίμπης Α) αύξησης των επιπέδων των υποδοχέων TRAIL, DR4 και DR5, λόγω της αύξησης τόσο της πρωτεΐνης DR5 (310) όσο και της αύξησης της σταθερότητας του mRNA της DR5 (311), Β) στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών που εμφανίζουν BH3 δομές Bik και Bim (312) και Γ) την αύξηση του p21, αναστολέα των CDK κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες CDKs, και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 (313). Επίσης ένας ρόλος του TNF-α έχει αποδειχτεί ότι είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης VCAM1 μετά από τη σύνδεση των συμπλοκών p65-p50 NFκB σε δυο περιοχές του προαγωγέα του VCAM1 (314).

Στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε εάν η αναστολή του πρωτεασώματος από την μπορτεζομίμπη, που σε ένα σημαντικό βαθμό αλλά όχι εξολοκλήρου συσχετίζεται με το ρύθμιση του NFκB, έχει επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη που προκαλούν τα νευροπεπτίδια. Αρχικά, αποδείξαμε ότι η βομβεσίνη και η ET-1 προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη, σε σημαντικότερο βαθμό όμως στα ανδρογόνο-ανεξάρτητα προστατικά κύτταρα (PC3) σε σχέση με τα ανδρογόνο-εξαρτώμενα (LNCaP). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την έλλειψη έκφρασης του NEP και την ανικανότητα επομένως των προστατικών κυττάρων να διασπούν τα νευροπεπτίδια (315), καθιστώντας τα PC3 κύτταρα πιο ευαίσθητα στην κυτταρική ανάπτυξη που προκαλείται από τα νευροπεπτίδια σε σχέση με τα LNCaP. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώσαμε ότι η αναστολή του πρωτεασώματος από την μπορτεζομίμπη προκαλεί απόπτωση τόσο στα LNCaP όσο και στα PC3 κύτταρα, καθώς και μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη, επίσης πιο εμφανή στα PC3 κύτταρα. Συνεπώς, η ικανότητα του αναστολέα του πρωτεασώματος να προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και της απόπτωσης στα προστατικά κύτταρα δεν γίνεται μόνο μέσω του μονοπατιού των ανδρογόνων, όπως έχει ήδη αποδειχτεί για τα LNCaP κύτταρα (305).

Μια σημαντική, παρατήρηση με θεραπευτικές επεκτάσεις είναι ότι η αναστολή που προκαλεί η μπορτεζομίμπη στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση διατηρείται ακόμα και όταν τα κύτταρα εκτείνονται παράλληλα και στα νευροπεπτίδια, αναστρέφοντας επομένως το αντιαποπτωτικό ρόλο των νευροπεπτιδίων. Η επίδραση που έχουν τα νευροπεπτίδια στην αντικαρκινική δράση που έχουν τα φάρμακα που προκαλούν απόπτωση έχει

μελετηθεί και για κάποια ακόμα χημειοθεραπευτικά. Σε αντίθεση με την μπορτεζομίμη, στην περίπτωση της ετοποσίδης, η βομβεσίνη προστατεύει τα PC3 κύτταρα από την απόπτωση με το να διατηρεί την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων (316). Σε μια άλλη εργασία η χορήγηση ET-1 τόσο στα LNCaP όσο και στα PC3 κύτταρα μειώνει σημαντικά την απόπτωση που προκαλεί η πακλιταξέλη (317). Ο συνδυασμός του αναστολέα του υποδοχέα A της ET-1 με ντοσεταξέλη που έγινε ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη απόπτωση, από ότι θα προκαλούσε το κάθε φάρμακο χωριστά από μόνο του και είχε σαν αποτέλεσμα μια πιο σημαντική αναστολή των LNCaP αλλά όχι των PC3 κυττάρων (318).

Σε μια προσπάθεια να εξηγήσουμε πως η μπορτεζομίμη εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη και τον αντιαποπτωτικό ρόλο των νευροπεπτιδίων, εξετάσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα μερικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στην κυτταρική απόπτωση, όπως είναι το p53, το p21, το p27 και το Bad, τα οποία είναι γνωστό ότι ελέγχονται άμεσα από το 26S πρωτεάσωμα. Η αναστολή του 20S πρωτεασώματος από την μπορτεζομίμη μπλοκάρει την αποδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών p53, p21, p27 και Bad και αυξάνει τα επίπεδα τους. Όσον αφορά το p21, αυτό δεν ανιχνεύεται σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης στα PC3 κύτταρα, καθώς αυτά τα κύτταρα έχουν μεταλλαγμένο p53 και επομένως είναι ανίκανα να ενεργοποιήσουν γονίδια στόχους του, όπως είναι το p21 (319). Η αύξηση των επιπέδων των προαναφερόμενων έχει να κάνει κυρίως με την ικανότητα του φαρμάκου να οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση και να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Εάν και δεν υπάρχει κάποιο πρότυπο μοντέλο για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του p53 και γενικά η κάθε μετάλλαξη επηρεάζει μοναδικά τη λειτουργία του p53 (320), ακόμα και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του p53 προκαλούν σημαντική απόπτωση (321). Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών p53, p21, p27 και Bad μετά τη χορήγηση μπορτεζομίμης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την συνχορήγηση νευροπεπτιδίων, ενώ η χορήγηση μόνο νευροπεπτιδίων οδήγησε στην μείωση αυτών των πρωτεϊνών, ειδικά στα ανδρογόνο-ανεξάρτητα κύτταρα.

Μια πιθανή εξήγηση για την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p53, p21, p27 και Bad από τα νευροπεπτιδία στα ανδρογόνο-ανεξάρτητα κύτταρα προέρχεται από τα πειράματά μας που αφορούν την πρωτεασωμική

δραστικότητα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νευροπεπτίδια είναι ικανά να αυξήσουν την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα PC3 κύτταρα και αυτή η ενεργοποίηση είναι υπεύθυνη για την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών p53, p21, p27 και Bad. Από την άλλη, τα LNCaP κύτταρα έχουν μεγαλύτερη έκφραση σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης αυτών των πρωτεϊνών σε σχέση με τα PC3 κύτταρα, καθώς και μικρή ή και καθόλου αλλαγή στην έκφραση τους μετά τη χορήγηση νευροπεπτιδίων. Αυτό έχει κυρίως να κάνει με δυο γεγονότα: 1) σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης υπάρχει λιγότερη πρωτεασωμική αποδόμηση αυτών των ρυθμιστών, σαν αποτέλεσμα της μικρότερης πρωτεασωμικής δραστηριότητας και 2) η δράση των νευροπεπτιδίων εμποδίζεται από την έκφραση της μεμβρανικής NEP που τα διασπά, και έτσι εμποδίζει τα σήματα αυτών των πρωτεϊνών που οδηγούν σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό (315).

Η χορήγηση νευροπεπτιδίων είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πυρηνικού NFκB στα PC3 κύτταρα αλλά όχι στα LNCaP κύτταρα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης. Επιπλέον αποδείξαμε ότι κάτι τέτοιο ισχύει, καθώς και για τα γονίδια στόχοι του NFκB, IL-8 και VEGF, έχουν μια αύξηση της έκφρασης τους σε μεγαλύτερο βαθμό στα PC3 παρά στα LNCaP κύτταρα με τη χορήγηση νευροπεπτιδίων. Όταν χορηγήσαμε μμπορτεζομίμπη και οι δυο κυτταροσειρές είχαν μειωμένη έκφραση IL-8 και VEGF και μάλιστα σε επίπεδο πιο χαμηλό από το επίπεδο έκφρασης τους σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης. Αυτά τα αποτελέσματα επέκτειναν τις παρατηρήσεις των Levine et al. που απέδειξαν ότι στα PC3 κύτταρα η βομβεσίνη προκαλεί μια χρόνο-εξαρτώμενη σύνδεση του NFκB με το DNA, η οποία συνδυάζεται με την πυρηνική μετατόπιση της πρωτεΐνης και την παραγωγή IL-8 και VEGF μεταγραφημάτων (183). Το μονοπάτι του NFκB είναι ένας σημαντικός στόχος της αναστολής του πρωτεάσωματος σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Η κυτταροσειρά PC3 φαίνεται να έχει περισσότερο ενεργό NFκB και να είναι πιο ευαίσθητη στο πρωτεάσωμα από ότι η LNCaP κυτταροσειρά. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα νευροπεπτίδια προκαλούν την αύξηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας δεν είναι γνωστός. Είναι πιθανόν τα νευροπεπτίδια να αυξάνουν τα επίπεδα του IκBa και αυτό να έχει σαν αποτέλεσμα το πρωτεάσωμα να έχει περισσότερα υποστρώματα να αποδομήσει. Από την άλλη, μια άμεση επίδραση των νευροπεπτιδίων με το

πρωτεάσωμα ή μια αύξηση των υποστρωμάτων του συστήματος του πρωτεασώματος από τα νευροπεπτίδια δεν μπορεί να αποκλειστεί και θέλει ακόμα περισσότερη διερεύνηση.

Έχουμε προηγουμένως αποδείξει ότι κατά τη μετατροπή των κυττάρων σε ανδρογόνο-ανεξάρτητα με την απώλεια της δραστηριότητας του μεμβρανικού NEP επιβιώνουν και αυξάνονται σε ένα περιβάλλον με αυξημένη παρακρινική έκκριση νευροπεπτιδίων, όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα ET-1 σε υπερκείμενο καλλιέργειας PC3 κυττάρων (αντιπροσωπεύοντας το ανδρογόνο-ανεξάρτητο *in vitro* μοντέλο) (315) σε σχέση με τα LNCaP (αντιπροσωπεύοντας το ανδρογόνο-εξαρτώμενο *in vitro* μοντέλο). Επιπρόσθετα προηγούμενα δεδομένα έχουν αποδείξει τη σχέση μεταξύ των σημάτων των νευροπεπτιδίων που οδηγούν στην επιβίωση και την ενεργοποίηση των μονοπατιών της Akt και της MAPK (77, 298-299, 322). Όταν εξετάσαμε την επίδραση της μμπορτεζομίμπης σε αυτά τα μονοπάτια παρατηρήσαμε ότι ακόμα και σε χαμηλές δόσεις η ενεργοποίηση της MAPK μέσω φωσφορυλίωσης μειώνεται τόσο στην ανδρογόνο-ανεξάρτητη όσο και ανδρογόνο-εξαρτώμενη κυτταροσειρά. Μια πρώιμη και διαρκή μείωση της φωσφορυλιωμένης MAPK παρατηρήθηκε στα PC3 κύτταρα σε σχέση με τα LNCaP, τα οποία παρουσιάζουν μια λιγότερο μόνιμη δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων p-MAPK. Αυτό συμβαδίζει με την μειωμένη άθροιση του NFκB στα PC3 κύτταρα και με τα δεδομένα που αφορούν την ενεργοποίησης της MAPK μέσω του NFκB (323). Το μονοπάτι της Akt επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από την μμπορτεζομίμπη και στις δυο σειρές, πιθανός λόγω του γεγονότος ότι και οι δυο κυτταροσειρές εμφανίζουν μια υπερενεργοποίηση του Akt σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης σαν αποτέλεσμα του μεταλλαγμένου PTEN που έχουν (157). Είναι αδύνατον τώρα να ειπωθεί εάν η μμπορτεζομίμπη μπλοκάρει άμεσα αυτά τα μονοπάτια (π.χ. σαν ένας αναστολέας κινασών) ή έμμεσα μέσω της αλλαγής της σταθερότητας άλλων υποστρωμάτων του πρωτεασώματος.

Συνοπτικά τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες που τα νευροπεπτίδια αφθονούν η ικανότητα των ανδρογόνο-ανεξάρτητων κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και να επιβιώνουν έχει να κάνει με την υπερενεργοποίηση του συστήματος πρωτεασώματος-ουβικουτίνης (UPS), το οποίο αποδεικνύεται από την αύξηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας του

20S πρωτεασώματος, το οποίο με τη σειρά του μειώνει τα επίπεδα πρωτεϊνών που είναι υπόστρωμα για το πρωτεάσωμα και είναι σημαντικά για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, όπως το p53, το p21, το p27 και το Bad. Τα νευροπεπτιδία προάγουν τη μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα το οποίο μεταγραφικά ενεργοποιεί προαγγειογενετικούς παράγοντες (IL-8, VEGF). Η μπορτεζομίμη μειώνει την επίδραση των νευροπεπτιδίων στην κυτταρική ανάπτυξη μέσω της σταθεροποίησης προαποπτωτικών υποστρωμάτων του πρωτεάσωματος και την αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης του NFκB και μεταγραφικής δραστηριότητας. Περιέργως η δράση της μπορτεζομίμης έχει επιπρόσθετα να κάνει με την αναστολή του μονοπατιού της MAPK που είναι ένα σημαντικό κομμάτι του σήματος των νευροπεπτιδίων, μεσολαβώντας με το μιτογονικό και αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα των νευροπεπτιδίων στα προστατικά κύτταρα (298-299).

Σε κλινικό επίπεδο δεν υπάρχουν φάσης II μελέτες που να έχουν αποδείξει σημαντική αντικαρκινική δράση της μπορτεζομίμης σε ασθενείς είτε όταν χρησιμοποιείται μόνη της είτε μαζί με χημειοθεραπευτικά ή πρεδνιζολόνη (324-326). Μια καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που έχουν να κάνουν με την αντικαρκινική δράση της μπορτεζομίμης σε σχέση με τη δράση των νευροπεπτιδίων μπορεί να ενισχύσει ακόμα πιο πολύ την εξέταση τους σε κλινικό επίπεδο στον ανδρογόνο-ανεξάρτητο καρκίνο του προστάτη, πιθανώς στο πλαίσιο μιας συνδυασμένης στόχευσης στον άξονα των νευροπεπτιδίων και του συστήματος του πρωτεασώματος-ουβικουτίνης (UPS).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την πειραματική ανάλυση που έγινε στην ανδρογόνο-εξαρτώμενη, LNCaP, και στην ανδρογόνο-ανεξάρτητη, PC3,προστατική κυτταροσειρά με τη χρήση διαφόρων φαρμάκων μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η χρήση βομβεσίνης κυρίως, και ενδοθηλίνης σε μικρότερο βαθμό προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
2. Η βομβεσίνη αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μεγαλύτερο βαθμό, πιθανώς γιατί έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τους υποδοχείς GRP-R από ότι ET-1.
3. Η PC3 κυτταροσειρά είναι πιο ευαίσθητη στα νευροπεπτίδια και στην μπορτεζομίμη, καθώς έχει και πιο αυξημένη πρωτεασωμική δραστηριότητα.
4. Η χορήγηση μπορτεζομίμης μειώνει την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα PC3 κατά 50% περισσότερο από ότι στα LNCaP.
5. Η αναστολή του πρωτεασώματος από την μπορτεζομίμη μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξάνει την κυτταρική απόπτωση και στις δυο σειρές.
6. Ακόμα και με τη χρήση των νευροπεπτιδίων η μπορτεζομίμη αυξάνει τα επίπεδα των αναστολέων των CDKs p21 και p27, και της αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 και στις δυο σειρές. Τα νευροπεπτίδια μειώνουν p21, το p53, το p27 και το Bad που είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος μέσω της αύξησης της πρωτεασωμικής δραστηριότητας.
7. Το εντοπισμένο πυρηνικά NF-kB είναι περισσότερο στα PC3 σε σχέση με τα LNCaP και τα νευροπεπτίδια οδηγούν στην περαιτέρω αύξηση του μέσω της αύξησης της πρωτεασωμικής δραστηριότητας.
8. Τα γονίδια στόχοι του NFkB, IL-8 και VEGF, εκφράζονται και στις δυο κυτταροσειρές και η χρήση νευροπεπτιδίων αυξάνει την έκφραση τους, ενώ η χρήση μπορτεζομίμης τα ελαττώνει.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων ενισχύει την άποψη ότι το πρωτεάσωμα και ο μεταγραφικός παράγοντας NFkB συνδέονται και ότι η αναστολή του μπλοκάρει την κυτταρική ανάπτυξη ακόμα και με τη χρήση νευροπεπτιδίων. Τέλος, ο ανδρογόνο-ανεξάρτητος καρκίνος είναι πιο ευαίσθητος στην αναστολή κυρίως λόγω της έλλειψης NEP, που είναι το ένζυμο που απενεργοποιεί τα νευροπεπτίδια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα νευροπεπτίδια είναι σημαντικοί υποκινητές στον προχωρημένο καρκίνο του προστάτη (PC), δρώντας κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού διμερή παράγοντα NFκB. Σημαντικό στοιχείο στη ρύθμιση του NFκB είναι το σύστημα πρωτεασώματος-ουβικουΐνης (UPS), η φαρμακολογική αναστολή του οποίου έχει προταθεί σαν αντικαρκινική θεραπεία. Μελετήσαμε τον υποθετικό ρόλο του αναστολέα πρωτεασώματος μπορτεζομίμη στην επίδραση των νευροπεπτιδίων, στα LNCaP και στα PC3 κύτταρα, που αποτελούν μοντέλα ανδρογόνο-ανεξάρτητου και ανδρογόνο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη.

Μέθοδοι: Εξετάσαμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα συνολικά επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (caspase-3, Bad) και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (p53, p21, p27), του συνολικού και του φωσφορυλιωμένου Akt, την p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), την πρωτεασωματική δραστηριότητα του 20S, την κυτταρική εντόπιση του NFκB και την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του NFκB, IL-8 και VEGF.

Αποτελέσματα: Τα νευροπεπτίδια (ενδοθελίνη-1 και βομβεσίνη) αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις προστατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές LNCaP και PC3, ενώ η μπορτεζομίμη μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλεί κυτταρική απόπτωση, ένα αποτέλεσμα που διατηρείται ακόμα και όταν στα κύτταρα συνχορηγούνται τα νευροπεπτίδια. Οι πρωτεΐνες Bad, p53, p21 και p27 μειώνονται με τη χρήση των νευροπεπτιδίων στη PC3 κυτταροσειρά, ενώ τα αποτελέσματα αναστέλλονται όταν στα κύτταρα προστεθεί η μπορτεζομίμη. Τα νευροπεπτίδια αυξάνουν την πρωτεασωματική δραστηριότητα και τα επίπεδα του πυρηνικού NFκB στη PC3 κυτταροσειρά και αυτά τα αποτελέσματα αναστέλλονται από την μπορτεζομίμη. Τα γονίδια στόχοι του NFκB, IL-8 και VEGF αυξάνονται με τη χρήση των νευροπεπτιδίων και μειώνονται με τη χρήση μπορτεζομίμης. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την ικανότητα της μπορτεζομίμης να μειώνει την ενεργοποίηση της MAPK και στις δυο κυτταροσειρές .

Συμπέρασμα: Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε αρμονία με την ικανότητα της μπορτεζομίμης να αντιστρέφει τον αντί-αποπτωτικό και αυξητικό ρόλο των νευροπεπτιδίων, αποκαλύπτοντας μια όχι τόσο καλά μελετημένη

επίδραση του φαρμάκου στον άξονα των νευροπεπτιδίων, το οποίο μοντέλο λειτουργίας στα προστατικά κύτταρα μπορεί να έχει να κάνει με τη συμμετοχή του πρωτεασώματος.

ABSTRACT

Objectives: Neuropeptides (NPs) are important signal initiators in advanced prostate cancer (PC), acting partially through activation of nuclear factor kappa B (NFκB). Central to NFκB regulation is the ubiquitin-proteasome system, pharmacological inhibition of which has been proposed as anticancer strategy. We investigated the putative role of the proteasome inhibitor bortezomib in NP signaling effects on LNCaP and PC-3 cells, modelling androgen-dependent and -independent PC states.

Methods: We examined cell proliferation, total protein levels of proapoptotic (caspase-3, Bad) and cell cycle regulatory proteins (p53, p27, p21), total and phosphorylated Akt and p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) proteins, 20S proteasome activity, subcellular localization of NFκB and transcription of NFκB target genes interleukin-8 (IL-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF).

Results: NPs (endothelin-1, bombesin) increased proliferation of LNCaP and PC-3 cells, while bortezomib decreased proliferation and induced apoptosis, an effect maintained after cotreatment with NPs. Bad, p53, p21 and p27 were downregulated by NPs in PC-3, and these effects were reversed with the addition of bortezomib. NPs increased proteasomal activity and nuclear NFκB levels in PC-3, and these effects were prevented by bortezomib. IL-8 and VEGF transcripts were induced after NP treatment but downregulated by bortezomib. These results coincided with the ability of bortezomib to reduce MAPK signaling in both cell lines.

Conclusions: The above results are consistent with bortezomib-mediated abrogation of NP-induced proliferative and antiapoptotic signaling, revealing a not so well investigated effect of the drug on the NP axis, whose mode of function in PC might entail involvement of the proteasome.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Gamick MB, Fair WR:** Prostate cancer emerging concepts. *Parti Ann Intern Med* 125:118,1996
2. **Humphry PA, Awlther PJ:** Adenocarcinoma of the prostate. Part II *Tissue prognosticators Am J Clin Pathol* 100:253, 1993
3. **Sorlie t, Perou CM, Tibshirani R, et al.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumos subclasses with clinical implincations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869
4. **Dhanasekaran SM, Barrete TR, Ghosh D, et. Al.** Delincation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412:822
5. **Singh D, Febbo Pg, Ross K, et al.** Gene expression correlates of clinical prostate cancer behaviour. *Cancer Cell* 2002;1:203
6. **LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, et al.** Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programas associated with metastatic disease. *Cancer Res* 2002;62:4499
7. **Lapointe J, Li C, Higgins JP, et al.** Gene expression profiling identities clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Nalt Acad Sci USA* 2004;104:811
8. **Liu W, Chang B, Sauvageot J, et al.** Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cacer using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancers* 2006;45:1018
9. **Feldman BJ, Feldman D.** The development of androgen - independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34
10. **Taplin ME, Balk SP.** Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone idependence. *J Cell Biochem* 2004;91:483
11. **Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB.** Prostate cancer. *N.Engl J Med* 2003;349:366
12. **Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G, Turner A.J.** *J. Biol. Chem.* 2000:275; 33238
13. **Matsas R., Turner A.J., Kenny A.J.** *Biochem. J.* 1984:223;433
14. **Shipp M.A., Tarr G.E., Chen C.Y., Switzer S.N., Hersh L.B., Stein H., Sunday M.E., Reinherz E.L.** CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes

bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88:10662– 10666.

15. **Bologna M, Festuccia C., Muzi P., Biord L., Ciomei M.** Bombesin stimulates growth of human prostatic cells in vitro. *Cancer* 1989;63:1714

16. **Seghal I., et al.** Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated in human prostate cancer. *Proc Natl. Acad. Sci.* 1994;91:4673

17. **Nelson J.B., et al.** Endothelin- production and decreased endothelin B receptor in advanced prostate cancer. *Cancer Res.*1996;56:663

18. **Kenny A.J, O'Hare M.J, Gusterson B.A.** Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation *Lancet*1989;2:785

19. **Shipp M.A, Look A.T.** Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: Cutting is the key! *Blood* 1993;84:1052

20. **Sehgal I., Powers S., Huntley B., Powis G., Pittelkow M., Maihle N.J.,** Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:4673.

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

22. **Nelson J.B., Carducci M.A.,** Small bioactive peptides and cell surface peptidases in androgen-independent prostate cancer, *Cancer Investig.* 2000: 18;87– 96.

23. **Albrecht M., Mittler A., Wilhelm B., Lundwall A., Lilja H., Aumuller G., Bjartell A.** Expression and immunolocalisation of neutral endopeptidase in prostate cancer. *Eur. Urol.* 2003;44: 415

24. **Freedland S.J., Seligson D.B., Liu A.Y., Pantuck A.J., Paik S.H., Horvath S., Wieder J.A., Zisman A., Nguyen D., Tso C.L., Palotie A.V., Belldegrun A.S.,** Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer, *Prostate* 2003;55: 71.

25. **Papandreou C.N., Usmani B., Geng Y., Bogenrieder T., Freeman R., Wilk S., Finstad C.L., Reuter V.E., Powell C.T., Scheinberg D., Magill C., Scher H.I., Albino A.P., Nanus D.M.,** Neutral endopeptidase loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression, *Nat. Med.* 1998;4:50-57.

26. **Ganju R.K., Shpektor R.G., Brenner D.G., Shipp M.A.** CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src-related kinase, *Blood* 1996: 88;4159–4165.
27. **Angelisova P., Drbal K., Horejsi V., Cerny J.** Association of CD10/neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase [letter], *Blood* 1999;93;1437– 1439.
28. **Cutrona G., Leanza N., Ulivi M., Melioli G., Burgio V.L., Mazzarello G., Gabutti G., Roncella S., Ferrarini M.** Expression of CD10 by human Tcells that undergo apoptosis both in vitro and in vivo. *Blood* 1999: 94;3067– 3076.
29. **Satterthwaite A.B., Lowell C.A., Khan W.N., Sideras P., Alt F.W., Witte O.N.** Independent and opposing roles for Btk and lyn in B and myeloid signaling pathways, *J. Exp. Med.* 1998;188;833-844.
30. **Craxton A., Jiang A., Kurosaki T., Clark E.A.** Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt, *J. Biol. Chem.* 1999;274;30644–30650.
31. **Stambolic V., Suzuki A., De la Pompa J.L., Brothers G.M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P., Mak T.W.,** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN, *Cell* 1998;95;29– 39.
32. **Carson J.P., Kulik G., Weber M.J.** Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3V-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res.* 1999;59;1449-1453
33. **LI J., Yen C., Liaw D., et al.** PTEN, a potative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275;1943
34. **Kwabi-Addo B., Giri D., Schmidt K., et al.** Haploinsufficiency of the PTEN tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98;10314
35. **Cantley L.C.** The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science* 2002;296;1655– 1657

36. **Vazquez F., Ramaswamy S., Nakamura N., Sellers W.R.** Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:5010– 5018
37. **Sumitomo M., Shen R., Nanus M.N.** Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic proression. *Science* 2004;1751;52-59
38. **Rao G.N., Delafontaine P., Runge M.S.** Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270; 27871-27875.
39. **Sumitomo M., Milowsky M.I., Shen R., Navarro D., Dai J., Asano T., Hayakawa M., Nanus D.M.** Neutral endopeptidase inhibits neuropeptide-mediated transactivation of the insulin-like growth factor receptor-akt cell survival pathway. *Cancer Res.* 2001;61; 3294-3298.
40. **Sumitomo M., Shen R., Walburg M., Dai J., Geng Y., Navarro D., Boileau G., Papandreou C.N., Giancotti F.G., Knudsen B., Nanus D.M.** Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling, *J. Clin. Invest.* 2000;06;399-1407.
41. **Li Q., Verma IM.** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.
42. **Sen R., Baltimore D.** Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47; 921-928.
43. **Pomerantz JL, Baltimore D.** Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 2002;10: 693.
44. **YangJ., Lin Y., Guo Z., Cheng J., Huang J., Deng L., Liao W, Chen Z., Liu Z., Su B.** The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB aactivation. *Nat Immunol* 2001;7; 620-624
45. **Chen Z, et al.** Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitinproteasome pathway. *Genes Dev* 1995;9:1586.
46. **Xiao G, Harhaj EW, Sun SC.** NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 2001;7: 401
47. **Senftleben U, et al.** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001;293:1495

48. **Sharama HW, Narayanan R.** The NF-kappaB transcription factor in oncogenesis. *Anticancer Res.* 1996;16; 589-596.
49. **Waddick KG, Uckun F.** Innovative treatment programs against cancer II Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) as a molecular target. *Biochem Pharmacol* 199;57: 9-17
50. **Wang TH, Wang HS.** p53, apoptosis and human cancers. *J Formos Med Assoc* 1996;95; 509-521
51. **Van Antwerp DJ, Martin Sj., Kafri T., Green DR, Verma IM.** Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;95;787-789
52. **Giri DK, Aggarwal BB.** Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1998;273;14008
53. **Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Sledge GW.** Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 1997;17;3629
54. **Loch T, Michalski B, Mazurek U, Graniczka M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in neoplastic processes. *Postepy Hig Med Dosw.* 2001;55; 257-274
55. **Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K.** Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6: 3282-3289
56. **Oyama T, Sakuta T, Matsushita K, Maruyama I, Nagaoka S, Torii M.** Effects of roxithromycin on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular endothelial growth factor expression in human periodontal ligament cells in culture. *J Periodontol* 2000; 71:1546-1553
57. **Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, Alitalo K.** Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor. Alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990;171: 35-47.
58. **Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubu T.** NF-kappa B and Sp1

regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 1994;153:2052-2063

59. **Van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, et al.** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and tumor necrosis factor alpha mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 1994;269: 6185-6192

60. **Whelan J, Ghera P, Gray J, et al.** An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 2645-2653.

61. **Lademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, et al.** Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM). *J. Biol, Chem* 1992;267:16323-16329

62. **Chen ZJ.** Ubiquitin signalling in the NF-κB pathway. *Nature Cel Biol.* 2005; 7: 758-765

63. **Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994;79: 13-21

64. **Brooks P., Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K., Dyson J, Rivett Aj.** Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 2000;346: 155-161

65. **Baumeister W, Cejka Z, Kania M, Seemuller E.** The proteasome a macromolecular assembly designed to confine proteolysis to a nanocompartment. *Biol Chem* 1997;378: 121-130

66. **Lupas A, Flanagan JM, Tanura T, Baumeister W.** Self-compartmentalizing proteases. *Bio Chem* 1997; 378: 121-130

67. **Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E.** The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998;92: 367-380

68. **Choi J, Park SY, Costantini F, Jho E-h, Joo C-K.** Adenomatous polyposis coli is down-regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in a process facilitated by axin. *J Biol. Chem.* 2004; 279: 49188-49198

69. **Aoki M, Jiang H, Vogt PK.** Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 13613-1361790.
70. **Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** Mule ARF-BPI, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mc1-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005; 121: 1085-95
71. **Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM.** Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; 92:645-5678.
72. **Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang Y -C, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Bottinger EP.** Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 6686-6691
73. **Yang Y-C, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, Pavlidis P, Kucherlapati R, Roberts AB, Bottinger EP.** Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 10269-10274
74. **Blanchette F, Rivard N, Rudd P, Grondin F, Attisano L, Dubois CM.** Cross talk between p42/p44 MAP Kinase and Smad pathways in transforming growth factor- β 1-induced furin gene transactivation. *J Biol. Chem*. 2001; 276: 33986-33994
75. **Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Vtsunomiya J, Kuroki T, Mori T.** Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999; 18: 3098-3103
76. **Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, KinZler KW, Vogelstein B.** Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995; 55: 5548-5550
77. **Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK.** Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res*. 1999; 59: 320-324

78. **Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kiw H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L.** MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-52
79. **Yu J, Zhang L.** The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 851-8
80. **Yo J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 14517-22
81. **Roperch J-P, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron M-C, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A.** SIAH-I promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21^{Waf1}. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8070-8073
82. **Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, LeGall I, Medhioub M, Linares-cruz G, Lethrosne F, Pasturaud P, Piouffre L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseau P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Bruzzoni-Giovanelli H, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D, Telerman A.** Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3953-3957
83. **Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W.** ARF-BPI/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 2005; 121: 1071-1083
84. **Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** Mute ARF-BPI, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005; 121: 1085-95
85. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003; 112: 779-91

86. **Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM.** The ubiquitin ligase COP is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; 429: 86-92
87. **Shmueli A, Oren M.** Life, death, and ubiquitin: Taming the mule. *Cell* 2005; 121: 963-5
88. **Kohn KW, Pommier V.** Molecular interaction map of the p53 and mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 816-827
89. **Coutts AS, La Thangue NB.** The p53 response: Emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 778-785
90. **Liu J., Stevens J., Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N.** Siah-1 mediates a novel β -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell.* 2001; 7: 927-936
91. **Nakayama K, Ronai Z.** Siah new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* 2004; 3: 1345-1347
92. **Iacopetta B.** TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003; 21: 271-276
93. **Janne PA, Mayer RJ.** Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1960-1968
94. **Wolf DH, Hilt W, Sommer T.** Death gives birth to life: the essential role of the ubiquitin-proteasome system in biology. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 1-2
95. **Pickart CM.** Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004; 116: 181-90.
96. **Chau V, et al.** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; 243: 1576-83
97. **Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C.** Protein quality control; U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 368-75
98. **Welehan RL, Gordon C, Mayer RJ.** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 599-609
99. **Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C.** CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 42938-42944
100. **Piekart CM.** Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004; 116: 181-90

101. **Hershko A.** Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:788-799
102. **King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW.** How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996;274: 1652-1659
103. **Wang X, Luo H, Chen H, Duguid W, Wu J.** Role of proteasomes in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 1998;160:788-801
104. **Spataro V, Norbury C, Harris AL.** The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *BrJ Cancer* 1998;77:448-455
105. **Murray RZ, Norbury C.** Proteasome inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Drugs* 2000;11:407-417
106. **Karin M, Ben - Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663
107. **Reed JC.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1415-1430
108. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16
109. **Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424
110. **Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-1042
111. **Voutsadakis IA.** Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma. *Acta Oncol.* 2000; 39: 151-156
112. **Vaux DL, Silke J.** IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 287-297
113. **Ni T, Li W, Zou F.** The ubiquitin ligase ability of IAPs regulates apoptosis. *IUBMB Life* 2005; 57: 779-785
114. **Yang Y, Yu X.** Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J* 2003; 17: 790-779
115. **Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee R-A, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES.** A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; 410: 112-116

116. **Vaux DL, Silke J.** HtrA2/Omi, a sheep in wolfs clothing. *Cell* 2003; 115: 251-253
117. **Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi V.** Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003; 11: 519-527
118. **MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM.** Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 36611-36616
119. **Tansey WP.** Death, destruction, and the proteasome. *N Engl J Med.* 2004; 351: 393-394
120. **Hegde R, Srinivasula SM, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang ZJ, Cheong NE, Nejme J, Fernandes-Alnemri T, Hoshino S, Alnemri ES.** The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 38699-38706
121. **Sun X-M, Butterworth M, MacFarlane M, Dubiel W, Ciechanover A, Cohen GM.** Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* 2004; 14: 81-93
122. **Adrain C, Creagh EM, Cullen SP, Martin SJ.** Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in drosophila and man. *J Biol. Chem.* 2004; 279: 36923-36930
123. **Friedman J, Xue D.** To live or die by the sword: The regulation of apoptosis by the proteasome. *Dev Cell* 2004; 7: 460-461
124. **Castro A, Vigneron S, Lorca T, Labbe J-C.** La mitose sous surveillance. *Med Sci.* 2003 ; 19 : 309-317
125. **Vodermaier HC.** APC/C and SCF: Controlling each other and the cell cycle. *Cur Biol.* 2004; 14: R787-796
126. **Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW.** On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 773-85
127. **Jackson PK.** Linking tumor suppression, DNA damage and the anaphasepromoting complex. *Trends Cell Biol.* 2004; 14: 331-334
128. **Piekart CM.** Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004; 116: 181-190
129. **Amerik A Y, Hochstrasser M.** Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 189-207

130. **Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W.** Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 2002; 416: 648-653
131. **Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ.** Role of Rpn11 metalloprotease motif in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; 298: 611-615
132. **Yao T, Cohen RE.** A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Nature* 2002; 419: 403-407
133. **Almond JB, Cohen GM.** The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:433-443
134. **Panago M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M.** Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999;154: 313-323.
135. **Lane D.P, Crawford L.V,** *Nature* 1979;278:231-263
136. **Linzer D.I, Levine A.J.** *Cell* 1979;17:43-52
137. **Hussain S.P, Harris C.C.** *Mutat. Res.* 1999;428:23-32
138. **Vogelstein B., Lane D., Levine A.J** *Nature* 2000;408:307-310
139. **Vousden K.H., Lu X.,** *Nat Rev. Cancer* 2002;2 :594-604
140. **Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L.,McArthur M.J., Montgomery Jr., Butel J.S., Bradley A.** *Nature* 1992;356:215-221
141. **Yu J, Zhang L.** The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 851-858
142. **Yo J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 14517-14522
143. **Roperch J-P, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron M-C, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A.** SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21^{Waf1}. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8070-8073
144. **Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, LeGall I, Medhioub M, Linares-cruz G, Lethrosne F, Pasturaud P, Piouffre**

- L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseau P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Bruzzoni-Giovanelli H, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D, Telerman A.** Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 3953-3957
145. **Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W.** ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 2005; 121: 1071-1083
146. **Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** Mule ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the p01yubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005; 121: 1085-1095
147. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003; 112: 779-791
148. **Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM.** The ubiquitin ligase COP is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; 429: 86-92
149. **Shmueli A, Oren M.** Life, death, and ubiquitin: Taming the mule. *Cell* 2005; 121: 963-965
150. **Sheikh M.S., Burns T.F., Huang Y., Wu G.S., Amundson S., Brook K.S., Fornace A. J. El-Deiry W.S.** *Cancer Res*. 1998;58:1953-1958
151. **Liu X., Yue P., Khuri F.R., Sun S.Y.** *Cancer Res* 2004;64:5078-5083
152. **Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman S.L., Gale P.R., Stremmel W, Oren M, Krammer P.H.** *J. Exp. Med* 1998;188:2033-2045
153. **Bouvard V., Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M., Choisy-Rossi C., Nieruchalski M., May E.** *Oncogene* 2000;19:649-660
154. **Miyashita T., Reed J.C.** *Cell*. 1995;80:293-299
155. **Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Kinzler K.W., Vogelstein B.** *Mol Cell* 2001;7:673682
156. **Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N.** *Science* 2000;288:1053-1058

157. **Samuels-Lev Y., O'Connor D.J., Bergamaschi D., Trigiante G., Hsieh J.K., Zhong S., Campargue I., Naumovsky L., Crook T., Lu X.** *Mol Cell* 2001;8:781-794
158. **Slee E.A., Lu X.,** *Toxicol. Lett.* 2003;139:81-87
159. **Shikama N., Lee C.W., France S., Delavaine L., Lyon J., Krstic-Demonacos M., La Thangue N.B.** *Mol. Cell* 1999;4:365-376
160. **Townsend P.A., Scarabelli T.M., Davidson S.M., Knight R.A., Latchman D.S., Stephanou A.** *J. Biol. Chem* 2004;279:5811-5820
161. **Herold S., Wanzel M., Beuger V., Frohme C., Beul D., Hillukkala T., Syvaaja J., Saluz H.P., Haenel F., Eilers M,** *Mol. Cell* 2002;10:509-521
162. **Chowdary D., Dermody J., Jha K., Ozer H.** Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol.* 1997; 14: 1997-2003
163. **Maki C., Huibregtse J. M., Howley P.M.** In vivo ubiquitination and proteasome - mediated degradation of p53. *Cancer Res.* 1996;14: 1997-2003.
164. **Ljungman M., Zhang F.F., Chen F., Rainbow A.J., McKay B.C.** Inhibition of RNA polymerase II as trigger for the p53 response. *Oncogene* 1999; 18: 583 - 592
165. **Chang Y.C., Lee Y.S., Tejima T., Tanaka K., Omura S., Heintz N.H., Mitsui Y., Magae J.** mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin - proteasome pathway. *Cell Growth Differ.* 1998; 9:79-84.
166. **Shinohara K., Tomioka M., Nakano H., Tone S., Ito H., Kawashima S.** Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J.* 1996; 317: 385-388
167. **Drexler H.C.** Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 1997; 94:855-860.
168. **Gazos L.U., Erhardt P., Yao R. Cooper G.** p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.*1997; 272: 12893-12896.
169. **Siliciano J.D., Canman C.E., Taya Y., Sakaguchi K.,Appella E., Kastan M.B.** DNA damage induces phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Genes Dev* 1997; 11: 3471-3481.
170. **Lain S., Midgley C., Sparks A., Lane E.B., Lane D.P.** An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of

HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp. Cell Res.* 1999; 248: 457-472.

171. **Maki C.G., Howley P.M.** Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 355-363.

172. **Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D.** p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366: 701-704.

173. **Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578.

174. **El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825.

175. **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B.** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497–501.

176. **Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D.** Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-3395

177. **Bissonnette N, Hunting DJ.** p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 1998; 16: 3461-3649.

178. **Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677.

179. **Gotoh A, Kao C, Ko SC, Hamada K, Liu TJ, Chung LW.** Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21 WAF1/CIP1 and p16CDKN4) in human prostate cancers. *J Urol* 1997; 158: 636-641.

180. **Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM.** Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* 1999; 39: 8–15.

181. **Osman I, Drobnjak M, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, Cordon-Cardo C.** Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2082-2088.

182. **Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J.** Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase

inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59–66.

183. **Massagué, J., Blain, S.W. & Lo, R.S.** TGF- β signalling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295–309

184. **Lian, J. et al.** Akt/PKB phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Med.* 2002; 8: 1153–1160.

185. **Shin, I. et al.** Akt/PKB mediates cell cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 on threonine157 and modulation of its cellular localization. *Nature Med.* 2002; 8: 1145–1152

186. **Viglietto, G. et al.** Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by Akt/PKB-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Med.* 2002; 8: 1136–1144

187. **Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, Signoretti S, Loda M, Sellers WR.** Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8969–8982.

188. **Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM.** AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; 404: 782–787.

189. **Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ.** Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9138–9148.

190. **Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM.** Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999;398:630–634.

191. **Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857–868.

192. **Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M.** SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999;1:193–199.

193. **Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M.** Role of the ubiquitin proteasome

pathway in regulating abundance of the cyclindependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269:682–685.

194. **Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H.** p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 1999;9:661–664.

195. **Mamillapalli R, Gavrilova N, Mihaylova VT, Tsvetkov LM, Wu H, Zhang H, Sun H.** PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKIP2). *Curr Biol* 2001;11:263–267.

196. **Andreu EJ, Lledo E, Poch E, Ivorra C, Albero MP, Martinez-Climent JA, Montiel-Duarte C, Rifon J, Perez-Calvo J, Arbona C, Prosper F, Perez-Roger I.** BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2005;65:3264–3272.

197. **Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, Pezzullo L, Palombini L, Fusco A, Viglietto G.** Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: Regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol* 2005; 166: 737 – 749.

198. **Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672–7.

199. **Alessandrini A, Chiaur DS, Pagano M.** Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* 1997; 11: 342–5..

200. **Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW.** p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999;154: 313-323

201. **Millard SS, Koff A.** Cyclin-dependent kinase inhibitors in restriction point control, genomic stability, and tumorigenesis. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30–31: 37-42..

202. **Kibel AS, Christopher M, Faith DA, Bova GS, Goodfellow PJ, Isaacs WB.** Methylation and mutational analysis of p27(kip1) in prostate carcinoma. *Prostate* 2001; 48: 248–53.

203. **Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB.** Loss of heterozygosity at 12P12-13 in primary and metastatic prostate adenocarcinoma. *J Urol* 2000; 164: 192-196
204. **Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N.** Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 2269–74.
205. **Chevillat JC, Lloyd RV, Sebo TJ, Cheng L, Erickson L, Bostwick DG, Lohse CM, Wollan P.** Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 1998; 11: 324–328.
206. **Vis AN, Noordzij MA, Fitoz K, Wildhagen MF, Schroder FH, van der Kwast TH.** Prognostic value of cell cycle proteins p27 (kip1) and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients with prostate cancer. *J Urol* 2000; 164: 2156–2161.
207. **Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM.** Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542–548.
208. **Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wang HJ, Phillipson J, deKernion JB, Loda M, Reiter RE.** Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 1998; 159: 941–945.
209. **Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodiceci P, Osman I, Millard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang ZF, Massague J, Scher HI.** Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1284-1291.
210. **Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
211. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
212. **Vaux DL, Cory S, Adams JM.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335:440-442 .

213. **Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336.
214. **Reed JC, Cuddy M, Haldar S, Croce C, Nowell P, Makover D, Bradley K.** BCL2-mediated tumorigenicity of a human T-lymphoid cell line: synergy with MYC and inhibition by BCL2 antisense. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3660-3664.
215. **Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, Yum S, Cohen J.** Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 1990; 50:6565-6570.
216. **Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.
217. **Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM.** Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228:1440-1443.
218. **Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM.** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-1099.
219. **Cleary ML, Smith SD, Sklar J.** Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47:19-28.
220. **Khurram S. C., Paul D. A., El-Nasir L.** Role of the Bcl-2 Gene Family in Prostate Cancer Progression and its implications for Therapeutic Intervention. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 49-57.
221. **Boise LH, Gonzalez Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB.** bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74:597-608.
222. **Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW.** Mcl-i, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997; 89:630-643.
223. **Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S.** bcl-w, a novel

member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 1996; 13:665-675.

224. **Lin EY, Orlofsky A, Wang HG, Reed JC, Prystowsky MB.** A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*. 1996; 87:983-992.

225. **Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-619.

226. **Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC.** Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374:733-736.

227. **Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80:285-291.

228. **Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, et al.** Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 1995; 11:1921-1928.

229. **Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; 10:2859-2869.

230. **Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G.** Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 1997; 16:1686-1694.

231. **Reed JC.** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 1997; 387, 773-776.

232. **Basu A., Haldar S.** The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4: 1099-1109.

233. **Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G.** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* . 1996;184:1331-1341.

234. **Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86:147-157.
235. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275:1129-1132.
236. **Catz SD, Johnson JL.** Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappaB and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 2001;20: 7342-7351.
237. **Davies MA, Koul D, Dhesi H, et al.** Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* 1999;59: 2551-2556
238. **Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, et al.** Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol Chem* 2000; 275: 10761-10766.
239. **Huang H, Cheville JC, Pan Y, Roche PC, Schmidt LJ, Tindall DJ.** PTEN -mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 38830-38836.
240. **Marin MC, Fernandez A, Bick RJ, Brisbay S, Buja LM, Snuggs M, McConkey DJ, von Eschenbach AC, Keating MJ, McDonnell TJ.** Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene* 1996; 12:2259-2266.
241. **Miyashita T, Reed JC.** Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81: 151-157.
242. **Miyashita T, Reed JC.** bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992; 52:5407-5411.
243. **Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW.** Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 1853-1861.
244. **Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y, Cossman J.** bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its

effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res.* 1993; 53: 4251-4256

245. **Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA.** bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res* 1993; 53:3321-3326.

246. **Tang C, Willingham MC, Reed JC, Miyashita T, Ray S, Ponnathpur V, Huang Y, Mahoney ME, Bullock G, Bhalla K.** High levels of p26BCL-2 oncoprotein retard taxol-induced apoptosis in human pre-B leukemia cells. *Leukemia* 1994; 8:1960-1 699.

247. **Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB.** Expression of bcl-xl can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995; 86:1903-1910.

248. **McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA.** Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 1996; 56:5594-5599.

249. **Checler F., Emson P.C., Vincent J.P, Kitabgi P.** Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes :Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from praline - endopeptidase. *J. Neurochem.* 1984; 43; 1295-1301

250. **Kenny A.J.** Endopeptidase-24-11: putative substrates and possible roles. *Biochem Soc. Trnas.* 1993; 21: 663-668.

251. **Rozengurt E.** Signal transduction pathways in the mitogenic response to G proteincoupled neuropeptide receptor agonists. *J. Cell. Physiol.* 1998; 177: 507–517.

252. **Cantley L.C., Neel B.G.** New insights ito tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining t; he phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acd. Sci. USA.* 1999; 96: 4240-4245

253. **Hoeflieh KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR.** Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 2000; 406: 86-90

254. **Williams S., Pettaway C., Song R., Papandreou C., Logothetis C., and McConkey D.J.** Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Molecular Cancer Ther.* 2003;2: 835-843

255. **Maltzman W, Czyzyk L.** UV irradiation stimulates levels of p53 cellular antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 1984; 4: 1689-1694
256. **Kastan M., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991; 51: 6304-6311.
257. **Ljugman M.** Dial 9-1-1 for p53 degradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 2: 208-225.
258. **Yu Z., Zhang L.** The transcriptional targets targets of p53 in apoptosis control. *Biochem and Bioph. Research Communication.* 2005; 331: 851-858.
259. **Reed JC.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-1430
260. **Murillo H., Huang H., Schmidt LJ., Smith DL., Tindall DJ.** Role of PI3k signalling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology.* 2001; 142: 4795-4805
261. **Khwaja A.** Akt is more than a just a Bad kinase. *Nature.* 1999; 401: 33-34
262. **Catz S.D., Johnson J.L.** Bcl-2 in prostate cancer: A minireview. *Apoptosis.* 2003; 8: 29-37
263. **Ni T, Li W, Zou F.** The ubiquitin ligase ability of IAPs regulates apoptosis. *IUBMB Life* 2005; 57: 779-785
264. **Drexler HCA.** Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 855-860
265. **Leonard JP, Furman RR, Coleman M.** Proteasome inhibition with bortezomib: A new therapeutic strategy for non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 971-979
266. **Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tπ S-M, Pagliaro L, Kim J, Adams J, Elliott P, Esseltine D, Petrusieh A, Dieringer P, Perez C, Logothetis CJ.** Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2108-2121
267. **Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A, Spriggs**

- DR.** A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2505-2511
268. **Lee D., Goldberg A.** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 397-403
269. **Wozcik C.** Inhibition of the proteasome as a therapeutic approach. *Drug Discov.* 1999; 4: 188-192
270. **Kisselev A., Goldberg A.L.** Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001; 8: 739-758
271. **Wojcik C.** Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J. Cell Mol. Med.* 2002; 6: 25-48
272. **Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC.** Bortezomib (PS-341): A novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 2003; 10: 361-369
273. **O'Connor OA.** Proteasome inhibitors. *Lippincott Williams & Wilkins,* 2006: 621-640
274. **Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JL, Coomber BL, Mackman N, Rak JW.** Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741
275. **Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M.** ECE-1: a membrane bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78: 473-485
276. **Rubin SA, Levin ER:** The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. *J. Clin Endocr Metabol* 1994; 78: 6-10
277. **Le Brun G, Aubin P, Soliman H, Ropiquet F, Villet J, Berthon P, Creminon C, Cussenot O, Fiet J.** Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1 β , TNF- α , and TGF- β in the PC3 human prostate cancer cell line. *Cyto.* 1999; 11: 157-162
278. **Goldie RG.** Endothelin in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26: 145-148.
279. **Lees DM, Pallikaros Z., Corder R.** The p55 tumor necrosis factor receptor (CD120a) induces endothelin-1 synthesis in endothelial and epithelial cells. *Eur J. Pharmacol.* 2000; 390: 89-94.

280. **Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancheria R., Mittelman A., Wi-Wong JG., Ahmed T.** Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoblastic bone resorption. *Br J. Cancer* 2000; 83: 360-365.
281. **Mortensen LH.** Endothelin and the clinical and peripheral nervous systems: a decade of endothelin research. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26: 980-984.
282. **Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova JS, Simons JW.** Endothelin-1 production and decreased endothelin-B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 663-668
283. **Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF, Brooks JD, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Nelson WG, Bova JS.** Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Can REs.* 1997; 57: 35-37.
284. **Kopetz E.S., Nelson J.B., Carducci M.A.** Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest. New Drugs.* 2002; 20: 173-182.
285. **Ersparmer V, Ersparmer GF, Inselvini M, Negri L.** Occurrence of bombesin and alcyonin in extracts of the skin of three European discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extracellular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1972; 45: 333-348.
286. **Ersparmer V.** Discovery, isolation and characterization of bombesin-like peptides. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 547:3-9.
287. **Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, et al.** International Union of Pharmacology. The bombesin Receptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev.* 2007 in press
288. **Kroog, G. S., Jensen, R. T., and Battey, J. F.** Mammalian bombesin receptors. *Med. Res. Rev.* 1995; 15: 389–417.
289. **Gonzalez N., Terry W. Moody, Igarashi H., Ito T, Robert T. Jensen.** Bombesin-Related Peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15: 58–64

290. **Logothetis C., Hoosein N.** The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *J. Cell. Biochem.* 1992; 16H: 128–134.
291. **Levine L., Lucci A.J., Pazdrak B., Cheng J., Guo Y., Townsend M.C, M., Hellmich R.M.** Bombesin Stimulates Nuclear Factor B Activation and Expression of Proangiogenic Factors in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 2003; 63: 3495–3502.
292. **Sumitomo M., Shen R., Goldberg S.J., Dai J., Navarro D. Nanus M.N.** Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting Neuropeptide-induced protein K=kinase C δ degradation. *Cancer Research.* 2000; 60: 6590-6596
293. **van Bokhoven A., Varella-Garcia M, Korch C, Johannes W.U., Smith E.E, Miller L.H., Nordeen K.S, Miller J.G., Lucia S.M.** Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate.* 2003; 57: 205-225.
294. **van Duijn P.W., Trapman J.** PI3K/Akt signaling regulates p27kip1 expression via skp2 in PC3 and DU145 prostate cancer cells, but is not a major factor in p27kip1 regulation in LNCaP and PC346 Cells. *The Prostate* 2006; 66:749-760.
295. **Williams S., Pettaway C., Song R., Papandreou C., Logothetis C., McConkey J.D.** Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 2003; 2: 835-843
296. **Adams J., Palombella J.V., Sausville A.E., Johnoson J., Destree A., Lazarus D.D., Maas J., Pien S.C., Prakash S., Elliott J.P.** Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research.* 1999; 59: 2615-2622.
297. **Festruccia C., Guerra F., D' Albini A., Bolonga M.** In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int. J. Cancer.* 1998; 75: 418-431.
298. **Xiao D, Qu X, Weber HC.** Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. *Cell Signal.* 2003; 15: 945-53.

299. **Wu-Wong JR, Chiou WJ, Wang J.** Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293: 514-21.
300. **Papandreou CN, Logothetis CJ.** Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 5036-43.
301. **Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, et al.** Mechanisms of constitutive NFkappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate.* 2002; 52: 183-200.
302. **Sweeney C, Li L, Shanmugam R, et al.** Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5501-7.
303. **Jin RJ, Lho Y, Connelly L et al.** The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer Res.* 2008; 68: 6762-9.
304. **Adams J.** Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002; 7: 9-16.
305. **Ikezoe T, Yang Y, Saito T, Koeffler HP, Taguchi H.** Proteasome inhibitor PS- 341 down-regulates prostate-specific antigen (PSA) and induces growth arrest and apoptosis of androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Sci.* 2004; 95: 271-5.
306. **Sakai I, Miyake H, Terakawa T, Fujisawa M.** Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model. *Cancer Sci.* 2011; 102: 769-75.
307. **An J, Sun YP, Adams J, Fisher M, Belldegrun A, Rettig MB.** Drug interactions between the proteasome inhibitor bortezomib and cytotoxic chemotherapy, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF-related apoptosis inducing ligand in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4537-45.
308. **Thorpe JA, Christian PA, Schwarze SR.** Proteasome inhibition blocks caspase-8 degradation and sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated apoptosis. *Prostate.* 2008; 68: 200-9.

309. **Christian PA, Thorpe JA, Schwarze SR.** Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 73-80.
310. **Johnson TR, Stone K, Nikrad M, et al.** The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene.* 2003; 22: 4953-63.
311. **Kandasamy K, Kraft AS.** Proteasome inhibitor PS-341 (VELCADE) induces stabilization of the TRAIL receptor DR5 mRNA through the 3'-untranslated region. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 1091-100.
312. **Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS.** The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 443-9.
313. **Lashinger LM, Zhu K, Williams SA, Shrader M, Dinney CP, McConkey DJ.** Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 4902-8.
314. **Tu Z, Kelley VR, Collins T, Lee FS.** I kappa B kinase is critical for TNFalpha-induced VCAM1 gene expression in renal tubular epithelial cells. *J Immunol.* 2001; 166: 6839-46.
315. **Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA et al.** Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NFkB/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2011; 11: 13.
316. **Salido M, Gonzalez JL, Vilches J.** Loss of mitochondrial membrane potential is inhibited by bombesin in etoposide-induced apoptosis in PC-3 prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 1292-9.
317. **Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR.** Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia.* 2005; 7: 631-7.
318. **Banerjee S, Hussain M, Wang Z, et al.** In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 3818-26.

319. **Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM.** Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res.* 1991; 51: 4716-20.
320. **Shi XB, Nesslinger NJ, Deitch AD, Gumerlock PH, deVere White RW.** Complex functions of mutant p53 alleles from human prostate cancer. *Prostate.* 2002; 51: 59-72.
321. **He M, Rennie PS, Dragowska V, Nelson CC, Jia W.** A mutant P53 can activate apoptosis through a mechanism distinct from those induced by wild type P53. *FEBS Lett.* 2002; 517: 151-4.
322. **Osman I, Dai J, Mikhail M et al.** Loss of neutral endopeptidase and activation of protein kinase B (Akt) is associated with prostate cancer progression. *Cancer* 2006; 107: 2628-36.
323. **Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC.** Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res.* 2005; 65: 9891-8.
324. **Dreicer R, Petrylak D, Agus D, Webb I, Roth B.** Phase I/II study of bortezomib plus docetaxel in patients with advanced androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 1208-15.
325. **Hainsworth JD, Meluch AA, Spigel DR, et al.** Weekly docetaxel and bortezomib as first-line treatment for patients with hormone-refractory prostate cancer: a Minnie Pearl Cancer Research Network phase II trial. *Clin Genitourin Cancer.* 2007; 5: 278-83.
326. **Morris MJ, Kelly WK, Slovin S, Ryan C, Eicher C, Heller G, Scher HI.** A phase II trial of bortezomib and prednisone for castration resistant metastatic prostate cancer. *J Urol.* 2007; 178: 2378-83.