



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Γ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ**

---

**Διδακτορική Διατριβή**

**“Μελέτη της Σχέσης της Οδού των  
Νευροπεπτιδίων με την Οδό Ουβικουΐνης -  
Πρωτεασώματος στο Πολλαπλό Μυέλωμα”**

**ΥΠΟ**

**ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΒΑΪΟΥ**

*Βιοχημικός – Βιοτεχνολόγος*

*MsC Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί δείκτες*

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2016

© 2016 Μαρία Γ. Βάιου

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

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1<sup>η</sup>/19-10 -2016 ΓΣΕΣ)**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Γεώργιος Γ. Βασιλόπουλος**

**(Επιβλέπων)**

*Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Χρήστος Ν. Παπανδρέου**

*Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**

*Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής-Βιοχημείας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης**

*Καθηγητής Φαρμακολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Λάζαρος Σακκάς**

*Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ιωάννης Σκουλαρίγκης**

*Καθηγητής Καρδιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δρ. Ιωάννης Στεφανίδης**

*Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**''Μελέτη της Σχέσης της Οδού των  
Νευροπεπτιδίων με την Οδό Ουβικουΐτινης -  
Πρωτεασώματος στο Πολλαπλό Μυέλωμα''**

**ΜΑΡΙΑ Γ. ΒΑΪΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Γεώργιος Γ. Βασιλόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (*Επιβλέπων από τις 16/12/2015*)
- 2. Δρ. Χρήστος Ν. Παπανδρέου**, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (*Επιβλέπων από τις 16/11/2011*)
- 3. Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής-Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τα Εργαστήρια Βιοχημείας και Μοριακής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο διάστημα 2011-2016.*

*Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας κ. Χρήστο Ν. Παπανδρέου, επιβλέποντα της διατριβής μου κατά το διάστημα Νοέμβριος 2011-Δεκέμβριος 2015, μετά το οποίο ανέλαβε τα νέα του καθήκοντα στην Θεσσαλονίκη, για την σύλληψη και την πρωτοτυπία του θέματος που μου εμπιστεύτηκε να εκπονήσω καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την εξαιρετική επιστημονική καθοδήγησή του καθ'όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Τον ευχαριστώ επιπλέον για τις ευκαιρίες εκπαίδευσης και μάθησης στο πεδίο της Ογκολογίας που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια που είχα το προνόμιο να είμαι υπό την επίβλεψή του στα πλαίσια της παρούσας έρευνας.*

*Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Γ. Βασιλόπουλο και νυν επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής κατά το διάστημα Δεκέμβριος 2015- Νοέμβριος 2016 για την άμογη συνεργασία, τα εποικοδομητικά του σχόλια και την πολύτιμη βοήθειά του στον συντονισμό της τυπικής διαδικασίας για την ολοκλήρωση του διδακτορικού.*

*Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής-Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Θεσσαλίας κ. Παναγιώτη Λιάκο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την ανεκτίμητη βοήθειά του στην οργάνωση μέρους των πειραμάτων, στην εκμάθηση ορισμένων μοριακών τεχνικών και στην κριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας. Τον ευχαριστώ επίσης για τις εποικοδομητικές του συμβουλές και τις εύστοχες επισημάνσεις του στην συγγραφή των κειμένων της διδακτορικής διατριβής και της δημοσίευσης.*

*Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Θεσσαλίας κ. Κων/νο Δήμα για την φιλοξενία του στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας όπου διεξήχθη το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων, την εκμάθηση των τεχνικών που αφορούσαν κυρίως τις κυτταροκαλλιέργειες, για την οργάνωση και τον συντονισμό του μεγαλύτερου μέρους των πειραμάτων, για την κριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων και για την διόρθωση του κειμένου και την διεκπεραίωση της δημοσίευσης.*

*Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Α. Σακκά, κ. Ι. Στεφανίδη, κ. Ι. Σκουλαρίκη και κ. Ν. Σακελλαρίδη για τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση και την κρίση της διατριβής μου αλλά και για την παρουσία τους κατά την υποστήριξη της.*

*Τέλος θα ήταν παράλειψη μου εάν δεν ευχαριστούσα την κ. Πάγκου Ευανθία Υπ. Διδάκτορα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Θεσσαλίας για την συμβολή της στην διεξαγωγή των πειραμάτων αποσιώπησης και την Δρ. Μπεφάνη Χριστίνα από το ίδιο Εργαστήριο για την βοήθειά της στην διεξαγωγή των πειραμάτων ανοσοενζυμικής δοκιμασίας καθώς και τα υπόλοιπα μέλη των Εργαστηρίων Βιοχημείας και Φαρμακολογίας για την άριστη συνεργασία τους όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης και τα παλαιότερα μέλη του Εργαστηρίου της Μοριακής Ογκολογίας και της Ογκολογικής Κλινικής του ΠΠΓΝΑ, για την στήριξη που μου παρείχαν κυρίως στα πρώτα μου βήματα, κ. Παναγιώτη Ι. Βλαχοστέργιο, κ. Ελεάνα Χατζηδάκη και κ. Χρυσούλα Βασιλείου.*

*Τις τελευταίες αυτές γραμμές θα ήθελα να τις αφιερώσω στους γονείς μου, οι οποίοι έχουν αποτελέσει το πιο σημαντικό ψυχικό και υλικό στήριγμά μου καθ'όλη της διάρκειας της ζωής μου και των σπουδών μου.*

# Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	10
SUMMARY .....	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	13
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>18</b>
1.1 ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ .....	19
1.1.1. Γενική επισκόπηση της ασθένειας (Disease Overview) .....	19
1.1.2. Επιδημιολογία .....	20
1.1.3. Παθογένεση/ Βιολογία της νόσου .....	21
1.1.3.1. Κακοήθη πλασματοκύτταρα: Προέλευση και ανάπτυξή τους .....	21
1.1.3.2. Κλωνική εξέλιξη της νόσου (Clonal evolution of multiple myeloma) .....	22
1.1.3.3. Γενετική βάση της νόσου .....	24
1.1.3.4. Μοντέλο μοριακής παθογένειας για το MGUS και το ΠΜ .....	28
1.1.3.5. Ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στο ΠΜ .....	30
1.1.4. Κλινικοπαθολογο ανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΜ .....	34
1.1.4.1. Διάγνωστικές μέθοδοι (Diagnostic Workup) .....	34
1.1.4.2. Διαγνωστικά Κριτήρια .....	35
1.1.4.3. Κατηγοριοποίηση με βάση την επικινδυνότητα της νόσου (Risk Stratification) .....	36
1.1.5. Θεραπεία του ΠΜ .....	37
1.1.5.1. Πρώτης γραμμής θεραπεία (initial, induction therapies) σε ασθενείς υποψήφιους για ASCT .....	38
1.1.5.2. Πρώτης γραμμής θεραπεία (initial, induction therapies) σε ασθενείς μη υποψήφιους για ASCT .....	39
1.1.5.3. Θεραπεία για τους υποτροπιάζοντες ΠΜ ασθενείς .....	41
1.1.5.4. Θεραπεία συντήρησης (consolidation and maintenance therapies) .....	42
1.2. ΟΔΟΣ ΟΥΒΙΚΟΥΪΤΙΝΗΣ-ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ .....	42
1.2.1. Γενική Επισκόπηση .....	42
1.2.2. 26S Πρωτεάσωμα .....	45
1.2.2.1. Δομή του πρωτεασώματος .....	45
1.2.2.2. Λειτουργία του πρωτεασώματος .....	47
1.2.2.3. Ρύθμιση του 20S CP .....	49
1.2.2.3.1. Πρωτεϊνικά Σύμπλοκα .....	49
1.2.2.3.2. Συναρμολόγηση του πρωτεασώματος (Proteasome assembly) .....	50
1.2.3. Η οδός ουβικουΪτίνης-πρωτεασώματος στο ΠΜ .....	51
1.2.4. Τροποποιητικά μόρια της δράσης του UPS μονοπατιού .....	53
1.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ 26S ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ .....	55
1.3.1. Γενική επισκόπηση .....	55
1.3.2. Βορτεζομίμη (Bortezomib) .....	57
1.3.2.1. Ιστορική αναδρομή .....	57
1.3.2.2. Κλινικές μελέτες στο πολλαπλό μύελωμα .....	59
1.3.2.3. Κλινικές μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου .....	64
1.3.2.4. Έγκριση του bortezomib .....	65
1.3.2.5. Μηχανισμός δράσης .....	65
1.3.2.5.1. Αναστολή του NF-κB μονοπατιού .....	66
1.3.2.5.2. Επίδραση στα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK & PI3K/Akt .....	67
1.3.2.5.3. Αυξορύθμιση αποπτωτικών μονοπατιών .....	71
1.3.2.5.4. Επίδραση στον κυτταρικό κύκλο .....	72
1.3.2.5.5. Επίδραση σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA .....	73

1.3.2.5.6. Διατάραξη του μονοπατιού απόκρισης στις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR) .....	73
1.3.2.5.7. Επαγωγή νέκρωσης.....	74
1.3.2.5.8. Αναστολή φωσφορυλίωσης της καβεολίνης-1 .....	75
1.3.2.5.9. Επίδραση στην δευτεροταγή δομή του πρωτεασώματος .....	75
1.3.2.6. Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας .....	76
1.3.2.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας .....	82
<b>1.4. ΟΔΟΣ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....</b>	<b>89</b>
1.4.1. Γενική επισκόπηση .....	89
1.4.2. Άξονας Ενδοθληλίνης-1 (ET-1 Axis).....	91
1.4.2.1. Ενδοθληλίνες: Φυσιολογικός ρόλος, σύνθεση, ρύθμιση και υποδοχείς τους .....	91
1.4.2.2. Η σηματοδότηση της ET-1 στον καρκίνο .....	95
1.4.2.3. Ρόλος του άξονα της ET-1 στον καρκίνο .....	97
1.4.2.4. Ρόλος του άξονα της ET-1 σε διάφορους τύπους καρκίνου .....	101
1.4.2.5. Αναστολείς των υποδοχέων ET <sub>A</sub> R/ET <sub>B</sub> R.....	105
1.4.2.6. Ρόλος των νευροπεπτιδίων (ET-1) στην ανάπτυξη λεμφοπλασματοπλασματικών ασθενειών του ανοσοποιητικού συστήματος .....	110
1.4.2.7. Αλληλεπιδράσεις της οδού των νευροπεπτιδίων (ET-1) με την οδό ουβικουιλίνης-πρωτεασώματος.....	113
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ .....</b>	<b>116</b>
2.1. ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	117
2.2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ .....	119
2.3. ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ .....	120
<b>3. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>121</b>
3.1. Καλλιέργεια κυττάρων .....	122
3.2. Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης ενδοθληλίνης-1 (ET-1 ELISA) .....	123
3.3. Προσδιορισμός ενζυματικής δραστηριότητας NEP .....	124
3.4. Δοκιμασία μεθύλ-τριαζολύλ-τετραζολίου (MTT Assay).....	125
3.5. Πρωτεασωμική Δραστικότητα .....	126
3.6. Ανοσοαποτύπωση (Western blot).....	128
3.6.1. Απομόνωση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....	130
3.6.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE .....	131
3.6.2.1. Πειραματική διαδικασία .....	132
3.6.3. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	133
3.7. Αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα ET <sub>B</sub> R με siRNA .....	134
3.7.1. Αρχή της μεθόδου .....	134
3.7.2. Πειραματική διαδικασία .....	136
3.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	137
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>139</b>
4.1. Ο άξονας της ET-1 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία του ΠΜ .....	140
4.1.1. Οι υποδοχείς ET <sub>A</sub> R και ET <sub>B</sub> R εκφράζονται στα ΠΜ κύτταρα .....	140
4.1.2. Η ET-1 παράγεται/εκκρίνεται από τα ΠΜ κύτταρα .....	142



4.1.3. Η ET-1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των ΠΜ κυττάρων .....	143
4.1.4. Η NER/CD10 δεν εκφράζεται στα ΠΜ κύτταρα .....	146
4.2. Η ET-1 εμπλέκεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα .....	147
4.2.1. Οι ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν διαφορεικά επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ.....	147
4.2.2. Η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού .....	149
4.3. Καταστολή του ET-1/ET <sub>B</sub> R μονοπατιού ενισχύει τις ανασταλτικές δράσεις του BTZ, επανευαισθητοποιώντας τα ΠΜ κύτταρα στο φάρμακο .....	151
4.3.1. Καταστολή του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα με χημικούς πεπτιδικούς ανταγωνιστές .....	151
4.3.2. Αποσιώπηση του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα με siRNA .....	152
4.3.3. Ο ET <sub>A</sub> R δεν εμπλέκεται στην μεσολάβηση των δράσεων της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα .....	152
4.4. Η ET-1 επηρεάζει την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα .....	153
4.4.1. Τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας στην σταθερή κατάσταση συμβαδίζουν με μειωμένη ευαισθησία στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα .....	153
4.4.2. Η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αυξορύθμισης της 20S πρωτεασωμικής δραστηριότητας.....	156
4.5. Παρεμπόδιση του ET <sub>B</sub> R επαναφέρει την δράση του BTZ στο UPS μονοπάτι .....	158
4.5.1. Παρεμπόδιση του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα με χημικούς πεπτιδικούς ανταγωνιστές .....	158
4.5.2. Αποσιώπηση του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα με siRNA .....	158
4.5.3. Παρεμπόδιση του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα διευκολύνει την BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή στον πολλαπλασιασμό και την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα .....	159
4.6. Το μονοπάτι των MAP κινασών (MAPK) εμπλέκεται στην ET-1/ET <sub>B</sub> R-επαγόμενη BTZ ανθεκτικότητα στα ΠΜ κύτταρα .....	160
4.6.1. Η ET-1 επάγει ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού μέσω του ET <sub>B</sub> R υποδοχέα στα ΠΜ κύτταρα .....	160
4.6.2. Η ET-1 δεν επηρεάζει το PI3K/Akt/mTOR μονοπάτι στα ΠΜ κύτταρα .....	162
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>165</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>174</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....</b>	<b>204</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός** Το bortezomib γνωστό με το κωδικό όνομα PS-341 και το εμπορικό όνομα VELCADE είναι ο πρώτος σε κλινική εφαρμογή αναστολέας πρωτεασώματος που εγκρίθηκε το Μάιο του 2003 από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία του επιδεινούμενου και υποτροπιάζοντος πολλαπλού μυελώματος (MM), σε ασθενείς οι οποίοι έχουν ήδη υποβληθεί τουλάχιστον μία φορά σε θεραπεία και του λεμφώματος μανδύα. Παρόλα αυτά, η ανθεκτικότητά του συνεχίζει να παραμένει ένα κλινικά σημαντικό πρόβλημα, καθώς ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν καταφέρνει να έχει ανταπόκριση στη θεραπεία και η πλειοψηφία αυτών που ανταποκρίνεται τελικά υποτροπιάζει. Αντικείμενο της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση του ρόλου του άξονα της ET-1 ως ένας πιθανός μηχανισμός διαφυγής στη θεραπεία με το BTZ στα ΠΜ κύτταρα.

**Υλικά & Μέθοδοι** Οι ανθρώπινες ΠΜ καρκινικές κυτταρικές NCI-H929 και RPMI-8226 καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία των ET-1, BTZ και ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1. Τα επίπεδα της ET-1 εκτιμήθηκαν με ELISA, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων της ET-1 και των μορίων-τελεστών των μονοπατιών MAPK και PI3K/Akt/mTOR με ανάλυση Western blot. Οι δράσεις της ET-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εκτιμήθηκαν με MTT Assay, ενώ στο μονοπάτι UPS μετρώντας την δράση χυμοτροψίνης του 20S πρωτεασώματος στα κυτταρικά λύματα.

**Αποτελέσματα** Οι υποδοχείς της ET-1 (ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R) βρέθηκε να εκφράζονται και στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές, με την RPMI-8226 κυτταρική σειρά η οποία θεωρείται ανθεκτική στο BTZ, να εκφράζει υψηλότερα επίπεδα ET<sub>B</sub>R και να εκκρίνει/παράγει υψηλότερα επίπεδα ET-1. Επώαση των NCI-H929 κυττάρων με την ET-1 βρέθηκε να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ συνεπώαση με ET-1 και BTZ μείωσε την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου με ταυτόχρονη αυξορύθμιση της 20S πρωτεασωμικής

δραστικότητας. Αποσιώπηση με siRNA ή παρεμπόδιση με πεπτιδικούς ανταγωνιστές του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R ανέστειλε τις προστατευτικές δράσεις της ET-1. Επίσης, τα δεδομένα προτείνουν ότι το MAPK μονοπάτι ίσως συνιστά το κυριότερο μονοπάτι που εμπλέκεται στην ET-1/ET<sub>B</sub>R επαγόμενη ανθεκτικότητα στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα.

**Συμπεράσματα** Τα δεδομένα μας προτείνουν έναν πιθανό ρόλο του άξονα ET-1/ET<sub>B</sub>R στην ρύθμιση της ευαισθησίας των ΠΜ κυττάρων στο BTZ. Συνδυασμός του BTZ με στρατηγικές που στοχεύουν στον άξονα της ET-1, μπορεί να αποτελέσει μία καινοτόμα πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στο ΠΜ.

## SUMMARY

**Purpose** Bortezomib (BTZ) is used for the treatment of multiple myeloma (MM). However, a significant proportion of patients may be refractory to the drug. This study aimed to investigate whether the endothelin (ET-1) axis may act as an escape mechanism to treatment with bortezomib in MM cells.

**Methods** NCI-H929 and RPMI-8226 (human MM cell lines) were cultured with or without ET-1, BTZ, and inhibitors of the endothelin receptors. ET-1 levels were determined by ELISA, while the protein levels of its receptors and of the PI3K and MAPK pathways' components bywestern blot. Effects of ET-1 on cell proliferation were studied by MTT and on the ubiquitin proteasome pathway by assessing the chymotryptic activity of the 20S proteasome in cell lysates.

**Results** Endothelin receptors A and B (ETAR and ETBR, respectively) were found to be expressed in both cell lines, with the RPMI-8226 cells that are considered resistant to BTZ, expressing higher levels of ETBR and in addition secreting ET-1. Treatment of the NCI-H929 cells with ET-1 increased proliferation, while co-incubation of these cells with ET-1 and BTZ decreased BTZ efficacy with concomitant upregulation of 20S proteasomal activity. Si- RNA silencing or chemical blockade of ETBR abrogated the protective effects of ET-1. Finally, data suggest that the predominant signaling pathway involved in ET-1/ETBRinduced BTZ resistance in MM cells may be the MAPK pathway.

**Conclusion** Our data suggest a possible role of the ET-1/ ETBR axis in regulating the sensitivity of MM cells to BTZ. Thus, combining bortezomib with strategies to target the ET-1 axis could prove to be a novel promising therapeutic approach in MM.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropic hormone
<b>ADCC</b>	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>APRIL</b>	A proliferation-inducing ligand
<b>ASCT</b>	Autologous Stem Cell transplantation
<b>BAFF</b>	B Cell activating factor
<b>BCMA</b>	B Cell maturation
<b>BMSCs</b>	Bone Marrow Stromal Cells
<b>BTZ</b>	Bortezomib
<b>CAD</b>	C-terminal activation domain
<b>cAMP</b>	Cyclic Adenosine monophosphate
<b>CCND</b>	Cyclin D
<b>CDCA7L</b>	Cell division cycle associated 7-like
<b>cIAP1/cIAP2</b>	Baculoviral IAP repeat containing 2/3 [BIRC2/BIRC3]
<b>C-L</b>	Caspase-Like activity
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>CP</b>	Core Particle
<b>CR</b>	Complete Response
<b>CRF</b>	Corticotropin-releasing factor
<b>CSF-1</b>	Colony-Stimulating Factor 1
<b>CT-L</b>	Chymotrypsin-Like activity
<b>CYLD</b>	Cylindromatosis/turban tumor syndrome
<b>DAG</b>	Diacylglycerole
<b>DDR</b>	DNA Damage Response
<b>DKK-1</b>	Dickkopf-related protein 1
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide
<b>DNAH11</b>	Dynein, axonemal, heavy chain 11

<b>DNMT3A</b>	DNA cytosine-5-methyltransferase 3 alpha
<b>DR</b>	Death Receptor
<b>DTNB</b>	Dystrobrevin beta
<b>DUBs</b>	Deubiquitinases
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>eIF2a</b>	Translation initiation factor 2a
<b>EMT</b>	Epithelial-mesechymal transition
<b>Erk1/2 (p44/42)</b>	Extracellular-signal regulated kinase
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ET-2</b>	Endothelin-2
<b>ET-3</b>	Endothelin-3
<b>ETAR</b>	Endothelin Receptor A
<b>ETBR</b>	Endothelin Receptor B
<b>FAM46C</b>	Family with sequence similarity 46, member C
<b>FBS</b>	Foetal Bovine Serum
<b>FGF-2</b>	Fibroblast Growth Factor-2
<b>FGFR3</b>	Fibroblast Growth factor Receptor 3
<b>FIH</b>	Factor inhibiting HIF-1
<b>GH</b>	Growth Hormone
<b>GPCR</b>	G-Protein Coupled Receptor
<b>HDAC</b>	Histone Deacetylase
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIF-1a</b>	Hypoxia-inducible Factor 1a
<b>HMCLs</b>	Human Multiple Myeloma Cell Lines
<b>HSPs</b>	Heat Shock Proteins
<b>HY</b>	Hyperdiploid class
<b>IAPs</b>	Inhibitors of apoptosis
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1

<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>IGF-1</b>	Insulin-Growth Factor 1
<b>IGH</b>	Immunoglobulin Heavy Locus
<b>IGL</b>	Immunoglobulin lambda locus
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-8</b>	Interleukin-8
<b>iMIDs</b>	Immunomodulatory drugs
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferone- $\gamma$
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases
<b>LB</b>	Low Bone Disease class
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MGMT</b>	O6-methylguanine methyltransferase
<b>Mcl-1</b>	Myeloid-cell leukemia-1
<b>MDR</b>	Multi-Drug Resistance
<b>MDSCs</b>	Myeloid Derived Suppressor Cells
<b>MGUS</b>	Monoclonal Gammopathy of undetermined significance
<b>MICA</b>	MHC class I polypeptide-related sequence A
<b>MIP-1</b>	Macrophage-inflammatory protein-1a
<b>MM</b>	Multiple Myeloma
<b>MMP2</b>	Matrix metalloproteinase 2
<b>MMSET</b>	Multiple Myeloma SET Domain
<b>MPC</b>	Myeloma Propagating Cell
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>MYC</b>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>NEP/CD10</b>	Neuropeptidase
<b>NF-kB</b>	Nuclear Factor kB
<b>NIK</b>	NF-kB-inducing kinase [ <i>MAP3K14</i> ]
<b>NK</b>	Natural Killer Cells
<b>NKG2D</b>	Natural Killer Group 2

<b>NP's</b>	Neuropeptides
<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>ORR</b>	Objective Response Rate
<b>OS</b>	Overall Survival
<b>P70S6K</b>	p70S6 Kinase
<b>PBMCs</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PD-1</b>	Programmed cell death 1
<b>pDCs</b>	Plasmacytoid Dendritic Cells
<b>PDGF</b>	Platelet-derived Growth factor
<b>PD-L1</b>	Programmed Death Ligand 1
<b>PFS</b>	Progression Free Survival
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>PI</b>	Proteasome Inhibitor
<b>PI3-K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PLA</b>	Phospholipase A
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>POMC</b>	Proopiomelanocortin
<b>POMP</b>	Proteasome Maturation Protein
<b>PRL</b>	Prolactine
<b>PS-341</b>	Bortezomib
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>RANK</b>	Receptor Activator of Nuclear Factor kB
<b>RANK-L</b>	Receptor Activator of Nuclear Factor Kb-Ligand
<b>RB1</b>	Retinoblastoma 1
<b>RP</b>	Regulatory particle
<b>Rpt1-6</b>	Regulatory Particle Triple A 1-6
<b>RTKs</b>	Receptor Tyrosine Kinases



<b>SCF</b>	Skp, Cullin, F-box containing complex
<b>SMM</b>	Smoldering Myeloma
<b>SP</b>	Substance P
<b>SS</b>	Somatostatin
<b>TACI</b>	Transmembrane activator και CAML interactor
<b>TGFβ</b>	Tumor Growth factor-β
<b>T-L</b>	Trypsin-Like activity
<b>TNFα</b>	Tumor Necrosis Factor α
<b>TRAF 2</b>	TNF receptor-associated factor 2
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>Tregs</b>	Regulatory T cells
<b>TTP</b>	Time To Progression
<b>UBA</b>	Ubiquitin-Activating Enzymes
<b>UBC</b>	Ubiquitin-conjugating enzymes
<b>UCH</b>	Ubiquitin C-terminal hydrolase
<b>ULK4</b>	Unc-51 like kinase 4
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>UPS</b>	Ubiquitin Proteasome System
<b>USP14</b>	Ubiquitin-specific protease 14
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion molecule 1
<b>VEGF</b>	Vascular Growth factor
<b>VIP</b>	Vasoactive intestinal peptide
<b>XBPI</b>	X-box binding protein 1
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein
<b>IMWG</b>	International Myeloma Working Group
<b>IIM</b>	Πολλαπλό Μυέλωμα

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

---

## 1.1 ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΜΥΕΛΩΜΑ

### 1.1.1. Γενική επισκόπηση της ασθένειας (Disease Overview)

Το νόσημα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1850, από τον Dr William Macintyre, που ήταν ο πρώτος που έδωσε την κλινική περιγραφή του. Ο Von Rustizky, είκοσι χρόνια αργότερα εισήγαγε τον όρο πολλαπλούν μυέλωμα [1, 2].

Το Πολλαπλό ή Πλασματοκυτταρικό Μυέλωμα (ΠΜ) είναι ένα κακοήθες νεόπλασμα των Β-λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση των παθολογικών πλασματοκυττάρων (μυελωματικά) στο μυελό των οστών [3]. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι παρόμοια με τα μακράς διάρκειας ζωής μεταβλαστικά κέντρα πλασματοκυττάρων (post-germinal center PCs) και χαρακτηρίζονται από ισχυρή εξάρτηση από το μυελό των οστών, εκτεταμένες σωματικές υπερμεταλλάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (Ig) και απουσία έκφρασης της IgM σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από ένα πολύ μικρό ποσοστό (1%) [4].

Φυσιολογικά, ο οργανισμός παράγει πέντε διαφορετικούς τύπους ανοσοσφαιρινών - IgG, IgM, IgA, IgE και IgD οι οποίες παρουσιάζουν ελάχιστα διαφορετικές λειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα. Κάθε τύπος ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές αλυσίδες - δύο πανομοιότυπες βαριές (μακριές) πρωτεϊνικές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (κοντές) πρωτεϊνικές αλυσίδες. Οι βαριές αλυσίδες αποτελούνται από έναν από πέντε διαφορετικούς τύπους, που αντιστοιχούν στον τύπο της ανοσοσφαιρίνης που παράγεται: γ (IgG), μ (IgM), α (IgA), ε (IgE) και δ (IgD). Οι ελαφριές αλυσίδες αποτελούνται από έναν από δύο διαφορετικούς τύπους που ονομάζονται «κάπα» (κ) και «λάμδα» (λ). Μέσα σε κάθε πλασματοκύτταρο, δύο βαριές αλυσίδες ενός τύπου και δύο ελαφριές αλυσίδες ενός άλλου τύπου συνδέονται για να σχηματίσουν μία ακέραιη ανοσοσφαιρίνη. Κάθε πλασματοκύτταρο παράγει ένα μόνο είδος ανοσοσφαιρίνης.

Στη συντριπτική πλειοψηφία τους, τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες, οι οποίες αντιστοιχούν είτε σε πλήρεις ανοσοσφαιρίνες, είτε σε κλάσματα ανοσοσφαιρινών όπως κ και λ ελαφρές αλυσίδες ή στη χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη Bence-Jones (πλήρεις ελαφρές κ ή λ αλυσίδες, ή τμήματα αυτών που περιλαμβάνουν όλο το μεταβλητό και μέρος μόνον του σταθερού τμήματός τους) [5, 6, 7].

Κάθε νεοπλασματικός κλώνος εκκρίνει έναν και μόνο τύπο βαρείας ανοσοσφαιρίνης (IgA, D, G και σπανιότερα E ή M) και ένα μόνο τύπο ελαφράς (κ ή λ), οι οποίες καλούνται μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες (M-Ig) και εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στον όρο του αίματος ή και στα ούρα [5, 8]. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται έκκριση περισσοτέρων ανοσοσφαιρινών από ένα και μόνο νεοπλασματικό κλώνο (πολυκλωνικό ΠΜ) [9], ή τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παράγουν αλλά δεν εκκρίνουν κλωνική ανοσοσφαιρίνη (μη εκκριτικό ΠΜ) [10].

Ο τύπος του πολλαπλού μυελώματος εξαρτάται από τον τύπο της παραγόμενης πρωτεΐνης M, είτε αυτή είναι ακέραιη ανοσοσφαιρίνη ή ελαφριά αλυσίδα. Συνήθως οι ασθενείς έχουν μυελώματα του τύπου IgG (αποτελούν το 60-70%) και IgA (αποτελούν το 20%). Οι περιπτώσεις των IgE και IgD αναφέρονται σπάνια.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι αποτέλεσμα των νεοπλασματικών διηθήσεων, ενδο- ή και εξωμυελικά, της έκπτωσης της χυμικής ανοσίας του οργανισμού αλλά και της εκκρινόμενης κλωνικής πρωτεΐνης (παραπρωτεϊναιμία) [11, 12, 13]. Συνήθως αφορούν απώλεια οστικής μάζας και βλάβες των οστών που μπορούν να προκαλέσουν κατάγματα και πόνους, υπερασβεστιαμία, αναιμία, λοιμώξεις που σχετίζονται με ανοσοκαταστολή και μειωμένη νεφρική λειτουργία [14].

## 1.1.2. Επιδημιολογία

Το ΠΜ αντιπροσωπεύει το 1% όλων των τύπων καρκίνου και αποτελεί τη δεύτερη πιο κοινή αιματολογική κακοήθεια μετά τα λεμφώματα, συνιστώντας περίπου το 10% όλων των αιματολογικών κακοηθειών [15]. Ο επιπολασμός της νόσου είναι περίπου 6 περιστατικά ανά 100,000 πληθυσμού ανά έτος στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη με μέσο όρο ηλικίας στη διάγνωση ανάμεσα στα 63 και 70 έτη. Μόνο το 2% των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα έχει ηλικία κάτω από 40 χρόνια, αν και τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια ανεξήγητη αύξηση της προσβολής ασθενών σχετικά μικρότερης ηλικίας [15, 16]. Περίπου 1 στους 3 ασθενείς είναι άντρες [17], ενώ η συχνότητα της νόσου διπλασιάζεται στα άτομα με προέλευση από την Αφρική και την Καραϊβική σε σχέση με τους Καυκάσιους [18]. Η θνησιμότητα είναι 4.1/100,000/το έτος και ο μέσος χρόνος απώλειας ζωής στους ασθενείς με μυέλωμα είναι υψηλότερος από πολλούς άλλους τύπους καρκίνου και μεταφράζεται σε

περίπου >30 έτη σε ασθενείς κάτω των 40 χρονών και μειώνεται σε <5 χρόνια στους ασθενείς με ηλικία  $\geq 80$  ετών [15]. Κάθε χρόνο στην Ελλάδα διαγιγνώσκονται 4-5 νέες περιπτώσεις ΠΜ ανά 100,000 άτομα έτσι υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο 400-500 νέες περιπτώσεις ασθενών με μυέλωμα διαγιγνώσκονται στη χώρα μας. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες με την βελτίωση των θεραπευτικών προσεγγίσεων της νόσου, ο μέσος χρόνος επιβίωσης έχει αυξηθεί από τα 3 στα 6 χρόνια [19].

### 1.1.3. Παθογένεση/ Βιολογία της νόσου

#### 1.1.3.1. Κακοήθη πλασματοκύτταρα: Προέλευση και ανάπτυξή τους

Τα Β λεμφοκύτταρα προέρχονται από ένα πολυδύναμο μητρικό αρχέγονο κύτταρο, το οποίο διέρχεται διάφορα στάδια μέχρι την ωρίμανσή του σε πλασματοκύτταρο ή μνημονικό κύτταρο. Τα στάδια διαφοροποίησης στη Β λεμφική σειρά καθορίζονται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών με επακόλουθη σωματική μεταλλαγή των μεταβλητών περιοχών (Variable, V region) αλλά και από την έκφραση ανοσοσφαιρινών, μορίων προσκόλλησης και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνειά τους. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από την έκφραση μεμβρανικών επιφανειακών υποδοχέων που προσδίδουν στο λεμφοκύτταρο λειτουργικούς και φαινοτυπικούς χαρακτήρες. Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση της Β λεμφοκυτταρικής σειράς πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: στην αρχική, αντιγονοανεξάρτητη φάση που αφορά την ωρίμανση του Β-λεμφοκυττάρου σε ώριμο Β-λεμφοκύτταρο και στην δεύτερη αντιγονοεξαρτώμενη που οδηγεί το ώριμο Β-λεμφοκύτταρο στο πλασματοκύτταρο [20].

Ένα ώριμο παρθένο Β λεμφοκύτταρο είναι ένα κύτταρο IgM+ και IgD+ στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου, το οποίο στη φάση αυτή εγκαταλείπει το μυελό των οστών, εισέρχεται στην περιφέρεια του αίματος και μεταναστεύει στα περιφερικά λεμφικά όργανα, όπου συντελείται η δεύτερη περίοδος διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων. Τα Β λεμφοκύτταρα υπό την επίδραση αντιγονικής διέγερσης από τα δενδριτικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε πλασμαβλάστες, οι οποίοι εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο, μεταναστεύουν στο μυελό των οστών και εξελίσσονται σε πλασματοκύτταρα ή σε Β-κύτταρα μνήμης [21, 22, 23]. Αντίστοιχα, κύτταρα που δεν δέχονται αντιγονική διέγερση

από τα αντιγονοπαρουσιαστικά λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση [24, 25].

Μελέτες προτείνουν ότι στο ΠΜ τα μυελωματικά κύτταρα αποτελούν μακράς διάρκειας ζωής πλασματοκύτταρα των μετα-βλαστικών κέντρων, τα οποία έχουν εκτεθεί σε αντιγόνο και έχουν υποστεί όλες τις διαδικασίες ωρίμανσης των Β-λεμφοκυττάρων που αφορούν ανασυνδυασμό VDJ των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και ισοτυπικό ανασυνδυασμό και παραμένουν στο μυελό των οστών αποτελώντας την κύρια περιοχή της ασθένειας. Μοριακές αναλύσεις των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος στο ΠΜ έχουν δείξει την παρουσία κυκλοφορούντων κλωνικών Β κυττάρων με παρόμοιες αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και με παρόμοια σωματική υπερμεταλλαγή όπως τα κακοήθη πλασματοκύτταρα του μυελού. Παρόλα αυτά, τα μυελωματικά κύτταρα διαφέρουν από τα υγιή διότι διαθέτουν την ικανότητα να μεταπίπτουν σε ένα χαμηλότερου ρυθμού στάδιο πολλαπλασιασμού [26].

### 1.1.3.2. Κλωνική εξέλιξη της νόσου (Clonal evolution of multiple myeloma)

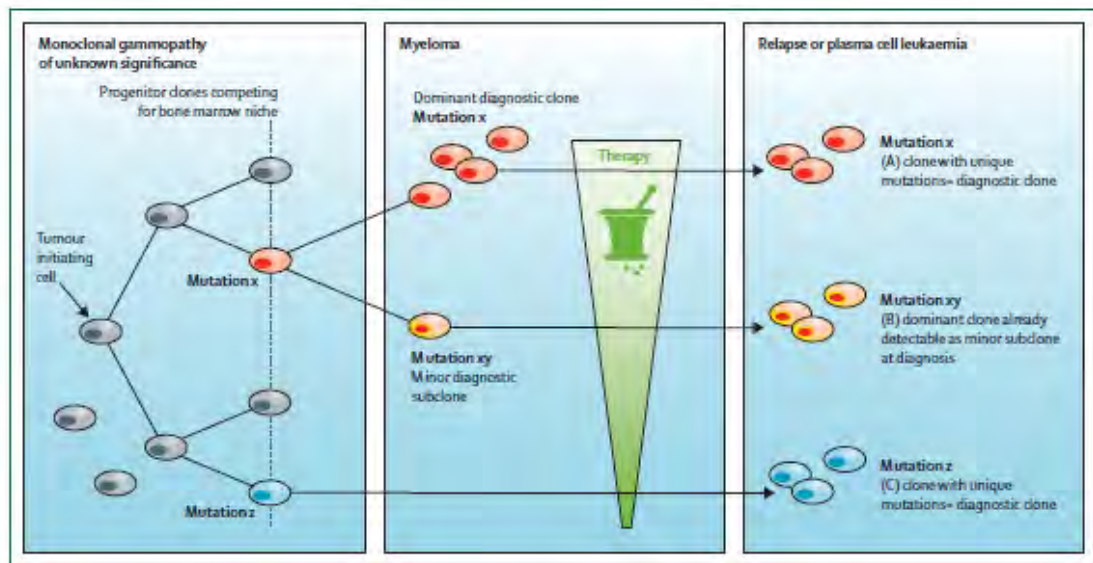
Η ανάπτυξη του ΠΜ εξαρτάται από την σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ανάπτυξης, των μορίων πρόσδεσης και άλλων παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου [27] και περιλαμβάνει μία διεργασία με διαδοχικά στάδια εξαλλαγής των πλήρως διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων από τη φυσιολογική κατάσταση στην παθολογική ασυμπτωματική κατάσταση της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας ακαθόριστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), η οποία εξελίσσεται σε ένα πιο προχωρημένο προ-κακοήθες στάδιο ενδιάμεσα ασυμπτωματικό, στο υφέρπον μυέλωμα (smoldering myeloma, SMM), και κατ' επέκταση στα τελικά στάδια του συμπτωματικού πολλαπλού μυελώματος, της εξωμυελικής ασθένειας και της πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας [28, 29].

Το MGUS εντοπίζεται στο 4% των Καυκάσιων ηλικίας >50 ετών [30, 31] και μπορεί να ταξινομηθεί σε λεμφοειδές (15%) ή σε πλασματοκυτταρικό (85%), ενώ εξελίσσεται σποραδικά με μέσο ρυθμό 1% το χρόνο σε ΠΜ και σε άλλες σχετιζόμενες κακοήθειες, όπως χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, λέμφωμα, λεμφοπλασματοκύττωμα και Waldenstrom μακροσφαιριναιμία [32]. Το SMM μπορεί να εξελιχθεί σε μυέλωμα με ρυθμό

περίπου 10% το χρόνο για τα πρώτα 5 χρόνια που ακολουθούν τη διάγνωση, 3% το χρόνο για τα επόμενα 5 χρόνια και 1.5% το χρόνο για μετέπειτα, γεγονός που επηρεάζεται από τον κυτταρογενετικό τύπο της ασθένειας. Ασθενείς με t(4;14) μετάθεση, 17p χρωμοσωμική έλλειψη και 1q πολλαπλασιασμό παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης του SMM σε μυέλωμα [33, 34].

Σύμφωνα με το προηγούμενο μοντέλο εξέλιξης του ΠΜ, από την προ-κακοήθη κατάσταση του MGUS στα τελικά στάδια της πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας και του εξωμυελικού μυελώματος, η νόσος φαίνεται να ακολουθεί μία πολυσταδιακή γραμμική διαδικασία, κατά την οποία ένα αρχικό κύτταρο-εξάπλωσης του μυελώματος (Myeloma-Propagating Cell, MPC) αποκτά με διαδοχικό τρόπο επιπλέον “γενετικά κρούσματα”, απορρυθμίζοντας την φυσιολογική του λειτουργία, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη των κλινικών και βιολογικών χαρακτηριστικών του συμπτωματικού μυελώματος [35, 36].

Ωστόσο, συγκριτικά με ό,τι πιστευόταν παλαιότερα, οι εξελίξεις στον τομέα των τεχνικών αλληλούχισης έχουν δείξει ότι το ΠΜ δεν φαίνεται να προέρχεται από ένα μοναδικό κακοήθες βλαστικό κύτταρο αλλά από ποικίλλες κλωνικά υποοομάδες κακοήθων κυττάρων οι οποίες παρουσιάζουν μία τεράστια γενετική ποικιλομορφία [29, 37, 38]. Σε αυτό το μοντέλο ενδοκλωνικής ετερογένειας, η προόδος της νόσου βασίζεται στην απόκτηση με τυχαίο τρόπο “γενετικών κρουσμάτων” ακολουθούμενη από την φυσική επιλογή του καλύτερα προσαρμοζόμενου κλώνου/ κλώνων (**Εικόνα 1.1**). Αυτή η θεωρία υποστηρίζεται και από την εμφάνιση της δικλωνικής ασθένειας ή της αλλαγής ιστύπου στις μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες στους υποτροπιάζοντες ασθενείς με ΠΜ [38]. Περίπου 3 με 6 διαφορετικοί υποκλώνοι είναι δυνατόν να ανιχνευτούν στο ΠΜ, ενώ γενωμικές αναλύσεις των δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία προόδου της νόσου έδειξαν ότι το ΠΜ μπορεί να εξελιχτεί ακολουθώντας και το γραμμικό και το πολυκλωνικό μοντέλο [39, 40]. Παρόλα αυτά, η κλωνική ετερόγενεια εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της νόσου [37] και εάν 3 με 6 κλώνοι είναι ήδη παρόντες όταν η ασθένεια γίνεται συμπτωματική, τότε το πολυκλωνικό μοντέλο αντιπροσωπεύει τον πιο κατάλληλο μηχανισμό που μπορεί να εξηγήσει την βιολογία και την εξέλιξη του ΠΜ [29].



**Εικόνα 1.1:** Κλωνική σύνθεση του ΠΜ κατά τη διάρκεια προόδου και θεραπείας της νόσου.

Κατά τη διάρκεια εξέλιξης από το MGUS στο ΠΜ, τα αρχικά κακοήθη κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση υποκλώνων που ανιχνεύονται κυρίως στα αρχικά στάδια και φέρουν μοναδικές μεταλλάξεις, *x*, οι οποίες ίσως να είναι ανιχνεύσιμες και στο στάδιο υποτροπής της νόσου. **(Α)** Στις υψηλού κινδύνου περιπτώσεις, υποκλώνοι οι οποίοι ίσως δεν ήταν ανιχνεύσιμοι στα αρχικά στάδια μπορεί να αποκτήσουν επιλέον μεταλλάξεις, *xy*, και να κυριαρχήσουν στα επόμενα στάδια υποτροπής. **(Β)** Υποκλώνοι οι οποίοι προέρχονταν από τα αρχικά κακοήθη κύτταρα και δεν ήταν ανιχνεύσιμοι στη φάση της αρχικής διάγνωσης, μπορούν να εξελιχθούν από μία λανθάνουσα κατάσταση στον κυρίαρχο κλώνο στο στάδιο της υποτροπής, φέροντας διαφορετικές μεταλλάξεις, *z*. **(C)** Υποκλώνοι που φέρουν νέες μεταλλάξεις (*xy*) είναι πιθανό να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη συμβατική θεραπεία, συγκριτικά με τους κλώνους με μοναδικές μη-γραμμικές μεταλλάξεις *x* ή *z* [38].

### 1.1.3.3. Γενετική βάση της νόσου

Στο ΠΜ οι καρύοτυποι φαίνεται να παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες με εκείνους των επιθηλιακών τύπων καρκίνου και της χρόνιας μυελωειδής λευχαιμίας συγκριτικά με άλλες αιματολογικές κακοήθειες. Παρόλα αυτά, όπως έχει δείξει ο συγκριτικός γενομικός υβριδισμός, ο αριθμός των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων είναι αρκετά αυξημένος σε σχέση με τους επιθηλιακούς τύπους καρκίνου, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την παρουσία μεγάλου αριθμού διαφορετικών υποτύπων της ασθένειας που σχετίζονται με μοναδικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και κλινικές εκβάσεις [41].

Το ΠΜ μπορεί να διακριθεί κυρίως στους υπερδιπλειδείς υποτύπους, οι οποίοι φέρουν τρισωμίες και αποτελούν μία πιο ήπια μορφή της ασθένειας και στους μη-υπερδιπλοειδείς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία μετατοπίσεων στον *IGH* γονιδιακό τόπο (*immunoglobulin heavy locus*), οι κυριότερες από τις οποίες αφορούν τις



t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) και t(14;16)(q32;q23) και οι οποίες σχετίζονται με πιο επιθετικό φαινότυπο και μικρότερο χρόνο επιβίωσης [41] (Πίνακας 1.1). Και οι δύο αυτές γενετικές βλάβες εντοπίζονται στην πλειοψηφία των ασθενών και έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση των γονιδίων της κυκλικής D [42].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από το βλαστικό κέντρο που αποτελεί το σημείο προέλευσης της ασθένειας, σε ένα ποσοστό των ασθενών ο μετασχηματισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί νωρίτερα στο στάδιο του ανώριμου προ-B-λεμφοκυττάρου [43]. Πρόσφατες γενωμικές αναλύσεις έχουν ταυτοποιήσει γονιδιακές περιοχές στα χρωμοσώματα 3p22.1, 7p15.3 και 2p23.3 οι οποίες ευθύνονται για το 4% του οικογενειακού κινδύνου στο ΠΜ, προτείνοντας ότι μεταβολές στα γονίδια ULK4 (*unc-51 like kinase 4*), DNAH11 (*dynein, axonemal, heavy chain 11*), CDCA7L (*cell division cycle associated 7-like*), DNMT3A (*DNA cytosine-5-methyltransferase 3 alpha*), και DTNB (*dystrobrevin beta*), που εντοπίζονται σε αυτές τις χρωμοσωμικές περιοχές ίσως προηγούνται των *IGH* μετατοπίσεων, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μυελώματος [44].

Οι *IgH* μετατοπίσεις περιλαμβάνουν κυρίως τις οικογένειες των κυκλικών D (*CCND*) και *MAF* και τα γονίδια *MMSET/FGFR3* [32, 45]. Η υπερέκφραση των γονιδίων της κυκλικής D συμβαίνει κυρίως στα αρχικά στάδια της νόσου, επηρεάζοντας της G1/S μετάπτωση [29], ενώ η απορρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα *MAF* οδηγεί σε αυξημένη έκφραση πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των *CCND2* και των μορίων προσκόλλησης, ενισχύοντας την αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του όγκου [42, 46, 47]. Το *MMSET* θεωρείται υποψήφιο γονίδιο για ένα σύνδρομο πολλαπλής δυσμορφίας γνωστό ως Wolf-Hirschhorn και αποτελεί έναν παράγοντα αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης που υπερεκφράζεται σε όλους τους όγκους που παρουσιάζουν μετατόπιση t(4;14), ενώ περίπου στο 20% των όγκων απουσιάζει το der(14) και η έκφραση του *FGFR3* [48]. Υπερέκφρασή του έχει βρεθεί να επηρεάζει τη μεθυλίωση των ιστονών H3K36 και H3K27 [42, 49, 50], μεταβάλλοντας κατ' επέκταση την γονιδιακή έκφραση, ενώ απώλεια του επηρεάζει την προσκόλληση, καταστέλλει την ανάπτυξη και οδηγεί σε απόπτωση στις HMCLs κυτταρικές σειρές, γεγονός που το καθιστά έναν σημαντικό υποψήφιο θεραπευτικό στόχο [50]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από το ενεργοποιημένο μετάλλαγμα *FGFR3*, και το αγρίου τύπου (που εντοπίζεται στους περισσότερους t[4;14] τύπους), μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου [51].

Προκλινικές μελέτες προτείνουν ότι οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών είναι ενεργοί μόνο στις t(4;14) HMCLs κυτταρικές σειρές με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *FGFR3*, ενώ τα αντι-FGFR3 μονοκλωνικά αντισώματα που αναστέλλουν την FGFR3 σηματοδότηση αλλά παρουσιάζουν ταυτόχρονα και αντισωματο-εξαρτώμενη, κυτταρο-μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα είναι ενεργά στις HMCLs που εκφράζουν το αγρίου τύπου γονίδιο [52, 53].

Μεταλλάξεις με τη μορφή των μονονουκλεοτιδικών ποικιλομορφιών, των ανωμαλιών στον αριθμό των χρωμοσωμικών αντιγράφων και των επιγενετικών αλλαγών ευθύνονται για την προόδο της νόσου [35, 54], ενεργοποιώντας διάφορα ογκογενετικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των *RAS/MAPK* (RAS family/mitogen-activated protein kinase pathway) [45, 55, 56], *MYC* (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) [51] και NF-kB [55, 57].

Η επικράτηση των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων σε ένα από τα *RAS* γονίδια (*NRAS* ή *KRAS*) είναι περίπου 50% στο ΠΜ και είναι υψηλότερη στους όγκους που εκφράζουν το *CCND1* [57]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ΠΜ εξαρτάται από τη συνεχιζόμενη έκφραση του ενεργοποιημένου *RAS* [58] και ότι παρόλο που οι μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι αποτελούν ένα καθοριστικό γεγονός στην προόδο της ασθένειας, μπορεί να μην εντοπίζονται σε όλα τα μυελωματικά κύτταρα αλλά να περιορίζονται σε ένα μόνο μικρό ποσοστό κλώνων. Μεταλλάξεις στο *NRAS* γονίδιο έχουν ανιχνευτεί στους ασθενείς με MGUS σε σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα (7%) [32], ενώ πρόσφατα, *BRAF* μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί για το 4% των ασθενών με ΠΜ [55]. Οι *NRAS* και *KRAS* μεταλλάξεις έχουν παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες επιδράσεις, γεγονός που ενισχύεται από το ότι και τα δύο είδη μεταλλάξεων μπορεί να εντοπίζονται στον ίδιο ασθενή [59].

Η απορρύθμιση του *MYC* συνιστά ένα βασικό γεγονός στο ΠΜ, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι οι HMCLs κυτταρικές σειρές εξαρτώνται για την επιβίωσή τους από το συγκεκριμένο γονίδιο [60]. Το γονίδιο *MYC* εντοπίζεται στον χρωμοσωμικό τόπο 8p14, ανωμαλίες του οποίου παρουσιάζουν μεγάλη συχνότητα στους ασθενείς με ΠΜ. Ανωμαλίες του 8q έχουν αναφερθεί στο 15% των περιπτώσεων, ενώ αναδιατάξεις του 8q24 σε άνω του 47% των ασθενών με ΠΜ [61-63]. Το *MYC* έχει βρεθεί να ενεργοποιείται κατά την μετάβαση από το MGUS στο ΠΜ [64], ενώ αναδιατάξεις του έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του εξαιτίας του συν-εντοπισμού ενεργών ενισχυτών στις συνοδές περιοχές, οι οποίες συνήθως αφορούν γονίδια, όπως τα *FAM46C* (family with

sequence similarity 46, member C), *XBPI* (X-box binding protein 1) και *IGL* (immunoglobulin lambda locus) με γνωστή λειτουργία στο μυέλωμα ή στη βιολογία των Β-λεμφοκυττάρων [65].

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του ΠΜ και του MGUS χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκφραση γονιδίων-στόχων του NF-κΒ, γεγονός που δείχνει το βασικό ρόλο του NF-κΒ σηματοδοτικού μονοπατιού στο ΠΜ [66, 67]. Τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών παράγουν πρόσδετες, όπως οι APRIL (a proliferation-inducing ligand) και BAFF (B-cell activating factor) που ενεργοποιούν τους υποδοχείς TACI (transmembrane activator και CAML interactor), BCMA (B-cell maturation) και BAFF, επάγοντας το συγκεκριμένο μονοπάτι και την επιβίωση των πλασματοκυττάρων [68]. Μεταλλάξεις στους θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές του μη-κανονικού μονοπατιού του NF-κΒ, όπως οι *TRAF2* (TNF receptor-associated factor 2), *TRAF3*, *CYLD* (cylindromatosis/turban tumor syndrome), *cIAP1/cIAP2* (baculoviral IAP repeat containing 2/3 [*BIRC2/BIRC3*]) και *NIK* (NF-κΒ-inducing kinase [*MAP3K14*]), έχουν ταυτοποιηθεί στο 20% των ασθενών και στο 50% των μυελωματικών κυτταρικών σειρών [66, 67] και μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μονοπατιού απουσία των προσδετών, επηρεάζοντας την απόκριση στη θεραπεία και συμβάλλοντας πιθανώς στην επέκταση της εξωμυελικής ασθένειας [29].

Άλλες γενετικές βλάβες που είναι πιθανότερο να συμβούν σε μεταγενέστερα στάδια της ασθένειας αφορούν κυρίως απώλειες του χρωμοσώματος 17p και ανωμαλίες του *TP53*, κέρδος του χρωμοσώματος 1q και απώλεια του 1p. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις του *TP53* είναι παρούσες στο 37% των περιπτώσεων του ΠΜ με έλλειμμα του 17p, αλλά όχι στους ασθενείς χωρίς del17p [69]. Πρόσφατα, μειωμένη έκφραση των microRNAs, miR199, miR192 και miR215 στο ΠΜ έχει βρεθεί να οδηγεί σε άυξηση του MDM2, ενός αναστολέα του *TP53* [70]. Το κέρδος του χρωμοσώματος 1q και η απώλεια του 1p συνήθως συναντώνται μαζί στο ΠΜ και έχει βρεθεί να σχετίζονται με μειωμένη πρόγνωση [45, 62]. Τα ανάλογα γονίδια στο 1q είναι άγνωστα προς το παρόν, ενώ στο 1p δύο γενετικές περιοχές που σχετίζονται με μειωμένη πρόγνωση περιλαμβάνουν τις *CDKN2C* (p18INK4c) στο 1p32.3 και *FAM46C* στο 1p12 [71, 72]. Πρόσφατα, η απώλεια του χρωμοσώματος 13, η οποία θεωρούνταν ένας φτωχός προγνωστικός δείκτης, έχασε τη σημασία του όταν βρέθηκε ότι οι αρνητικές επιδράσεις στην επιβίωση οφειλόταν στην συγγή συσχέτισή του με το t(4;14) [46]. Η συγκεκριμένη γενετική βλάβη φαίνεται να

συμβαίνει στα αρχικά στάδια του MGUS και της προόδου του ΠΜ [73] και σχετίζεται με ανεπάρκεια του *RBI* [45].

Η αυξημένη υπομεθυλίωση του DNA που σχετίζεται με μετάπτωση από το MGUS στο ΠΜ, οι μεταλλάξεις στα γονίδια που ρυθμίζουν τον RNA μεταβολισμό, την πρωτεϊνική μετάφραση και την ομοιόσταση που έχουν ταυτοποιηθεί στους 16 από τους 38 ασθενείς, οι μεταλλάξεις σε άλλα τροποποιητικά ένζυμα ιστονών με σχετιζόμενες επιγενετικές επιπτώσεις και οι αλλαγές στην έκφραση των microRNA στα διάφορα στάδια της ασθένειας αποτελούν επιπλέον παθολογικά γεγονότα που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου [48].

**Πίνακας 1.1:** Δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και εμπλεκόμενα ογκογονίδια στο ΠΜ [41]

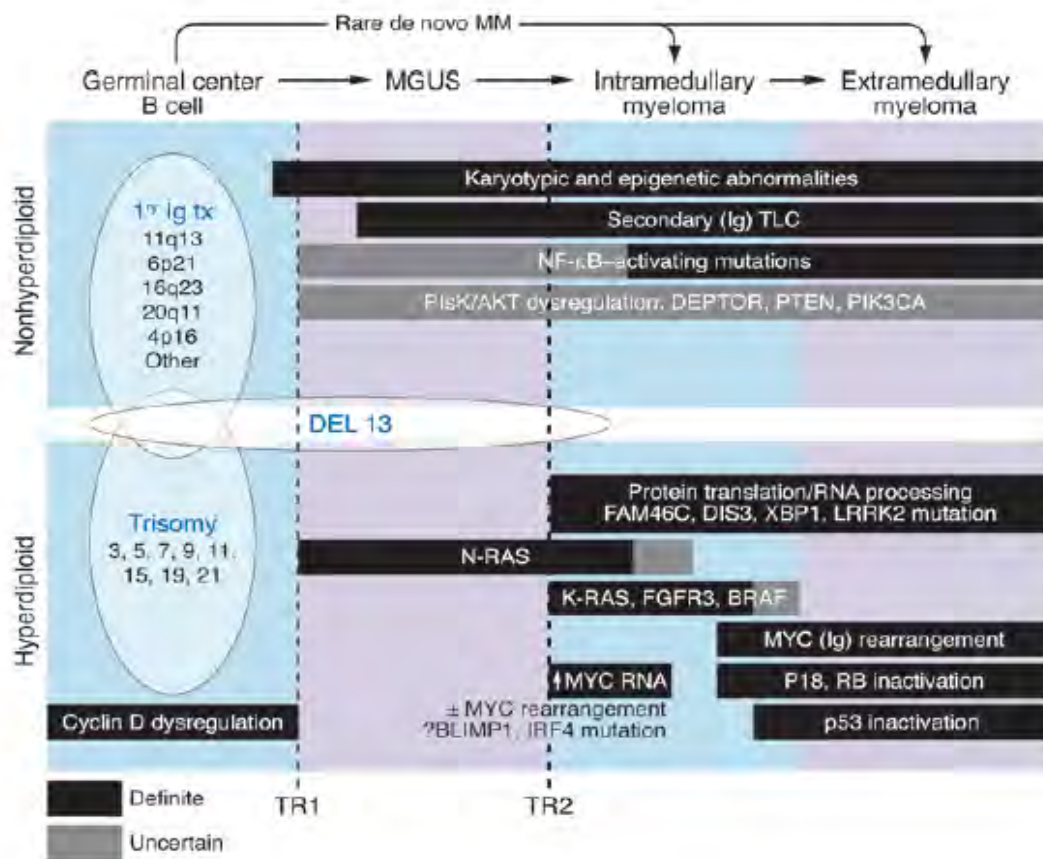
Chromosomal abnormality	Genetic location	Incidence of cytogenetic abnormalities detected by conventional cytogenetics or FISH	Involved oncogene	Function
13q deletion t(4;14)	Usually 13q14 4p16.3 14q32	15% (50%) Undetected (15%)	RB-1 FGFR3, MMSET TACC3	Cell cycle regulator Growth factor receptor tyrosine kinase Regulator of transcription Unknown
t(6;14)(p21;q32) t(6;14)(p25;q32)	6p21 14q32 6p25 14q32	(3–4%) (5%)	Cyclin D2 Cyclin D3 MUM/IRF4	Cell cycle regulator Cell cycle regulator Transcriptional regulator of IFN
t(14;16)	14q32 16q23	(2–10%)	c-MAF WWOX	Transcription factor Unknown
t(8;14)(q24;q32) t(14;20) t(14;18)	8q24 14q32 14q32 20q12 14q32.33 18q21.3	4–5% Recently defined (5%)	c-myc b-MAF BCL-2	Cell cycle regulator Transcription factor Apoptosis inhibitor
17 p deletion	17p13	5% (10–15%)	P53	Cell cycle regulator; DNA repair replication
Chromosome 1 abnormalities		20%	K-RAS, N-RAS gene mutations	Signal transduction regulator; cell cycle regulator
t(11;14)	14q32	5% (15–20%)	Cyclin D1 2. MYEOV	Cell cycle regulator Unknown

BCL-2, B cell CLL/lymphoma 2; b-MAF, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog B (avian); c-MAF, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian); c-myc, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian); FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; IFN interferon; K-RAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MMSET, multiple myeloma SET domain; MUM/IRF4, maternal effect uncoordinated and malformed/IFN regulatory factor 4; MYEOV, myeloma overexpressed; N-RAS, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; p53, protein 53; RB-1, retinoblastoma protein-1; TACC3, transforming, acidic coiled-coil-containing protein 3; WWOX, WW domain-containing oxidoreductase.

#### 1.1.3.4. Μοντέλο μοριακής παθογένειας για το MGUS και το ΠΜ

Μελέτες έχουν δείξει ότι η παθογένεση του MGUS και του ΠΜ μπορεί να πραγματοποιηθεί σε 3 φάσεις (Εικόνα 1.2). Πρωτογενή μερικώς επικαλυπτόμενα γενετικά

γεγονότα κοινά και στις δύο νόσους που περιλαμβάνουν κυρίως τις IgH μετατοπίσεις, την υπερδιπλειδία και την απώλεια του χρωμοσώματος 13 (del13), μπορούν να οδηγήσουν άμεσα ή έμμεσα στην απορρύθμιση του *CCND* γονιδίου. Δευτερογενώς, η μετάπτωση από το MGUS στο ΠΜ βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του *MYC*, μεταλλάξεις του *KRAS* και del13 στους t(11;14) όγκους. Ο αυξημένος πολλαπλασιασμός, η γενωμική αστάθεια και η μειωμένη εξάρτηση από το μικροπεριβάλλον του όγκου που πολλές φορές σχετίζονται με την εξωμυελική μορφή της ασθένειας έχει βρεθεί να εμπλέκουν αναδιατάξεις του *MYC* που συχνά περιλαμβάνουν Ig γονιδιακούς τόπους, ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του NF-κB μονοπατιού, απώλειες ή μεταλλάξεις του *TP53* και απενεργοποίηση των *p18INK4c* και *RBI* [48].



**Εικόνα 1.2:** Μοντέλο για την μοριακή παθογένεση του MGUS και του ΠΜ. Η αρχική φάση μετάπτωσης (TR1) σε έναν γνωστό τύπο καρκίνου εμπλέκει 2 μη επικαλυπτόμενα μονοπάτια (IgH μετατοπίσεις vs πολλαπλές τρισωμίες) που περιλαμβάνουν πρωτογενή γεγονότα σχετιζόμενα με απορρυθμισμένη έκφραση της κυκλίνης D στο MGUS και στο ΠΜ. Η μετάπτωση από το MGUS στο ΠΜ (TR2) σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του *MYC* και μερικές φορές με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *KRAS* ή με del13. Παρουσιάζονται τα πρωτογενή και δευτερογενή γεγονότα που εμπλέκονται στην εξέλιξη του συμπτωματικού ΠΜ [48].

### 1.1.3.5. Ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στο ΠΜ

Τα μυελωματικά (MM) κύτταρα αναπτύσσονται κυρίως μέσα στο μυελό των οστών και εξαρτώνται για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, το οποίο περιλαμβάνει την εξωκυττάρια μήτρα, τα αιμοποιητικά κύτταρα στα οποία ανήκουν τα μυελωειδή, τα T- και B-λεμφοκύτταρα, τα NK και οι οστεοκλάστες και τα μη αιμοποιητικά, στα οποία ανήκουν τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (BMSCs, Bone Marrow Stromal Cells), οι ινοβλάστες, οι οστεοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [74]. Αμοιβαίες θετικές και αρνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των κυττάρων μεσολαβούνται από μόρια προσκόλλησης, κυτοκίνες και υποδοχείς, επάγοντας διάφορες διαδικασίες, όπως τη διασπορά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε δευτερογενείς θέσεις του μυελού των οστών, την παραγωγή διαφόρων παρακρινών παραγόντων (κυρίως IGF-1, IL-6 και APRIL) που εμπλέκονται στην επιβίωση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την αγγειογένεση, την οστεοκλαστογένεση, την αναστολή της οστεοβλαστογένεσης, την ανθεκτικότητα στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, την χυμική και κυτταρική ανοσοκαταστολή και την αναιμία [48] (Εικόνα 1.3).

Συγκεκριμένα, τα προερχόμενα από τα μυελωειδή κατασταλτικά κύτταρα (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSCs) που φυσιολογικά διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα έχει βρεθεί να αυξάνονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και στο περιφερικό αίμα στους ασθενείς με ΠΜ συγκρικά με τους υγιείς, λόγω της αναστολής της διαφοροποίησής τους από τους εκκρινόμενους από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος και τα καρκινικά παράγοντες [75-78]. Τα MDSCs μπορούν να οδηγήσουν σε καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, μέσω έκφρασης κατασταλτικών παραγόντων του ανοσοποιητικού, όπως είναι η αργινάση, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) [74]. Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι τα MDSCs που προέρχονται από ασθενείς με ΠΜ μπορούν να επάγουν την ανάπτυξη περισσότερων Tregs, τα οποία είναι ανενεργή και κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα, σε σχέση με εκείνα από υγιή άτομα [79], ενώ αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 5 (PDE5) βρέθηκε να αναστέλλουν την στρατολόγηση των MDSCs μέσω μειορύθμισης της έκφρασης της αργινάσης 1 και της συνθάσης-2 του NO [80-82].

Τα Tregs αποτελούν υποομάδα των CD4+ T-λεμφοκυττάρων που καταστέλλει τη δράση των αντιγοπαρουσιαστικών κυττάρων και των T-κυττάρων τελεστών είτε μέσω άμεσης επαφής είτε μέσω απελευθέρωσης των αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-10 και TGF-β [74]. Μελέτες έχουν δείξει αύξηση των Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ, ενώ το αυξημένο ποσοστό τους έχει συσχετιστεί με μειωμένο χρόνο προόδου (Time to Progression) [83] και μειωμένη ολική επιβίωση [84]. Οι *Beyer et al.* [85] έδειξαν ότι τα Tregs από τους ΠΜ ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερη κατασταλτική δράση σε σχέση με εκείνα από τους υγιείς, εκφράζοντας υψηλότερα επίπεδα των IL-10 και TGF-β. Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα, όπως η λεναλιδομίδη και η πομαλιδή καθώς και χαμηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης (CYC), έχει αναφερθεί να αναστέλλουν την επέκταση και τη δράση των Tregs [86, 87].

Οι *Chauhan et al.* [88] έδειξαν ότι τα πλασμακυτοειδή δενδριτικά κύτταρα (Plasmacytoid DCs, pDCs) αυξάνονται στο μυελό των οστών των ασθενών με ΠΜ σε σχέση με τους υγιείς, επάγοντας ανάπτυξη, επιβίωση, χημειοταξία και ανθεκτικότητα στα χημειοθεραπευτικά, ενώ αναστολή των Toll-like υποδοχέων με CpG ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια βρέθηκε να επαναφέρει τη φυσιολογική δράση των pDCs, αναστέλλοντας την pDC-επαγόμενη ανάπτυξη των MM κυττάρων.

Επίσης, τα NK κύτταρα έχει δείχτει να αυξάνονται στο περιφερικό αίμα [89] και στο μυελό των οστών [90] των ασθενών με ΠΜ, ενώ έχει αναφερθεί μειωμένη έκφραση του επιφανειακού υποδοχέα τους, NKG2D (Natural Killer Group 2), λόγω πιθανώς των αυξημένων επιπέδων του προσδέτη του, MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με την επιφάνεια των MM κυττάρων, επάγοντας έτσι εξασθενημένη λεμφοκυτταρική κυτταροτοξικότητα [91]. Η ελαττωματική λειτουργικότητα των NK κυττάρων μπορεί επίσης να εξηγηθεί και από την έκφραση του PD-1 (Programmed cell death 1) στην επιφάνεια τους στους ΠΜ ασθενείς [92], οι οποίοι συνδέονται με τον προσδέτη τους, PD-L1, που εκφράζεται στα MM κύτταρα. Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή IFN-γ και IL-2 από τα T-κύτταρα και αναστολείς του πρωτεασώματος, όπως το bortezomib μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα του MICA στην επιφάνεια των MM κυττάρων, επάγοντας έτσι την ενεργοποίηση των NK κυττάρων [74].

Σε μία μελέτη δείχτηκε ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) και του ενδοκυττάρου μορίου προσκόλλησης ICAM-1 στα MM κύτταρα με

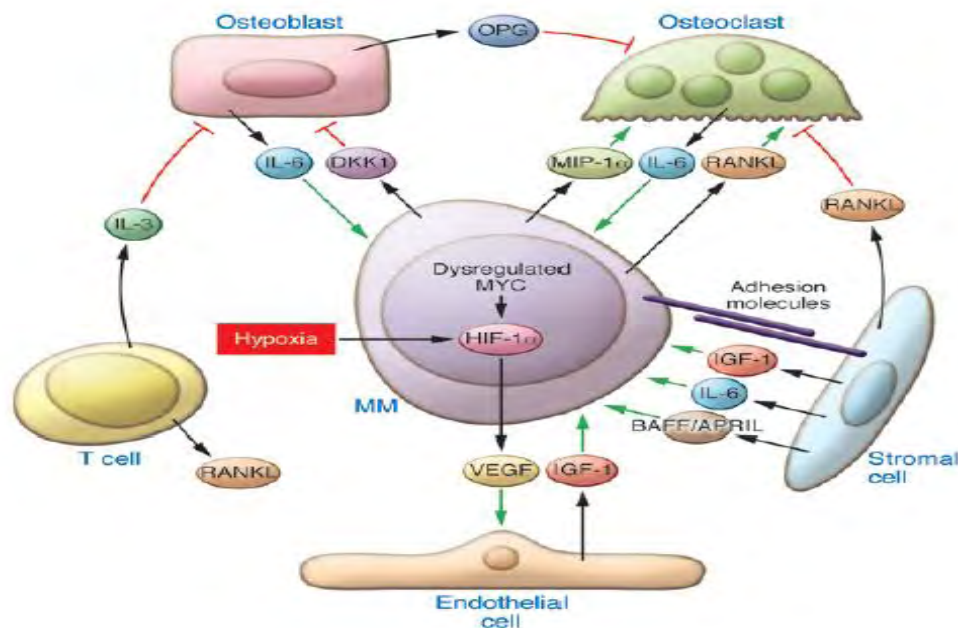
τις E/P σελεκτίνες και τα CD18 στα μακροφάγα αντίστοιχα, αναστέλλει την επαγόμενη από τα φάρμακα απόπτωση, μέσω διέγερσης των SRC, ERK1/2 και c-MYC και καταστολής της ενεργοποίησης των κασπασών [93]. Επίσης, τα σχετιζόμενα με το μύελωμα μονοκύτταρα/μακροφάγα έχει βρεθεί να αποτελούν σημαντική πηγή ιντερλευκίνης-1b (IL-1b), IL-10 και TNF-a καθώς και IL-6, η οποία όμως προέρχεται και από τα στρωματικά κύτταρα [74]. Επιπλέον, παράγουν προ-αγγειογενετικές κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως οι VEGF, IL-8 και FGF-2 καθώς και ένα ευρύ φάσμα αγγειογενετικών τροποποιητικών ενζύμων, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας, η κυκλοοξυγενάση-2 και ο CSF-1 (Colony-Stimulating Factor 1) [94].

Τα μυελωματικά κύτταρα προσκολλώνται στα BMSCs και στην εξωκυττάρια μήτρα μέσα στο μυελο των οστών, επάγοντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην αυξορύθμιση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών [95]. Στο ΠΜ τα BMSCs εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, όπως τα ICAM-1 και VCAM-1 σε υψηλότερα επίπεδα από τα φυσιολογικά BMSCs που έχουν ως αποτέλεσμα τη δέσμευση των MM κυττάρων. [96]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των BMSCs επάγει την ενεργοποίηση του NF-kB μονοπατιού και την έκκριση IL-6 από τα BMSCs, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την παραγωγή του VEGF από τα μυελωματικά. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση του Notch μονοπατιού, η οποία διεγείρει την έκκριση IL-6, VEGF και IGF-1 και σχετίζεται με τον MM κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση [97, 98]. Επιπλέον, τα BMSCs από τους ΠΜ ασθενείς βρέθηκε να εκφράζουν προ-αγγειογενετικά μόρια, όπως οι VEGF, bFGF, αγγειοποιητίνη (Ang-1), TGF-β, PDGF, HGF και IL-1 [99]. Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει έκκριση του GDF15 (Growth Differentiation Factor 15) από τα BMSCs στο ΠΜ, η οποία διεγείρει την επιβίωση των εξαρτώμενων από το στρώμα μυελωματικών κυττάρων και ενισχύει την δυνατότητα αυτοανανέωσής τους [100].

Τέλος, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων του ΠΜ, έχει χαθεί η ισορροπία μεταξύ της δράσης των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, οδηγώντας σε καταστροφή των οστών και ανάπτυξη οστεολυτικών βλαβών [101]. Έχει αναφερθεί ότι οι οστεοβλαστες μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεση του ΠΜ, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση των MM κυττάρων, μέσω έκκρισης της IL-6 και της οστεοπροτεγερίνης (OPG), παρεμποδίζοντας έτσι τον TRAIL-μεσολαβούμενο προγραμματισμένο MM κυτταρικό θάνατο [102]. Αυξημένα επίπεδα του Dickkopf-1 (DKK1), ενός αναστολέα του Wnt



σηματοδοτικού μονοπατιού που δρα μέσω δέσμευσης του LRP5/6, καταστέλλοντας την οστεοβλαστική δραστηριότητα, έχουν βρεθεί στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών των ασθενών με ΠΜ [103]. Από την άλλη, στους παράγοντες που εκκρίνονται από τα ΜΜ κύτταρα και έχει βρεθεί να παίζουν βασικό ρόλο στην οστεοκλαστική δραστηριότητα περιλαμβάνονται οι RANKL, MIP-1 (macrophage-inflammatory protein-1a), IL-3 και IL-6 [104]. Συγκεκριμένα, ο RANK που αποτελεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα εκφραζόμενο στους οστεοκλάστες δεσμεύεται με τον προσδέτη του RANKL, του οποίου η έκφραση αυξάνεται, λόγω της αλληλεπίδρασης των BMSCs-MM, επάγοντας τη διαφοροποίηση των ανώριμων οστεοκλαστών μέσω των NF-κΒ και JunN-terminal kinase σηματοδοτικών μονοπατιών και αναστέλλοντας την απόπτωσή τους [105]. Το ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα Denosumab δεσμεύει με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση τον προσδέτη RANKL, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση RANKL-RANK, οδηγώντας κατ'επέκταση σε καταστολή των δεικτών της οστεοκλαστικής οστικής αναρρόφησης [106].



**Εικόνα 1.3:** Αλληλεπιδράσεις των ΜΜ κυττάρων με τα ΒΜSCs. Μερικοί από τους πιο σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως είναι η IL-6 εκκρίνονται από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Εξωκυττάρια σήματα, όπως η υποξία και ενδοκυττάρια που οφείλονται στην απορρύθμιση του MYC, διεγείρουν την έκκριση των HIF-1α και VEGF, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την παραγωγή του IGF-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ανάπτυξη οστεολυτικών βλαβών οφείλεται στην αυξημένη οστεοκλαστική και στην μειωμένη οστεοβλαστική δραστηριότητα. Θεραπευτικοί παράγοντες που άμεσα αναστέλλουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τα διφωσφονικά, τα anti-RANKL και anti-DKK1 αντισώματα και την εξωγενή OPG [48].

#### 1.1.4. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΜ

##### 1.1.4.1. Διάγνωστικές μέθοδοι (Diagnostic Workup)

Οι καθιερωμένες μέθοδοι σκριναρίσματος του ΠΜ (Πίνακας 1.2) περιλαμβάνουν τον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης M με μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης του ορού, ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης του ορού και των ούρων (Serum and Urine Protein Electrophoresis, SPEP, UPEP), ανοσοκαθίλωση στον ορό και στα ούρα (Serum immunofixation, SIFE) και με ανίχνευση των ελαφριών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης στον ορό (Free Light Chains, FLC) [107]. Επιπρόσθετοι παράμετροι περιλαμβάνουν ολικές εξετάσεις αίματος και μέτρηση της κρεατινίνης του ορού και των ηλεκτρολυτών, όπως το ασβέστιο, η γαλακτική αφυδρογονάση και η β2 μικρογλοβουλίνη, ενώ στους ύποπτους ασθενείς απαιτείται και λήψη δείγματος από το μυελό των οστών με αναρρόφηση ή με βιοψία [38]. Επίσης, αναλύσεις του μυελού των οστών με φθορίζων *in situ* υβριδισμό (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH) απαιτούνται στα αρχικά στάδια της διάγνωσης για την ανίχνευση των t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14) και t(14;20), των τρισωμιών και της απώλειας του χρωμοσώματος 17p [108], ενώ και το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης εάν είναι διαθέσιμο, παρέχει επιπλέον προγνωστική αξία [109].

Ο ακτινολογικός έλεγχος του σκελετού είναι απαραίτητος για την ανίχνευση των οστεολυτικών βλαβών, της έντονης οστεοπενίας και των παθολογικών καταγμάτων [110], ενώ οι MRI και PET-CT ως πιο ευαίσθητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν συμπτωματικές περιοχές δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες ή όταν υπάρχουν αμφιβολίες για την πραγματική επέκταση της οστικής ασθένειας με τις ακτινογραφίες ρουτίνας καθώς και στις περιπτώσεις του SMM και του μονήρους πλασματοκυτώματος (solitary plasmacytoma) [111, 112].

Για τον έλεγχο της απόκρισης στη θεραπεία, ο καταλληλότερος δείκτης είναι η μέτρηση των επιπέδων της πρωτεΐνης M, τα οποία θεωρούνται ανιχνεύσιμα εάν είναι  $\geq 1\text{gm/dL}$  στον ορό ή/και  $\geq 200\text{mg/μέρα}$  στα ούρα. Σε ασθενείς με έκκριση ελαφριών αλυσίδων, η πρωτεϊνουρία Bence-Jones σε δείγματα ούρων 24h απαιτείται για την παρακολούθηση της νόσου, ενώ σε ασθενείς με ολιγοεκκριτικό ΠΜ κατάλληλο είναι το FLC assay, με δεδομένο ότι ο FLC λόγος είναι μη φυσιολογικός και τα FLC επίπεδα είναι τουλάχιστον  $100\text{mg/L}$  [113]. Στην σπάνια περίπτωση του μη εκκριτικού ΠΜ, η μέτρηση

των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και η παρουσία κλινικών εκδηλώσεων εξαιτίας της βλάβης των οργάνων είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της απόκρισης στη θεραπεία και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου [114].

**Πίνακας 1.2: Μέθοδοι για την διάγνωση του ΠΜ [38].**

Test	
Blood	Serum protein electrophoresis and immunofixation Serum immunoglobulins quantitative Serum free light chain assay Total serum protein, serum albumin, creatinine, calcium, electrolytes, lactate dehydrogenase, $\beta$ 2-microglobulin Haemoglobin, white blood cell count, differential count, platelet count
Urine	Urine protein electrophoresis and immunofixation 24 h urine for total protein, light chains
Bone marrow	Aspirate and biopsy for plasma cell count, morphology, amyloid* Cytogenetic evaluation and fluorescence in-situ hybridisation for the detection of del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), 1q+
Bones	Skeletal survey (conventional x-ray) or low-dose CT scan without contrast
Whole body	MRI*, PET-CT* Tissue biopsy for solitary or extraosseous plasmacytoma*

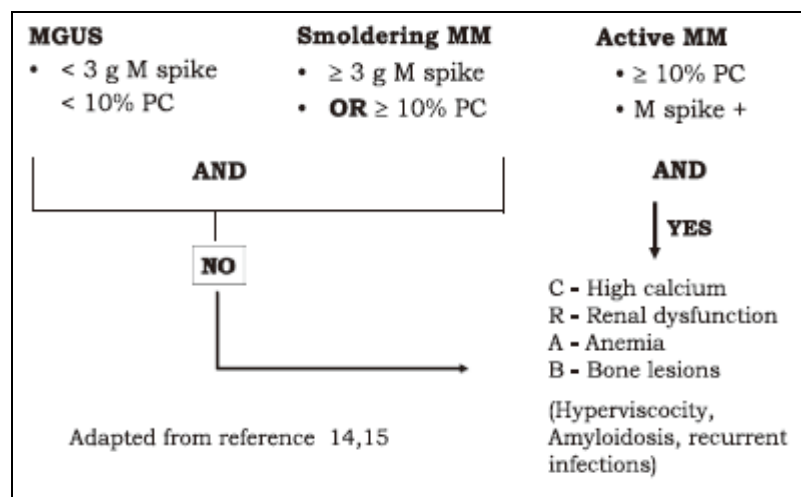
\*Useful under some circumstances.

#### 1.1.4.2. Διαγνωστικά Κριτήρια

Τα πιο πρόσφατα διαγνωστικά κριτήρια έχουν προταθεί από το International Myeloma Working Group (IMWG). Η διάγνωση του ΠΜ βασίζεται στην παρουσία: α) τουλάχιστον 10% κλωνικών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών και β) μονοκλωνικής πρωτεΐνης στον ορό ή/και στα ούρα. Η κατάταξή του ως ασυμπτωματικό ή συμπτωματικό εξαρτάται από την παρουσία ή όχι οργανικών/ιστικών βλαβών, όπως υπερασβεστιαμία λόγω της διάλυσης του οστικού ιστού, νεφρική ανεπάρκεια λόγω της υψηλής παραγωγής παραπρωτεϊνών, αναιμία, βλάβες των οστών καθώς και από άλλα σχετιζόμενα με το μυέλωμα συμπτώματα, όπως είναι το σύνδρομο του υπεριξώδους και οι συχνές λοιμώξεις τα οποία καλούνται CRABO κριτήρια [101, 115] (Εικόνα 1.4). Στο μη εκκριτικό ΠΜ που συνιστά το 2% του ΠΜ, η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία του 30% των μονοκλωνικών

πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών ή στην ανίχνευση πλασματοκυττώματος στην βιοψία [114].

Το MGUS που συνήθως προηγείται του συμπτωματικού ΠΜ, διακρίνεται κλινικά από το ΠΜ από την απουσία οργανικών/ιστικών βλαβών και από την παρουσία  $<3\text{g/dl mIg}$  στον ορό και  $<10\%$  πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών [116]. Παρόλο που στο MGUS τυπικά οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, μερικές φορές μπορεί να ανιχνευτεί πρωτογενής αμυλοείδωση, ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης των παθολογικών mIg στους διάφορους ιστούς [117, 118]. Το SMM χαρακτηρίζεται επίσης από απουσία οργανικών βλαβών και διαφέρει από το MGUS εξαιτίας της παρουσίας  $>3\text{g/dl mIg}$  στον ορό ή  $>10\%$  πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, παρουσιάζοντας ρυθμό εξέλιξης σε συμπτωματικό ΠΜ περίπου 10% το χρόνο [48].



**Εικόνα 1.4:** Διαγνωστικά κριτήρια για το ΠΜ [101]

#### 1.1.4.3. Κατηγοριοποίηση με βάση την επικινδυνότητα της νόσου (Risk Stratification)

Η πρόγνωση στο ΠΜ εξαρτάται από παράγοντες όπως η ηλικία, η κατάσταση του ασθενούς, η παρουσία συνοδών νοσημάτων, το στάδιο, η επιθετικότητα της νόσου και η απόκριση στη θεραπεία [119]. Η σταδιοποίηση του ΠΜ με βάση το Durie-Salmon Staging [120] ή το International Staging System (ISS) [121, 122] παρέχει προγνωστικές πληροφορίες αλλά δεν είναι κατάλληλο για τη λήψη των κατάλληλων θεραπευτικών

αποφάσεων. Αντίθετα, πάνω σε αυτό, μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα χρήσιμο ένα μοντέλο κατηγοριοποίησης με βάση την επικινδυνότητα της νόσου που να στηρίζεται στον αριθμό των ανεξάρτητων μοριακών κυτταρογενετικών δεικτών με σκοπό την εκτίμηση της επιθετικότητας της νόσου [123]. Στην Mayo Clinic οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε standard-, intermediate- και high risk-, βάσει των συστημάτων κατάταξης Mayo stratification for myeloma και risk-adapted therapy classification (mSMART) (Πίνακας 1.3) [108, 124]. Οι high-risk ασθενείς με φτωχή πρόγνωση χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός από τα ακόλουθα σε κάθε κατηγορία: υποδιπλοειδία, t(4;14) ή απώλεια 17p13, υψηλά επίπεδα της β2-μικρογλοβουλίνης ή της γαλακτικής αφυδρογονάσης και ISS στάδιο III. Οι standard-risk ασθενείς διακρίνονται από την παρουσία υπερδιπλοειδίας ή t(11;14), φυσιολογικά επίπεδα β2-μικρογλοβουλίνης ή γαλακτικής αφυδρογονάσης και ISS στάδιο I [45, 121, 125]. Οι standard-risk ασθενείς παρουσιάζουν μέση ολική επιβίωση (OS) από 6 έως 7 χρόνια, ενώ οι high risk- <2-3 χρόνια [126].

**Πίνακας 1.3:** Κατηγοριοποίηση με βάση την επικινδυνότητα του ΠΜ [115].

Standard-risk
Trisomies (hyperdiploidy)
t (11;14)
t (6;14)
Intermediate-risk
t (4;14)
High-risk <sup>a</sup>
17p deletion
t (14;16)
t (14;20)
High risk gene expression profiling signature

<sup>a</sup> In the presence of concurrent trisomies, patients with high risk cytogenetics should be considered standard-risk.

### 1.1.5. Θεραπεία του ΠΜ

Η ολική επιβίωση (OS) έχει βελτιωθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία με την εισαγωγή νέων φαρμακευτικών παραγόντων, όπως η θαλιδομίδη [127], το bortezomib [128] και η λεναλιδομίδη [129, 130], ενώ πρόσφατα έλαβαν έγκριση για τη θεραπεία της νόσου το carfilzomib (αναστολέας πρωτεασώματος) και η πομαλιδομίδη

(ανοσοτροποποιητικός παράγοντας) [115]. Βασικά, οι θεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να διακριθούν σε 2 κατηγορίες: α) στους αναστολείς πρωτεασώματος, οι οποίοι δρουν κυρίως μέσω διατάραξης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων και β) στους ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες (iMIDs, immunomodulatory drugs), οι οποίοι επάγουν απόπτωση, ενισχυμένη ανοσιακή απόκριση στα MM κύτταρα από τα T- και τα NK-κύτταρα και αναστολή αγγειογένεσης, προσκόλλησης και έκκρισης κυτοκινών [101].

Γενικότερα, η θεραπευτική αγωγή που θα ακολουθηθεί για τους συμπτωματικούς, νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ εξαρτάται από το εάν ο ασθενής είναι υποψήφιος ή όχι για μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων (ASCT, Autologous Stem Cell transplantation) [101]. Η υψηλή δόση χημειοθεραπείας με αυτόλογη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων θεωρείται το standard of care για τους ασθενείς που πληρούν τα κριτήρια υποψηφιότητας και τα οποία αφορούν βιολογική ηλικία έως 65-70 έτη και απουσία οργανικών δυσλειτουργιών και συνοδών νοσημάτων, όπως ο διαβήτης (**Εικόνα 1.5**) [38].

#### 1.1.5.1. Πρώτης γραμμής θεραπεία (initial, induction therapies) σε ασθενείς υποψήφιους για ASCT

Γενικά ο συνδυασμός νέων φαρμακευτικών παραγόντων, όπως η θαλιδομίδη, το bortezomib ή η λεναλιδομίδη με βασικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του ΠΜ έχουν ως αποτέλεσμα την επίτευξη υψηλότερων ρυθμών απόκρισης από τον παλαιότερα πρότυπο χρησιμοποιούμενο συνδυασμό vincristine+doxorubicin (adriamycin)+dexamethasone [38], ενώ συνήθως απαιτούνται 3 με 6 κύκλοι πρώτης γραμμής θεραπείας [101]. Οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν:

- a) Lenalidomide-low dose dexamethasone (Rd): Αποτελεί μία αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή, καθώς επιτυγχάνεται λιγότερη τοξικότητα και καλύτερη ολική επιβίωση από τον συνδυασμό lenalidomide+high dose dexamethasone [131].
- b) Bortezomib-βασιζόμενες θεραπευτικές αγωγές: Οι τριπλοί συνδυασμοί bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD), bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) και bortezomib-lenalidomide-dexamethasone (VRD) φαίνονται να είναι πιο αποτελεσματικές, ξεπερνώντας την φτωχή πρόγνωση που σχετίζεται με την t(4;14)

μετατόπιση και με άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες [132-135]. Η κυριότερη παρενέργεια των bortezomib-βασιζόμενων θεραπευτικών επιλογών είναι η περιφερική νευροπάθεια που όμως σε πρόσφατες μελέτες έχει δείχτει ότι η υποδόρια χορήγηση του bortezomib μία φορά την εβδομάδα, μπορεί να την περιορίσει σημαντικά, συγκριτικά με την 2 φορές εβδομαδιαίως ενδοφλέβια χορήγησή του [136, 137].

c) Carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone (CRD): Προς το παρόν, 2 κλινικές μελέτες φάσεως II έχουν δώσει πολύ καλά αποτελέσματα για τον πρόσφατα εγκεριμένο αναστολέα πρωτεασώματος carfilzomib, όταν χρησιμοποιείται στον ανωτέρω συνδυασμό [138, 139], ενώ στις ΗΠΑ βρίσκεται εν εξελίξει μία τυχαioποιημένη μελέτη που συγκρίνει το CRD με το VRD [115].

d) Πολλαπλοί φαρμακευτικοί συνδυασμοί: Ο πιο γνωστός είναι ο VDT-PACE (bortezomib, dexamethasone, thalidomide, cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide και etoposide) [133, 134], που έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός στους ασθενείς με επιθετικούς τύπους της ασθένειας, όπως η πλασματοκυτταρική λευχαιμία και τα εξωμυελοειδή πλασματοκυτώματα [115].

### 1.1.5.2. Πρώτης γραμμής θεραπεία (initial, induction therapies) σε ασθενείς μη υποψήφιους για ASCT

Σε αυτή την περίπτωση, οι θεραπευτικές επιλογές είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν ανωτέρω για τους υποψήφιους ασθενείς [126] και περιλαμβάνουν:

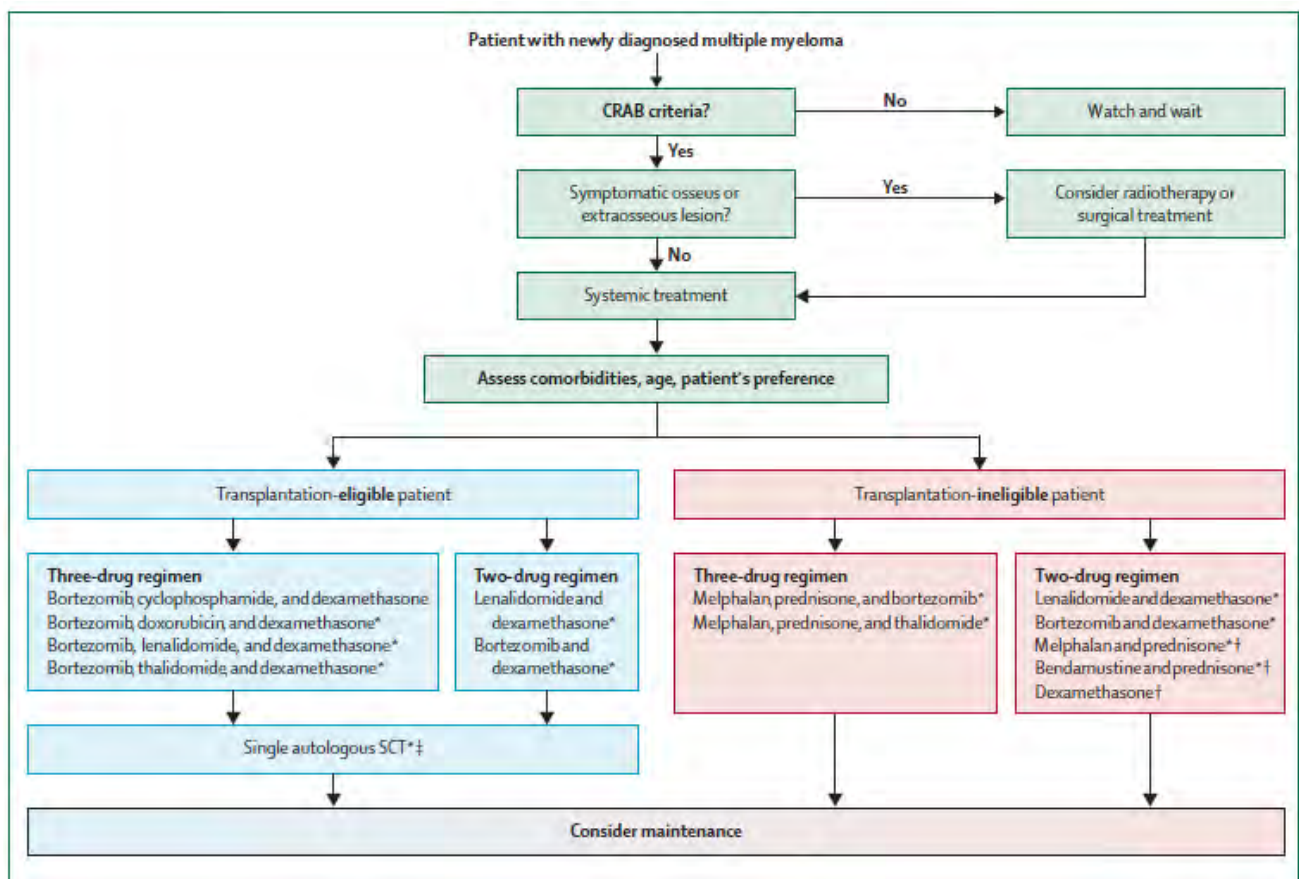
a) Melphalan-Prednisone-Thalidomide (MPT): 5 τυχαioποιημένες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι ο τριπλός συνδυασμός είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερο ORR, vgPR και nCR, συγκριτικά με τον διπλό MP, που θεωρούνταν για αρκετά χρόνια το standard of care των πιο ηλικιωμένων ασθενών [140-145].

b) Bortezomib-βασιζόμενες θεραπευτικές αγωγές: Ο MPV (Melphalan-Prednisone-Velcade) θεωρείται το δεύτερο standard of care μετά τον MPT συνδυασμό για τους πιο ηλικιωμένους ασθενείς. Συγκριτικά με το MP, παρουσίασε σημαντική βελτίωση στο ORR, CR, TTP και OS στα 3 χρόνια [146]. Επίσης, σε μία τυχαioποιημένη μελέτη φάσεως III δείχτηκε ότι ο τετραπλός συνδυασμός VMPT, ακολουθούμενος από θεραπεία συντήρησης

με bortezomib+thalidomide παρουσίασε υψηλότερο PFS και OS, συγκρινόμενος με τον VMP [147].

c) Lenalidomide + dexamethasone (Rd): Αποτελεί μία αποτελεσματική εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση σχετικά ανεκτή από τους μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς. Τα αποτελέσματα από μία διεθνή κλινική μελέτη φάσεως III που διενεργήθηκε σε 1,623 ασθενείς και συνέκρινε το MPT vs Rd για 18 μήνες vs Rd μέχρι την προόδο της νόσου, έδειξαν σημαντική βελτίωση του OS σε μη υποψήφιους ασθενείς, χρησιμοποιώντας για πρώτη φορά μία θεραπευτική αγωγή που δεν περιέχει melphalan [115].

d) Melphalan-Prednisone: Μπορεί ακόμη να εφαρμοστεί σε ηλικιωμένους ασθενείς, που δεν έχουν πρόσβαση στο Rd και στους οποίους η θεραπεία με MPT και MPV δεν θεωρείται ασφαλής και αποτελεσματική [148].



†Melphalan + prednisone, bendamustine + prednisone, or dexamethasone can be used if novel drugs are not available or contraindicated. ‡Consider allogeneic stem-cell transplantation in young patients with deletion 17p and HLA-identical siblings.

**Εικόνα 1.5:** Πρώτης γραμμής θεραπεία για τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ [38].



### 1.1.5.3. Θεραπεία για τους υποτροπιάζοντες ΠΜ ασθενείς

Η θεραπεία των συγκεκριμένων ασθενών στηρίζεται σε νέους παράγοντες, όπως είναι οι bortezomib-βασιζόμενοι συνδυασμοί που έδειξαν ORR 40-50% και TTP 6-9 μήνες, και ο Rd που παρουσίασε ORR 60% και TTP 13.5 μήνες [149-153]. Επίσης, ο συνδυασμός VRd έδειξε σημαντική αποτελεσματικότητα, ενώ σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη φάσεως III αναφέρθηκε υψηλότερο TTP και OS με το bortezomib+ pegylated liposomal doxorubicin, συγκριτικά με το bortezomib μόνο του [150].

Ο νέος κετο-εποξίδη τετραπεπτιδικός αναστολέας πρωτεασώματος, carfilzomib πρόσφατα εγκρίθηκε από τον FDA για την θεραπεία του υποτροπιάζοντος και επιδεινούμενου ΠΜ σε ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει προηγουμένως bortezomib +ανοσοτροποποιητικό παράγοντα [154, 155]. Το carfilzomib έχει δοκιμαστεί σε συνδυασμούς και με άλλους ενεργούς φαρμακευτικούς παράγοντες [156, 157], ενώ αναμένονται και τα αποτελέσματα από μία φάσεως III μελέτη που συγκρίνει το CRd με το Rd μόνο του [115].

Ο νέος ανοσοτροποποιητικός παράγοντας pomalidomide, ένα ανάλογο του thalidomide και lenalidomide εγκρίθηκε πρόσφατα από το FDA και EMA για τη θεραπεία του επιδεινούμενου και υποτροπιάζοντος ΠΜ, σε ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον 2 προηγούμενες θεραπείες με lenalidomide και bortezomib [38]. Σε τυχαιοποιημένες μελέτες, το φάρμακο συγκρινόμενο με υψηλή δόση dexamethasone βρέθηκε αποτελεσματικό ακόμη και σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν σε προηγούμενη θεραπεία με lenalidomide+bortezomib, παρουσιάζοντας στατιστικά υψηλότερους ρυθμούς απόκρισης, PFS και OS [158].

Άλλοι νέοι υποσχόμενοι θεραπευτικοί παράγοντες που η αποτελεσματικότητά τους προς το παρόν εξετάζεται σε κλινικές μελέτες φάσεως II/III περιλαμβάνουν: τον πρώτο από του στόματος χορηγούμενο αναστολέα πρωτεασώματος MLN-9708, αναστολείς απακετυλασών ιστονών (vorinostat, panobinostat), Akt αναστολείς (perifosine, rapamycin), αλκυλιωτικούς παράγοντες (bendamustine), αναστολείς των heat shock πρωτεϊνών (tanespimycin), αντι-CD38 μονοκλωνικά αντισώματα (daratumumab, SAR650984), αντι-CS-1 μονοκλωνικά αντισώματα (elotuzumab), αναστολείς της κινεσίνης της ατράκτου (filanesib/ARRY-520) και αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (dinaciclib) [115, 41].

#### 1.1.5.4. Θεραπεία συντήρησης (consolidation and maintenance therapies)

Η συγκεκριμένη θεραπεία αφορά την εφαρμογή ενός περιορισμένου αριθμού κύκλων αμέσως μετά την ASCT, με σκοπό τη βελτίωση της απόκρισης των ασθενών [159, 160]. Προς το παρόν, η lenalidomide φαίνεται να αποτελεί την πιο κατάλληλη επιλογή [161-163], ενώ και το bortezomib έχει αξιολογηθεί σε τυχαιοποιημένες μελέτες και έχει βρεθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικό, αυξάνοντας το ORR και το PFS [164, 165].

## 1.2. ΟΛΟΣ ΟΥΒΙΚΟΥΪΤΙΝΗΣ-ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

### 1.2.1. Γενική Επισκόπηση

Για την ανακάλυψη της ουβικουΐτινης-μεσολαβούμενης πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, οι Aaron Ciechanover, Avram Hershko και Irwin Rose βραβεύτηκαν το 2004 με το Nobel Χημείας [166].

Το σύστημα ουβικουΐτινης/πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System, UPS) είναι μια απαραίτητη κυτταρική ρυθμιστική μηχανή που παίζει βασικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, τη σύνθεση του γλυκόνου, τον κυτταρικό θάνατο, την απόπτωση, τον ανασχηματισμό της χρωματίνης, τη σηματοδότηση, την γονιδιακή έκφραση, την αντιγραφή/μεταγραφή του DNA, την ανοσιακή απόκριση και την κυτταρική απάντηση στο stress. Ανώμαλη ενεργοποίηση ή καταστολή της δράσης του συστήματος ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος έχει συνδεθεί με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, φλεγμονές, καρδιαγγειακές νόσους καθώς και με τον καρκίνο, αποτελώντας έτσι έναν σημαντικό θεραπευτικό στόχο [166-168].

Το σύστημα UPS περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 παράγοντες στους οποίους ανήκουν: η ουβικουΐτινη, τα ένζυμα που ενεργοποιούν την ουβικουΐτινη (Ubiquitin-Activating Enzymes, UBA, E1), τα ένζυμα που δεσμεύουν την ουβικουΐτινη (Ubiquitin-conjugating enzymes, UBC, E2), οι λιγάσες ουβικουΐτινης (E3), τα πρωτεασώματα και οι

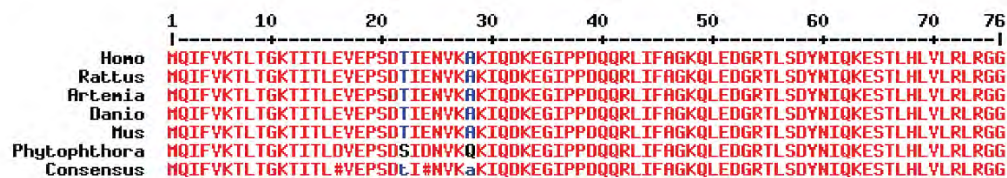
αποουβικουϊτινάσες (Deubiquitinases, Dub). Η ουβικουϊτίνη αποτελεί τον βασικό παράγοντα του UPS και συνδέεται με την πρωτεΐνη-στόχο με τη βοήθεια των ενζύμων E1, E2 και E3 [169], ενώ μπορεί να απομακρυνθεί με τη βοήθεια των Dubs [170]. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα απαντώνται 2 γονίδια που κωδικοποιούν για το E1, 60-100 που κωδικοποιούν για τα E2 και ~1000 για τα E3 [171, 172]. Τα τελευταία ανήκουν σε τρεις οικογένειες: α) αυτά που φέρουν επικράτειες HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus), β) αυτά με επικράτειες RING (Really Interesting New Gene) και γ) αυτά που περιέχουν επικράτειες τύπου U-box ή F-box [173].

Το μόριο της ουβικουϊτίνης εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και η αλληλουχία του είναι συντηρημένη στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οποιοδήποτε κατάλοιπο λυσίνης στις πρωτεΐνες-στόχους μπορεί να δεσμευτεί με το μόριο της ουβικουϊτίνης, ενώ και η ίδια διαθέτει ανάμεσα στα 76αα της 7 κατάλοιπα λυσίνης (K), συμπεριλαμβανομένων των K6, K11, K27, K29, K33, K48 και K63, τα οποία αποτελούν τη γέφυρα που οδηγεί στην ουβικουϊτινίωση των πρωτεϊνών-στόχων (**Εικόνα 1.6**). Η διαδικασία της ουβικουϊτινίωσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 3 ομάδες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση διαφορετικών κυτταρικών διαδικασιών [174]: i) την μονο-ουβικουϊτινίωση όπου οι πρωτεΐνες τροποποιούνται με ένα μόριο ουβικουϊτίνης, ii) την πολύ-μονο-ουβικουϊτινίωση, όπου οι πρωτεΐνες συνδέονται με πολλά μονά μόρια ουβικουϊτίνης και iii) την πολυ-ουβικουϊτινίωση, όπου οι πρωτεΐνες σηματοδοτούνται με αλυσίδες πολυουβικουϊτίνης. Η σύνδεση της ουβικουϊτίνης με τις πρωτεΐνες-στόχους μέσω των λυσινών K11 και K48 εμπλέκεται κυρίως στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση με τη συμμετοχή του πρωτεασώματος, ενώ μέσω άλλων λυσινών του μορίου της όπως η K29 και η K63 δεν αποτελεί μήνυμα αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα για αποδόμηση αλλά σχετίζεται με άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA, η ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών, η μεταγραφή, η ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, όπως είναι το μονοπάτι του NF-κB και η στόχευση στο λυσόσωμα [174-180].

Αναλυτικά, η διαδικασία ουβικουϊτινίωσης, η οποία αποτελεί μία ATP-εξαρτώμενη ενζυμική αντίδραση επιτελείται σε 3 στάδια: i) αρχικά το μόριο ουβικουϊτίνης ενεργοποιείται από το E1, χρησιμοποιώντας για το σχηματισμό του ενδιάμεσου ουβικουϊτίνη-αδενυλομορίου, ATP ως πηγή ενέργειας. Το μόριο ουβικουϊτίνης μεταφέρεται στο κατάλοιπο κυστεΐνης της ενεργής περιοχής του E1, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός θειοεστερικού δεσμού μεταξύ της C-τελικής ομάδας ουβικουϊτίνης και της E1 σουλφιδρυλικής ομάδας στην κυστεΐνη. ii)

κατόπιν, η ενεργοποιημένη ουβικουΐτινη μεταφέρεται από το E1 στην κυστεΐνη της ενεργής περιοχής του E2, μέσω μίας διαδικασίας trans-θειο-εστεροποίησης. iii) στο τελικό στάδιο δημιουργείται ένας ισοπεπτιδικός δεσμός μεταξύ της λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου και της C-τελικής γλυκίνης της ουβικουΐτινης με τη συμμετοχή του E3, το οποίο αναγνωρίζει ειδικές περιοχές στις αλληλουχίες των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (**Εικόνα 1.7 A**) [169, 172]. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από το πρωτεάσωμα και οδηγούνται προς αποικοδόμηση.

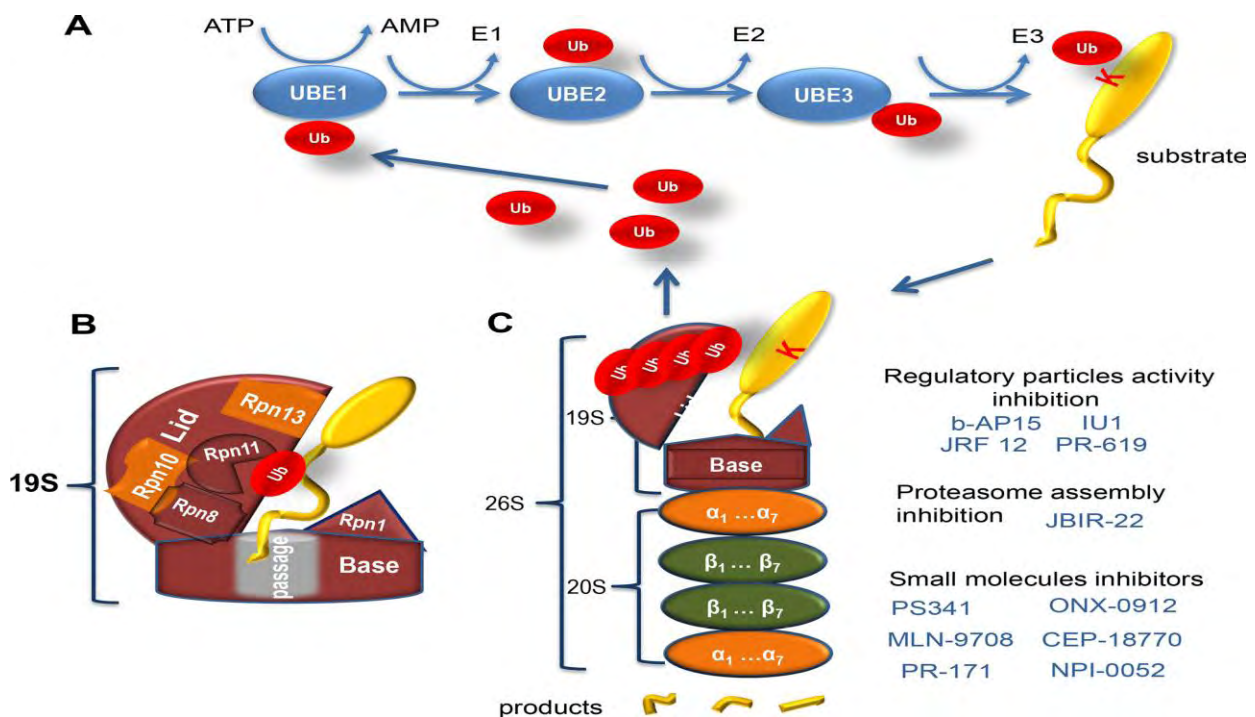
a



b



**Εικόνα 1.6:** Η αμινοξική αλληλουχία του μορίου της ουβικουΐτινης. **a)** Το μόριο της ουβικουΐτινης είναι συντηρημένο μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών, **b)** σημειώνονται τα 7 κατάλοιπα λυσίνης οποία αποτελούν τη γέφυρα που οδηγεί στην ουβικουΐτινίωση των πρωτεϊνών-στόχων [167].



**Εικόνα 1.7:** Η μεσολαβούμενη από την οδό ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος πρωτεϊνική αποικοδόμηση. **A.** Αρχικά το μόριο ουβικουϊτίνης (Ub) ενεργοποιείται από το E1 με κατανάλωση ATP και ακολουθεί η μεταφορά του στο E2 και η σύνδεσή του με την πρωτεΐνη-στόχο με τη βοήθεια του E3. Η πρωτεΐνη-στόχος σημαδεύεται τουλάχιστον με 4 μόρια Ub και ακολουθεί η αναγνώρισή του από το πρωτεάσωμα και η αποικοδόμησή της. **B.** Σχηματική αποίκνιση της 19S ρυθμιστικής υπομονάδας (19S RP) του πρωτεασώματος. **C.** Σχηματική αποίκνιση του πρωτεασώματος και των μικρών μορίων (μπλε) που επηρεάζουν διαφορετικές λειτουργίες και τη “συναρμολόγηση” του. Η 19S RP σημειώνεται με καφέ, ενώ οι α- και β- υπομονάδες του καταλυτικού κέντρου (20S CP) με πορτοκαλί και πράσινο αντίστοιχα [181].

## 1.2.2. 26S Πρωτεάσωμα

### 1.2.2.1. Δομή του πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα, γνωστό ως 26S πρωτεάσωμα, με βάση τον συντελεστή ιζηματογένεσης Svedberg, αποτελεί έναν ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό μηχανισμό με μοριακό βάρος ~2.4 MDa, το οποίο συνίσταται από ένα 20S σύμπλεγμα κυλινδρικού σχήματος (Core Particle, CP) και από ένα ή δύο ρυθμιστικά 19S συμπλέγματα (Regulatory Particle, RP) [182, 183].

Το 20S CP έχει μοριακό βάρος 700kDa και ρόλος του είναι η αποικοδόμηση μικρών πεπτιδίων και μερικών μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [183]. Σχηματίζει μία κυλινδρικού σχήματος κοιλότητα, η οποία αποτελείται από 4 δαχτυλίους, καθένας από

τους οποίους συνίσταται από 7 διαφορετικές υπομονάδες. Οι 2 εξωτερικοί δαχτύλιοι αποτελούνται από τις α-τύπου υπομονάδες ( $\alpha 1-\alpha 7$ ), οι οποίες συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το 19S ρυθμιστικό σύμπλεγμα και επίσης παρουσιάζουν και δραστηριότητα ενδοριβονουκλεάσης, αλληλεπιδρώντας με διάφορες λιγάσες ουβικουΐτινης και υδρολάσες (**Εικόνα 1.7 B**) [184]. Οι 2 εσωτερικοί δαχτύλιοι συνιστώνται από τις β-τύπου υπομονάδες [185], από τις οποίες 3 διαθέτουν την καταλυτική ενεργότητα: α) οι *PSMB6* κωδικοποιούμενες  $\beta 1$ -υπομονάδες που διαθέτουν πρωτεολυτική δράση κασπάσης ή πεπτιδυλ-γλουταμυλ-πεπτιδάσης (caspase-like activity, C-L), β) οι *PSMB7* κωδικοποιούμενες  $\beta 2$ -υπομονάδες που διαθέτουν ενεργότητα τρυψίνης (trypsin-like activity, T-L) και γ) οι *PSMB5* κωδικοποιούμενες  $\beta 5$  υπομονάδες, οι οποίες κατέχουν δράση χυμοτρυψίνης (chymotrypsin-like activity, CT-L). Η CT-L δράση αποτελεί την πιο σημαντική στα πρωτεασώματα και είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών μετά από υδροφόβα κατάλοιπα αμινοξέων μεγάλου μήκους, η T-L δράση συμμετέχει στην υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών μετά από βασικά αα και η C-L μετά από όξινα αα [186-188]. Παρόλο που οι β-υπομονάδες είναι εξελικτικά συντηρημένες, η εξειδίκευση για το υπόστρωμα μπορεί να ποικίλλει [181].

Το 19S RP εμπλέκεται στην δέσμευση των ουβικουΐτινωμένων πρωτεϊνών, στην απομάκρυνση των μορίων ουβικουΐτινης από την πρωτεΐνη, στο ξεδίπλωμά των πρωτεϊνών και στην κατευθύνση τους στο CP για την πρωτεολυτική αποικοδόμησή τους [182, 183]. Βιοχημικές μελέτες διακρίνουν το 19S RP σε 2 επιμέρους συμπλέγματα: τη βάση και το κάλυμμα [185]. Το κέντρο της βάσης που απευθείας έρχεται σε επαφή με το CP, συνίσταται από 6 υπομονάδες Rpt1-6 (Regulatory Particle Triple A 1-6) με ενεργότητα ATP-ase, τα οποία οργανώνονται σε έναν ετεροεξαμερή δακτύλιο αποτελούμενο από 3 ζεύγη διμερών Rpt1/Rpt2, Rpt6/Rpt3 και Rpt4/Rpt5. Τα πρώτα 2 ετεροδιμερή ενώνονται στην απόληξή τους από 2 μεγαλύτερες υπομονάδες του RP, Rpn1 και Rpn2 (regulatory particle non-ATPase 1 and 2) αντίστοιχα. Το Rpn1 διαθέτει μία περιοχή προσκόλλησης για τις πρωτεΐνες που φέρουν επικράτειες UBL (Ubiquitin-like) και UBA (Ubiquitin-associated), όπως είναι το Rad23 (Radiation sensitive 23) που αλληλεπιδρά με διάφορες ουβικουΐτινωμένες πρωτεΐνες, ενώ το Rpn2 δεσμεύεται από έναν άλλο υποδοχέα ουβικουΐτινης, το Rpn13 [189]. Ο λειτουργικός ρόλος της βάσης είναι η στρατολόγηση των ουβικουΐτινωμένων υποστρωμάτων στο πρωτεασώμα και η τοπική μετουσίωσή τους, ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά τους στο CP [181].

Το κάλυμμα που αποτελείται από 9 υπομονάδες, Rpn3 και Rpn5-12 έχει ως ρόλο την απο-ουβικουϊτινώση των πρωτεϊνών-στόχων, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η μεταφορά τους στο 20S σύμπλεγμα [190]. Τα Rpn9, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn3 και Rpn12 σχηματίζουν μία δομή με το ετεροδιμερές αποουβικουϊτινάσης Rpn8 και Rpn11 σε κοντινή απόσταση από το AAA- εξαμερές της ΑΤΡάσης, που επιτρέπει την απομάκρυνση των μορίων ουβικουϊτίνης από το υπόστρωμα αμέσως πριν την είσοδό του στο 20S σύμπλεγμα. Ο δεύτερος υποδοχέας ουβικουϊτίνης, Rpn10 εντοπίζεται στην περιφέρεια του καλύμματος κοντά στις υπομονάδες Rpn8 και Rpn9 [189], ενώ συμπληρωματικά με την Rpn11 υδρολάση ουβικουϊτίνης, έχουν αναφερθεί και άλλες αποουβικουϊτινάσες, όπως είναι οι USP14 (Ubiquitin-specific protease 14) και UCH37 (Ubiquitin C-terminal hydrolase 37), οι οποίες σχετίζονται ελαφρώς με το 19S RP [191].

Στα κύτταρα του αιμοποιητικού, η έκφραση των παραγόντων του 20S CP μπορεί να επηρεαστεί από βιολογικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, η διέγερση των κυττάρων με INF- $\gamma$ , κυτοκίνες και άλλους παράγοντες μπορεί να επάγει την έκφραση 3 καταλυτικά ενεργών  $\beta$  υπομονάδων,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ , και  $\beta 5i$ , τα οποία μαζί με το 11S ρυθμιστικό σύμπλεγμα οδηγούν στον σχηματισμό του ανοσοπρωτεασώματος. Το τελευταίο εμπλέκεται στην παραγωγή πεπτιδίων για παρουσίαση στο μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξεως I, ενώ παρουσιάζει και πρωτεολυτική δράση [195-197]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το υποτροπιάζον πολλαπλό μυέλωμα σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα ανοσοπρωτεασώματος και με αυξημένα επίπεδα ιδιοσυστάτου πρωτεασώματος [198].

### 1.2.2.2. Λειτουργία του πρωτεασώματος

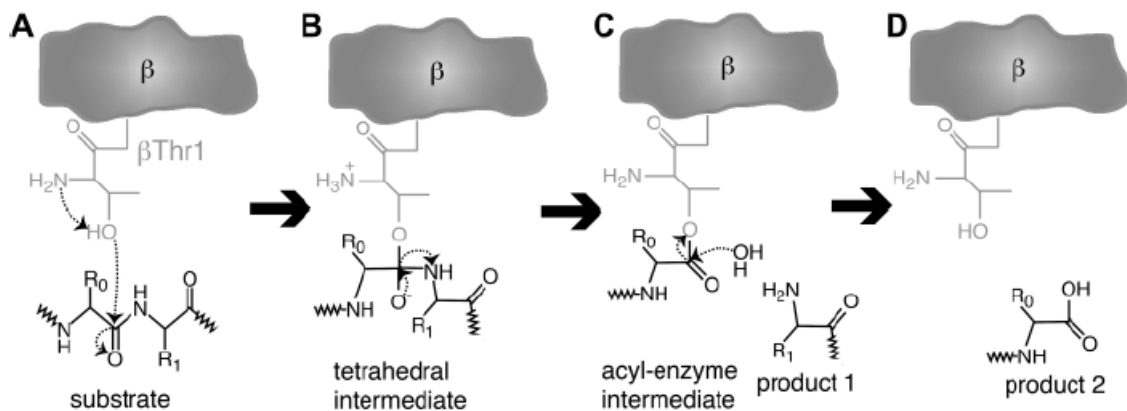
Ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την συνεχή αντιγραφή του DNA και τον αυξημένο ρυθμό γενωμικών μεταλλάξεων. Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση αυξημένης ποσότητας μη σωστά αναδιπλωμένων ή ανώμαλα υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορεί να είναι τοξικές για τα κύτταρα. Για τον περιορισμό των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, τα καρκινικά κύτταρα ενισχύουν την έκφραση των πρωτεασωμάτων τους, όπως επιβεβαιώνεται και από πρόσφατες μελέτες που έχουν δείξει τη συσχέτιση των

παραγόντων του πρωτεασώματος με πολύ-ριβωσώματα για τον άμεσο ποιοτικό έλεγχο των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών [199, 200].

Οι πρωτεΐνες-υποστρώματα μεταφέρονται στον καταλυτικό πυρήνα του 20S CP, όπου αποικοδομούνται σε πεπτίδια με μήκος που ποικίλει από 3 έως 25αα. Ο μηχανισμός της αποικοδόμησης είναι συντηρημένος για όλους τους τύπους των καταλυτικά ενεργών β υπομονάδων (**Εικόνα 1.8**). Οι β υπομονάδες ανήκουν στην οικογένεια των N-τελικών νουκλεόφιλων υδρολασών, όπου το N-τελικό αα β θρεονίνη 1 (βThr1) δρα ως καταλυτικό νουκλεόφιλο στην αντίδραση υδρόλυσης. Συγκεκριμένα, το άτομο άνθρακα του αμιδικού δεσμού του υποστρώματος δέχεται νουκλεοφιλική επίθεση από την υδροξυλική ομάδα του βThr1, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός τετραεδρο-ενδιάμεσου. Ακολούθως, το ενδιάμεσο αποσυντίθεται με έναν τρόπο που έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος και την απελευθέρωση ενός προϊόντος αποικοδόμησης, ενώ το άλλο παραμένει δεσμευμένο με την ενεργή θέση μέσω ενός εστερικού δεσμού, σχηματίζοντας ένα ακυλ-ενζυμο-ενδιάμεσο. Στο τελικό στάδιο, το νερό επιτίθεται στο ακυλ-ενζυμο-ενδιάμεσο, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός τετραεδρο-ενδιάμεσου που παράγει ένα δεύτερο προϊόν αποικοδόμησης, ενώ η ενεργή θέση του πρωτεασώματος αναγεννάται για περαιτέρω καταλυτικούς κύκλους [201].

Εκτός από την πρωτεολυτική δράση, η οποία είναι και η πιο καλά μελετημένη, τα πρωτεασώματα διαθέτουν επίσης δράση ATPase υπεύθυνη για για το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών και τον ανασχηματισμό της χρωματίνης, δράση RNase που εμπλέκεται στον έλεγχο του ματίσματος και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και ενεργότητα αποουβικουϊτίνης, η οποία είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση των μορίων ουβικουϊτίνης από την πρωτεΐνη-στόχο, ώστε να ακολουθήσει η αποικοδόμησή τους [202-205].





**Εικόνα 1.8:** Μηχανισμός αποικοδόμησης των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα [201].

### 1.2.2.3. Ρύθμιση του 20S CP

#### 1.2.2.3.1. Πρωτεϊνικά Σύμπλοκα

Εκτός από το 19S RP, έχουν αναφερθεί και άλλες πρωτεϊνικά συμπλέγματα που ενεργοποιούν το 20S CP, μέσω διάνοιξης της διόδου προς το καταλυτικό διαμέρισμα, στα οποία περιλαμβάνονται: το PA28/11S, το COP9 και άλλα [206-208]. Το 11S RP αποτελεί ένα ομο- ή ετερο-επταμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο που συνίσταται από 28kDa  $\alpha$ ,  $\beta$  και/ή  $\gamma$ -τύπου PA28 υπομονάδες. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η έκφρασή του επάγεται από την  $\gamma$ -IFN και μαζί με τις  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ , και  $\beta 5i$  εμπλέκεται στον σχηματισμό του ανοσοπρωτεασώματος [195-197].

Το σιγκαλόσωμα CPP9/CSN (constitutive photomorphogenesis 9 singalosome) είναι ένα 430 kDa σύμπλεγμα αποτελούμενο από 8 υπομονάδες (CSN1-8), που παρουσιάζουν ομολογία με τα Rpn9, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn3 και Rpn12 πολυπεπτίδια του 26S καλύμματος του πρωτεασώματος. Το COP9 αλληλεπιδρά με τις κουλίνη-E3 λιγάσες ουβικουΐτινης και συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργικότητάς τους, ενώ έχει βρεθεί να δεσμεύεται με πρωτεϊνικές κινάσες και ένζυμα απο-ουβικουΐτινίωσης για την ρύθμιση της αποικοδόμησής τους [209, 210].

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί στα θηλαστικά ένα υβριδικό ρυθμιστικό σύμπλοκο, αποτελούμενο από έναν διπλό-δαχτύλιο- AAA+ ATPase Cdc48/p97/VAT και COP9-που εμπλέκεται στη ρύθμιση των E3 λιγασών ουβικουΐτινης RNF8 και RNF168 καθώς και σε πλήθος άλλων βιολογικών λειτουργιών [211, 212].

Εκτός από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, μία πρωτεΐνη 200kDa, η PA200 έχει βρεθεί να δεσμεύεται στο ένα ή και στα 2 άκρα του 20S CP, ενεργοποιώντας την υδρόλυση μικρών πεπτιδίων, αλλά όχι των σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μεγάλου μήκους. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχει στην απάντηση στην καταστροφή του DNA (DNA Damage Response, DDR), πιθανώς διεγείροντας το 20S σύμπλοκο να απομακρύνει τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες, ενώ εμπλέκεται και στην ωρίμανση των πυρηνικών πρωτεασωμάτων [213].

### 1.2.2.3.2. Συναρμολόγηση του πρωτεασώματος (Proteasome assembly)

Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης της πρωτεασωμικής δραστηριότητας βασίζεται στους μηχανισμούς συναρμολόγησής του, που συνιστούν μία προσεκτικά ρυθμισμένη πολύπλοκη διαδικασία. Αρχικά, σχηματίζεται ο  $\alpha$ -δακτύλιος των 7 υπομονάδων που αποτελεί το υπόστρωμα για την επακόλουθη προσθήκη των ανώριμων  $\beta$ -υπομονάδων, σχηματίζοντας έτσι το “ $\eta$ μι-πρωτεάσωμα”. Η ωρίμανση των  $\beta$ -υπομονάδων σε συνδυασμό με τον διμερισμό των 2  $\eta$ μι-πρωτεασωμάτων οδηγούν στον σχηματισμό του 20S CP, το οποίο με τη σειρά του αποτελεί το υπόστρωμα για την δέσμευση των ρυθμιστικών συμπλεγμάτων και τον σχηματισμό του βιολογικά ενεργού 26S πρωτεασώματος [181].

Η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια του κάθε βήματος της συναρμολόγησης του πρωτεασώματος ρυθμίζεται από ειδικές σαπερονίνες. Συγκεκριμένα, το PAC3 ομοδιμερές (proteasome assembly chaperone) δεσμευόμενο στο εσωτερικό τμήμα του  $\alpha$ -δακτυλίου, παρεμποδίζει στερεοδιατακτικά την προσθήκη των προ- $\beta$ -υπομονάδων, ενώ το ζεύγος σαπερονινών PAC1/2 δεσμεύεται με τις  $\alpha$ -τύπου υπομονάδες, παρεμποδίζοντας τον πρόωρο διμερισμό των  $\alpha$ -δακτυλίων, που ίσως παρεμβαίνει στην βιογένεση του πρωτεασώματος [214]. Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του  $\alpha$ -δακτυλίου, οι PAC3 και PAC4 αποδεσμεύονται από το προ-πρωτεάσωμα [215].

Η POMP (Proteasome Maturation Protein) εμπλέκεται στην συναρμολόγηση του  $\beta$ -δακτυλίου, παρεμποδίζοντας τον πρόωρο διμερισμό των πρόδρομων που περιέχουν ελλειπή σετ των  $\beta$ -υπομονάδων [216]. Μία άλλη σαπερονίνη, η Ecm29, μία heat-like repeat πρωτεΐνη ρυθμίζει την ακεραιότητα της συναρμολόγησης των RP-CP συμπλεγμάτων [218], ενώ δρα και ως πρωτεΐνη-ικρίωμα που συμμετέχει στην

αναδιάρθρωση των RP-CP σε συγκεκριμένα ένζυμα. Μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης του CP, η Ecm29 αποικοδομείται [217].

### 1.2.3. Η οδός ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος στο ΠΜ

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μυελωματικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στους αναστολείς πρωτεασώματος, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι το UPS μονοπάτι παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΠΜ. Αυξημένα επίπεδα ουβικουΐτινωμένων πρωτεϊνών, κυρίως αυτών που σχετίζονται με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, όπως είναι οι c-maf και οι D-κυκλίνες έχουν βρεθεί στα μυελωματικά και λευχαιμικά κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, η δεξαμεθαζόνη μπορεί να επάγει την ουβικουΐτινώση των c-maf που εκφράζονται στο 50% των MM κυτταρικών σειρών [219], μειορρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους και οδηγώντας κατ'επέκταση στη σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση [220]. Επίσης, οι D-τύπου κυκλίνες που υπερεκφράζονται στα MM κύτταρα και αποτελούν δείκτες πρόγνωσης μπορούν να ουβικουΐτινωθούν με τη βοήθεια του SCF E3 συμπλέγματος λιγάσης [221], ενώ και ο FGFR3 υπόκειται σε αυτοφωσφορύλιωση και επακόλουθη c-CbI-εξαρτώμενη ουβικουΐτινώση [222].

Άλλες πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να ρυθμίζονται μέσω του UPS μονοπατιού στο ΠΜ, περιλαμβάνουν αυτές που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, όπως είναι οι p27, p53, PTEN και IκBβ, που εμπλέκεται στο μονοπάτι του NF-κB, ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών παραγόντων, όπως οι IL-6, BAFF, APRIL, και γνωστοί αυξητικοί παράγοντες [167].

Οι παράγοντες του UPS μονοπατιού, όπως η ουβικουΐτινη και το ένζυμο E1 έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται στις MM και λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και σε πρωτογενή δείγματα [223]. Επίσης, αρκετά E2 ένζυμα έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στην εξέλιξη του ΠΜ, μεταξύ των οποίων το CDC34 που υπερεκφράζεται στα MM δείγματα ασθενών και στις κυτταρικές σειρές συγκριτικά με τα φυσιολογικά controls [224]. Αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας του CDC34 καταργεί την IL-6-επαγόμενη προστασία ενάντια στην δεξαμεθαζόνη-επαγόμενη MM κυτταρική απόπτωση [225]. Το CDC34 συμμετέχει στην ουβικουΐτινώση των p27, (Kip1), IκBa, Wee1 και MyoD [224], διευκολύνοντας έτσι

την αποικοδόμησή τους μέσω του 26S πρωτεασώματος και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Ακόμη, οι λιγάσες ουβικουϊτίνης E3, οι οποίες συνιστούν την μεγαλύτερη οικογένεια του UPS συστήματος έχει βρεθεί να σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του ΠΜ. Συγκεκριμένα, το XIAP, ο αντιπρόσωπος της RING finger οικογένειας των E3 και το Mdm2, η κυρίαρχη E3 λιγάση για την ουβικουϊτινίωση του p53 έχει βρεθεί να υπερεκφράζονται στα MM κύτταρα, συμβάλλοντας στον MM κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αντι-αποπτωτική δράση [226]. Επίσης, το XIAP συμμετέχει στην αναστολή της δράσης των κασπασών-3, -6 και -7, επάγοντας ανθεκτικότητα στα MM κύτταρα, ενώ knockdown του XIAP με RNA interference έχει βρεθεί να ενισχύει την ευαισθησία στο bortezomib και να μειώνει τον σχηματισμό του όγκου στα NOD/SCID ποντίκια [227]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η E3 λιγάση SCF(Skp2), σχετίζεται με την παθολογία και την θεραπεία του ΠΜ [228] ρυθμίζοντας πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όπως το p27, ενώ αναστολή της επανευαισθητοποίησε τα MM κύτταρα στον bortezomib-επαγόμενο κυτταρικό θάνατο [228].

Περίπου 60 απο-ουβικουϊτινάσες έχουν αναφερθεί στα MM κύτταρα, από τις οποίες η USP9X σχετίζεται με αυξημένη MCL1 πρωτεΐνη στα θυλακοειδή λεμφώματα και στα διάχυτα B-λεμφοκυτταρικά λεμφώματα, ενώ έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στο ΠΜ και να σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση [229]. Το CYLD, ένας αρνητικός ρυθμιστής του NF-κB μονοπατιού [230], εντοπίζεται στο 16q12 και η μειωμένη έκφρασή του στο ΠΜ σχετίζεται με απώλεια του 16q [231]. Επώση με αναστολείς πρωτεασώματος, όπως το MG132, έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του CYLD στα MM κύτταρα, ενώ έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεοκλαστογένεση, ρυθμίζοντας αρνητικά τα RANK σήματα [232].

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πρωτεασώματα εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΠΜ συνιστώντας καλούς βιοδείκτες για την θεραπεία και την πρόγνωση του. Συγκεκριμένα, οι υπομονάδες του πρωτεασώματος στα MM κύτταρα έχουν βρεθεί αυξημένες συγκριτικά με τα φυσιολογικά, ενώ ανοσοενζυμικές και Northern blot αναλύσεις έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις και τα επίπεδα mRNA των πρωτεασωμάτων είναι αυξημένα σε διάφορες κυτταρικές σειρές του αιμοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των MM κυττάρων συγκριτικά με τα περιφερικά λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα από υγιή άτομα [233].

#### 1.1.4. Τροποποιητικά μόρια της δράσης του UPS μονοπατιού

Εκτός από την τροποποίηση της δράσης των πεπτιδασών των β-υπομονάδων του 20S CP με την χορήγηση ειδικών ανασταλτικών μορίων, μία εναλλακτική πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η εξασθένηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας, παρεμβαίνοντας στην συναρμολόγηση των 20S και/ή 26S συμπλεγμάτων. Σε μία προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι αναστολή του ομοδιμερισμού της σαπερωνίνης PAC3 έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της συναρμολόγησης του CP. *In vitro* ο αναστολέας βρέθηκε να παρουσιάζει σημαντική κυτταροτοξική δράση στην HeLa κυτταρική σειρά με IC50 ίσο με 68μM, όταν χρησιμοποιήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα (120hrs), αλλά δεν είχε κανένα αποτέλεσμα για μικρότερους χρόνους (48hrs), προτείνοντας ότι η συναρμολόγηση του 20S CP συνιστά μία αργή διαδικασία [234].

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, μία από τις δράσεις του 19S ρυθμιστικού συμπλέγματος (κυρίως μέσω της δράσης POH/Rpn11) είναι η απομάκρυνση των μορίων ουβικουΐνης από την πρωτεΐνη-στόχο πριν την είσοδό της στο 20S CP. Οι απο-ουβικουΐτινάσες (DUBs) εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες, όπως η απάντηση στην καταστροφή του DNA, η επιδιόρθωση του DNA και η μεταγραφή [235], ενώ έχουν συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες, όπως ο κληρονομικός καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι [236]. Η αναστολή της δράσης των απο-ουβικουΐτινών έχει βρεθεί να παρεμποδίζει την πρωτεϊνική αποικοδόμηση, καθώς η στενή πύλη προς το καταλυτικό διαμέρισμα δεν επιτρέπει την διόδο των ουβικουΐτινωμένων πεπτιδίων [237].

Γενικά, οι DUBs διακρίνονται με βάση τη δομή τους στις μεταλλοπρωτεάσες, στις οποίες ανήκει η POH1, που περιέχουν την επικράτεια Ub-πρωτεάση, που καλείται JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) και στις πρωτεάσες κυστεΐνης. Οι τελευταίες διακρίνονται σε 4 ομάδες: στις ουβικουΐνη-εξειδικευμένες πρωτεάσες (USP, Ubiquitin-specific protease), στις ουβικουΐνη C-τελικές υδρολάσες (UCH, Ubiquitin C-terminal hydrolase), στις Otubain protease (OUT) και στις Machado-Joseph disease protease (MJD). Από αυτές, τα μέλη της USP οικογένειας αναγνωρίζουν τα τα ελεύθερα καρβοξυ-τελικά διπλά μοτίβα γλυκίνης της ουβικουΐνης, η UCH37, μέλος της UCH οικογένειας παρουσιάζει εξιδίκευση για τις δι-ουβικουΐτινες και η POH1 διασπά τις αλυσίδες πολυ-ουβικουΐτινης στα μη σωστά αναδιπλωμένα πεπτίδια [181].

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένας νέος εξειδικευμένος αναστολέας των ουβικουΐτινινασών, UCHL5 και USP14, ο b-AP15, ο οποίος βρέθηκε να προκαλεί ισχυρή αναστολή της DUB δράσης ( $IC_{50}=2.1 \mu M$ ), χωρίς όμως να επηρεάζει τις πρωτεολυτικές δράσεις του 20S CP [238]. Ο b-AP14 σε 4 διαφορετικά *in vivo* μοντέλα συμπαγών όγκων βρέθηκε να μειώνει την πρόοδο του όγκου [238], ενώ ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στο bortezomib μυελωματικών κυττάρων, παρουσιάζοντας συνεργική δράση με τους suberoylanilide hydroxamic acid, lenalidomide ή dexamethasone [239]. Ένας άλλος παράγοντας, ο πυρίτης χαλκού (copper pyrithione, CuPT) βρέθηκε να στοχεύει και τις 19S πρωτεάσωμα-εξειδικευμένες DUBs, UCH37 και USP14, όπως και τις 20S πρωτεολυτικές πεπιδάσες. Το CuPT ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου *in vivo* και επήγαγε την κυτταροτοξικότητα *in vitro* και *ex vivo* [240].

Επίσης, παρεμπόδιση των υπομονάδων που δεσμεύουν την ουβικουΐτινη μέσα στο 19S RP βρέθηκε να προκαλεί σημαντική δυσλειτουργία στο πρωτεάσωμα. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το bis-benzylidene piperidone RA190 δεσμεύει τον υποδοχέα ουβικουΐτινης RPN13 στο 19S RP, αναστέλλοντας την δράση του πρωτεασώματος. Επώαση των bortezomib-ανθεκτικών MM κυττάρων με RA190 επήγαγε συσσώρευση των πολυουβικουΐτινωμένων πρωτεϊνών και κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης-σχετιζόμενης με το stress του ενδοπλασματικού δικτύου [241].

Τέλος, οι Rpt/ATPase της βάσης του 19S RP πιθανόν να αποτελούν μία εναλλακτική φαρμακευτική προσέγγιση, καθώς πολλοί μικρού μοριακού βάρους αναστολείς της p97/VCP/Cdc48 υπομονάδας του Cdc48/COP9 RP έχουν έως τώρα ταυτοποιηθεί [242, 243]. Συγκεκριμένα, οι *Chou et al.* [242, 243] αποκάλυψαν έναν επιλεκτικό αναστρέψιμο ATP-ανταγωνιστικό p97 αναστολέα με  $IC_{50}$  που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και κυμαίνεται από 1 έως 7  $\mu M$ , ο οποίος βρέθηκε να επάγει απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα πιο γρήγορα από τους αναστολείς των 20S CP πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων (π.χ. MG132).

### 1.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ 26S ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

#### 1.3.1. Γενική επισκόπηση

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πολλαπλές γενετικές ατέλειες, συμπεριλαμβανομένων ελαττωματικών μηχανισμών αποκατάστασης και σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και παρουσιάζουν γενικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας συγκριτικά με τα φυσιολογικά, καθιστώντας τα έτσι πιο ευαίσθητα στις προαποπτωτικές δράσεις της πρωτεασωμικής αναστολής [244]. Με βάση τα υποσχόμενα αποτελέσματα πολλών προκλινικών και κλινικών μελετών, η αναστολή του πρωτεασώματος έχει αποτελέσει βασική θεραπευτική στρατηγική στον κλάδο της ογκολογίας, συνιστώντας πλέον τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιμυελωματικής θεραπείας [245].

Δομικά, οι αναστολείς του πρωτεασώματος (Proteasome Inhibitors, PI's) είναι μικρά πεπτίδια με μία ηλεκτροφιλική τροποποίηση που επιτρέπει την ισοσθενή δέσμευση στο N-τελικό κατάλοιπο Thr1O<sup>γ</sup> ενός ή περισσοτέρων καταλυτικών β-υπομονάδων. Οι διάφοροι πρωτεασωμικοί αναστολείς παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση και συγγένεια για τις διάφορες καταλυτικές θέσεις μέσα στον πυρήνα του πρωτεασώματος και ανάλογα με τη δομή τους και την χημική ενεργή ηλεκτρόφιλη ομάδα μπορούν να διακριθούν στις εξής ομάδες: α) στα φυσικά παράγωγα, όπως η λακτακυστίνη, ένας μεταβολίτης του στρεπτομύκητα, η οποία μεταβολίζεται στον ενεργό αναστολέα του πρωτεασώματος, λακτακυστίνη β-λακτόνη, β) στις πεπτιδικές αλδεϋδες, όπως είναι το καρβοβενζοξυλλευκινυλ-λευκινυλ-λευκ-ινυλ-H (MG-132), γ) στα παράγωγα του βορονικού οξέος, όπου ανήκει το bortezomib και το MLN9708 δ) στις εποξυκετόνες, που περιλαμβάνουν το carfilzomib και το ONX0912 και ε) στις σαλινοσποραμίδες, όπου ανήκει το marizomib [246, 247].

Ο μηχανισμός της δράσης αυτών των παραγόντων φαίνεται να περιλαμβάνει: α) συσσώρευση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress), η οποία με τη σειρά της επάγει την απόκριση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οδηγώντας σε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης [248-250], β) αναστολή του NF-κΒ μονοπατιού, παρεμβαίνοντας στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών που

καταστέλλουν τον NF-κB (IκB) [251], γ) απορρύθμιση των κυκλινών, των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, διαταράσσοντας την κυτταρική διαίρεση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση μέσω σταθεροποίησης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως τα Bax και p53, και μείωσης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας, δ) σχηματισμό των ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και του συσσωμάτωματος (aggresome) και ε) ενεργοποίηση του εσωκυττάριου μιτοχονδριακού μονοπατιού και του μεσολαβούμενου-από τους υποδοχείς θανάτου εξωκυττάριου μονοπατιού απόπτωσης [252, 253]. Στον **πίνακα 1.4** φαίνονται οι πιο βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, ογκογονίδια και μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζονται από την αναστολή του πρωτεασώματος [254].

**Πίνακας 1.4:** Πρωτεΐνες που επηρεάζονται από την αναστολή της οδού ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος [254]

Proteins	Effect of Proteasome Inhibition
I-κB	Elevation of I-κB levels leads to inhibition of NF-κB activity, resulting in growth inhibition, apoptosis, and decreased expression of angiogenic cytokines and adhesion molecules
p21, p27 (cyclin-dependent kinase inhibitors); p15, p16, p18, p19 (Ink family of cyclin D-cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors)	Elevation of the levels of these cyclin-dependent kinase inhibitors leads to G <sub>1</sub> -S cell-cycle arrest and apoptosis
p53	Tumor suppressor p53 elevation leads to apoptosis by several mechanisms including upregulation of p21 and Bax
Bax	Elevation of Bax leads to apoptosis, overcoming effects of Bcl-2 overexpression;
c-myc, N-myc	Not clear how overexpression of these oncogene products will promote antitumor effect; one hypothesis is that contradictory signals that occur because of simultaneous apoptotic signals from other proteins trigger cell death machinery
Cyclins	Contradictory signals to the cell as a result of elevation of cyclin A, B, D, and E levels in disordered manner and in conjunction with simultaneous elevation of cyclin-dependent kinase inhibitors promotes apoptosis
Damaged cellular proteins	Accumulation of these proteins normally cleared by the proteasome may trigger apoptosis
JNK	Activation of JNK leads to activation of caspase-8 and caspase-3; also may cause release of cytochrome C
Topoisomerase II $\alpha$	The level of this DNA torsional stress-relieving enzyme is regulated during cell cycle; this regulation is affected by proteasome inhibition

Abbreviations: I-κB, nuclear factor-kappa B inhibitor; NF-κB, nuclear factor-kappa B; JNK, c-Jun N-terminal kinase.



### 1.3.2. Βορτεζομίμπη (Bortezomib)

#### 1.3.2.1. Ιστορική αναδρομή

Το bortezomib, γνωστό με το κωδικό όνομα PS-341 και την εμπορική ονομασία VELCADE<sup>®</sup>, αποτελεί ένα διπεπτιδικό παράγωγο βορονικού οξέος, που περιέχει πυραζινοϊκό οξύ, φαινυλαλανίνη και λευκίνη στο μόριό του. Η χημική IUPAC ονομασία του είναι [3-methyl-1-(3-phenyl-2-pyrazin-2-ylcarbonylamino-propanoyl) amino-butyl] boronic acid, με μοριακό τύπο C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Συνιστά έναν αναστρέψιμο αναστολέα του 20S πρωτεασώματος, με την ομάδα του βορονικού οξέος να δεσμεύεται και να σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την ενεργή υδροξυλική ομάδα της θρεονίνης της β5-υπομονάδας, παρεμποδίζοντας έτσι την δράση χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος, ενώ έχει βρεθεί να αναστέλλει και την PGPH-like δράση, δεσμευόμενο με μικρότερη συγγένεια με την β1-υπομονάδα [247].

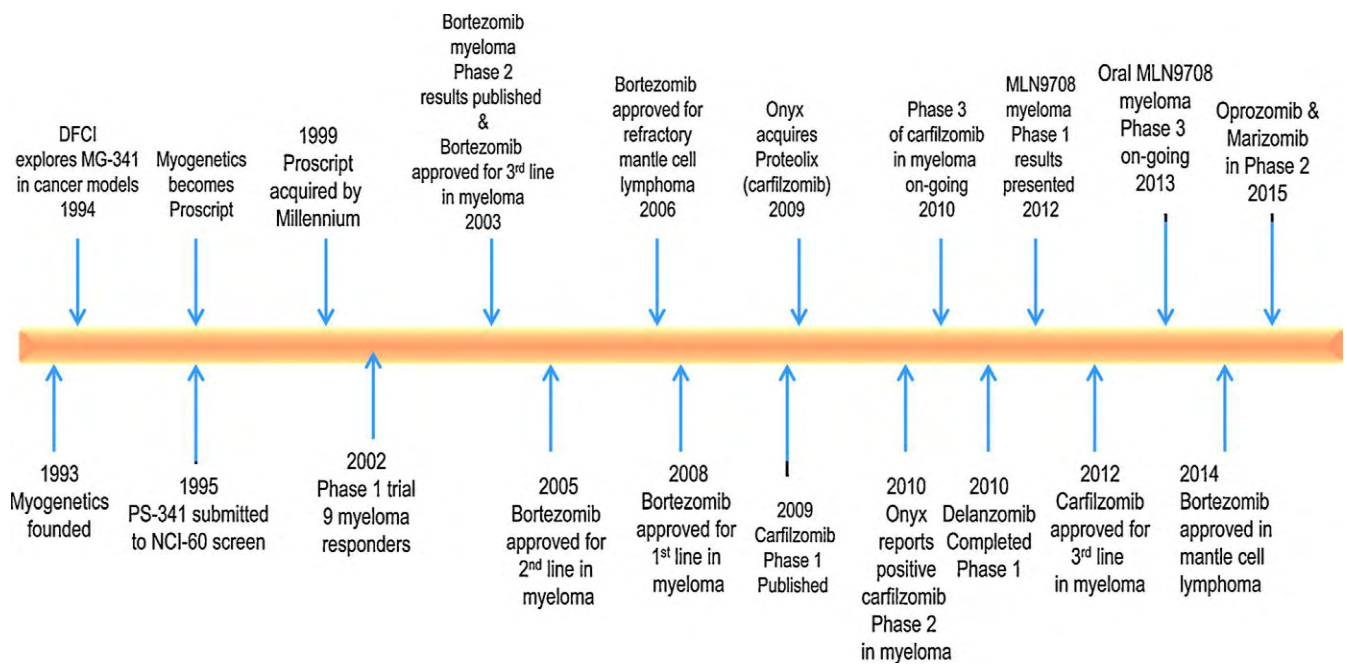
Το 1993 ο Alfred Goldberg και οι συνεργάτες του, που είχαν ανακαλύψει το πρωτεάσωμα ίδρυσαν την εταιρεία MyoGenetics, η οποία είχε ως στόχο την ανάπτυξη αναστολέων του πρωτεασώματος για την αντιμετώπιση της απώλειας μυϊκής μάζας. Η δράση του αρχικού παράγοντα MG-341, ο οποίος ανέστειλε επιλεκτικά την δράση χυμοτρυψίνης του 20S πρωτεασώματος, το 1994 διερευνήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε *in vivo* καρκινικά μοντέλα μυών στο Dana Farber Cancer Institute (**Εικόνα 1.9**). Η δημοσίευση αυτών των αποτελεσμάτων καθυστέρησε για αρκετά χρόνια, κατά τη διάρκεια των οποίων, η MyoGenetics λόγω κάποιων νομικών κωλυμάτων=becomes ProScript μετονόμασε το MG-341 σε PS-341 [255]. Το PS-341 βρέθηκε να δρα ως ένας ισχυρός κυτταροτοξικός παράγοντας στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7, με IC<sub>90</sub> ίσο με 0.05uM μετά από 24h έκθεσης, ενώ παρόμοια ήταν η δράση του και σε μύες που έφεραν EMT-6 όγκους. Σε συνδυασμό με cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel και doxorubicin, το PS-341 είχε προσθετική δράση καθυστερώντας την ανάπτυξη των υποδόριων πρωτογενών όγκων και την μετάσταση στους πνεύμονες [256].

Το 1995 το PS-341 (NSC681239) μαζί με αρκετά άλλα ανάλογα μόρια υποβλήθηκε στο NCI (National Cancer Institute) και διερευνήθηκε η δράση τους σε 60 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία ευρέως φάσματος δράση και σε συμπαγείς και σε αιματολογικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (<http://dtp.nci.nih.gov>). Όπως φάνηκε από την ανάλυση COMPARE, το PS-341 παρουσίασε ένα μοναδικό pattern,

επιβεβαιώνοντας έναν καινούριο μηχανισμό δράσης του. Επίσης, βρέθηκε να έχει αντικαρκινική δράση και σε αρκετά xenografts ανθρώπινων συμπαγών όγκων [257].

Το 1996 ο πυρηνικός παράγοντας kB (Nuclear factor kB, NF-kB) αναγνωρίστηκε ως μία από τις βασικές προ-καρκινικές πρωτεΐνες επιβίωσης στο ΠΜ. Τα μυελωματικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα NF-kB ενεργότητας συγκριτικά με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά [255]. Το PS-341 βρέθηκε να μπλοκάρει την πυρηνική μετατόπιση του NF-kB, παρουσιάζοντας αντικαρκινική δράση σε *in vivo* xenografts ΠΜ και σε χημειο-ευαίσθητες και χημειο-ανθεκτικές κυτταρικές σειρές ΠΜ μόνες τους καθώς και σε μοντέλα συγκαλλιέργειών με κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Επίσης, η ευαισθησία των ανθεκτικών μυελωματικών κυττάρων στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αυξήθηκε μετά από συνδυασμό με το PS-341 [258]. Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης έδειξε μετά από έκθεση των μυελωματικών κυττάρων στο PS-341 διάφορα μοριακά γεγονότα, συμπεριλαμβανομένων της μειορύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη/επιβίωση, αυξορύθμιση των προ-αποπτωτικών μορίων και των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ καθώς και των πρωτεϊνών της οδού ουβικουΐτίνης/πρωτεασώματος, που σχετίζονται με την απόκριση στο stress [259].

Το 1999 η Millenium Pharmaceuticals ανέλαβε την ανάπτυξη μίας κατάλληλης κλινικά εφαρμόσιμης σταθερής δομής του PS-341 που θα βασίζεται στην απελευθέρωση της ομάδας του βορονικού οξέος σε υδαρές μέσο [260]. Η κλινική ανάπτυξη του σκευάσματος PS-341 και η ασφάλεια του σε προκλινικό επίπεδο διεξήχθη από το Αναπτυξιακό Θεραπευτικό Πρόγραμμα του NCI. Τα κλινικά φαρμακολογικά χαρακτηριστικά του bortezomib προσδιορίστηκαν σε μελέτες φάσης I, δοκιμάζοντας διάφορα δοσολογικά σχήματα και ομάδες ασθενών [255].



**Εικόνα 1.9:** Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης των αναστολέων του πρωτεασώματος [255].

### 1.3.2.2. Κλινικές μελέτες στο πολλαπλό μυέλωμα

#### Φάσεως I μελέτες

Σε μία σημαντική φάσεως I μελέτη καθορίστηκαν σε ασθενείς με επιδεινούμενες αιματολογικές κακοήθειες η μέγιστη ανεκτή δόση (maximum tolerated dose, MTD), η δόση που περιορίζει την τοξικότητα (dose-limiting dose, DLT) και η φαρμακοδυναμική του bortezomib. Οι ασθενείς έλαβαν PS-341 2 φορές την εβδομάδα για διάστημα 4 εβδομάδων με δόσεις που κυμαίνονταν από 0.40 έως 1.38 mg/m<sup>2</sup> ακολουθούμενο από 2 εβδομάδες αποχής [261, 262]. Η τοξικότητα ήταν περιορισμένη σε δόσεις >1.04 mg/m<sup>2</sup> και περιελάμβανε κόπωση, θρομβοκυτταροπενία, υπονατρίαμια, υποκαλцаιμία και δυσφορία. Το PS-341 προκάλεσε 20S πρωτεασωμική αναστολή με έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο και το ποσοστό της αναστολής σχετιζόταν με την δόση του. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το PS-341 ήταν κλινικά αποτελεσματικό ενάντια στο επιδεινούμενο ΠΜ και πιθανόν στο non-Hodgking's λέμφωμα [263].

Το 2002, σε μία δεύτερη μελέτη φάσης I αξιολογήθηκε η τοξικότητα και η φαρμακοδυναμική του PS-341 σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους προχωρημένου σταδίου,

στους οποίους χορηγήθηκε 2 φορές/ εβδομάδα με ενδοφλέβια ένεση για διάστημα 2 εβδομάδων ακολουθούμενο από 1 εβδομάδα ανάρρωσης [262]. Σε αυτή την μελέτη 43 ασθενείς έλαβαν PS-341 με δόσεις που κυμαίνονταν από 0.13 έως 1.56 mg/m<sup>2</sup> για 89 κύκλους. Οι PS-341 δοσο-περιοριζόμενες τοξικότητες περιελάμβαναν διάρροια και περιφερική νευροπάθεια, ενώ δεν καταγράφηκαν δοσο-περιοριζόμενες αιματολογικές τοξικότητες. Ένας ασθενής με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρουσίασε σημαντική κλινικά απόκριση. Η συνιστώμενη δόση για τις φάσεως II μελέτες ήταν τα 1.04 mg/m<sup>2</sup> χορηγούμενη 2 φορές εβδομαδιαίως για διάστημα 4 εβδομάδων ακολουθούμενη από 2 εβδομάδες αποχής [262].

### *Φάσεως II μελέτες*

Τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των ανωτέρω φάσεως I κλινικών μελετών μαζί με τα προκλινικά δεδομένα της αντιμυελωματικής δράσης του bortezomib έδωσαν την ώθηση για την διεξαγωγή πολυκεντρικών ανοιχτών μη-τυχαιοποιημένων φάσεως II μελετών για την θεραπεία του επιδεινούμενου και υποτροπιάζοντος ΠΜ.

Το 2003 στην φάσεως II μελέτη SUMMIT, 202 ασθενείς με επιδεινούμενο/υποτροπιάζον ΠΜ που είχαν μέσο αριθμό προηγούμενων θεραπειών ίσο με 6, και οι οποίοι προηγουμένως όλοι είχαν λάβει κορτικοστεροειδή, το 92% αλκυλιωτικούς παράγοντες, το 81% ανθρακυκλίνες, το 83% θαλιδομίδη και το 64% μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, έλαβαν 1.3 mg/m<sup>2</sup> bortezomib 2 φορές εβδομαδιαίως για διάστημα 2 εβδομάδων ακολουθούμενο από 1 εβδομάδα χωρίς θεραπεία. Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν έλαβαν 8 κύκλους θεραπείας, ενώ σε αυτούς που δεν παρουσίασαν σημαντική ανταπόκριση τους χορηγήθηκε dexamethasone per os μετά από 2 αρχικούς κύκλους με bortezomib. Τα κριτήρια ανταπόκρισης της Ευρωπαϊκής Ομάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, όπως αυτά περιγράφονται από τον Blade [264] χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό ανταπόκρισης της νόσου. Από τους 193 ασθενείς, 4% πέτυχαν πλήρη ανταπόκριση (Complete Response, CR), με μη ανιχνεύσιμη με ανοσοκαθίλωση και ηλεκτροφόρηση μονοκλωνική παραπρωτεΐνη, 6% πέτυχαν σχεδόν πλήρη ανταπόκριση (near CR) με ανιχνεύσιμη μόνο με ανοσοκαθίλωση παραπρωτεΐνη, ενώ 18% και 7% παρουσίασε μερική (Partial Response, PR) και ελάχιστη ανταπόκριση (Minimal Response, MR) αντίστοιχα με ποσοστό συνολικής ανταπόκρισης (συνδυασμός

CR+PR+MR) ίσο με 35%. Η μέση ολική επιβίωση ήταν 16 μήνες και η μέση διάρκεια ανταπόκρισης 12 μήνες. Τοξικότητες σταδίου 3 περιλάμβαναν θρομβοκυτταροπενία, κόπωση, περιφερική νευροπάθεια και ουδετεροπενία. Από τους 74 ασθενείς που δεν είχαν προηγουμένως εμφανίσει MR και γι' αυτό έλαβαν dexamethasone σε συνδυασμό με bortezomib, 18% παρουσίασαν βελτίωση. Σε αυτούς περιλαμβάνονταν και 6 ασθενείς με μη ανταπόκριση στη dexamethasone, προτείνοντας έτσι ότι το bortezomib μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στον συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Η ανταπόκριση στο bortezomib δεν σχετίστηκε με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες του ΠΜ, όπως η απώλεια του χρωμοσώματος 13, ενώ παρατηρήθηκε και βελτίωση στο χρόνο εξέλιξης της νόσου (Time To Progression, TTP) κατά έναν παράγοντα 2-4, συγκριτικά με την προηγούμενη θεραπεία που λάμβαναν οι ασθενείς πριν εισέλθουν στην μελέτη [265].

Στην CREST φάσεως II μελέτη, 54 ΠΜ ασθενείς με υποτροπή μετά από πρώτης γραμμής θεραπεία τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν ενδοφλέβια 1.0 ή 1.3 mg/m<sup>2</sup> bortezomib 2 φορές εβδομαδιαίως για διάρκεια 2 εβδομάδων ανά 3 εβδομάδες για 8 κύκλους θεραπείας. Η λήψη dexamethasone επιτράπηκε σε ασθενείς με εξελισσόμενη/σταθερή νόσο μετά από 2 ή 4 κύκλους αντίστοιχα. Η πλήρης και μερική ανταπόκριση για το bortezomib μόνο του ήταν 30% και 38% στις ομάδες με 1.0 και 1.3 mg/m<sup>2</sup> αντίστοιχα. Τα ανάλογα ποσοστά για τους ασθενείς που είχαν λάβει bortezomib σε συνδυασμό με dexamethasone ήταν 38% και 50% για τις ομάδες με 1.0 και 1.3 mg/m<sup>2</sup> αντίστοιχα. Οι πιο κοινές τοξικότητες σταδίου 3 περιλάμβαναν θρομβοκυτταροπενία (24%), ουδετεροπενία (17%), λεμφοπενία (11%) και περιφερική νευροπάθεια (9%), ενώ τοξικότητες σταδίου 4 παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 9% [266, 267].

### *Φάσεως III μελέτες*

Το 2005 διεξήχθη σε 93 κέντρα στη Νότια Αμερική, την Ευρώπη και το Ισραήλ, η APEX, μία ανοιχτή συγκριτική διεθνής μελέτη φάσεως III, στην οποία 669 ΠΜ ασθενείς που είχαν υποβληθεί τουλάχιστον μία φορά σε θεραπεία τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν bortezomib ή υψηλής δόση dexamethasone. Επειδή κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης ανάλυσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση στον χρόνο εξέλιξης της νόσου υπέρ του σκέλους του VELCADE (6.2 μήνες vs 3.5 μήνες) προτάθηκε σε όλους τους ασθενείς στο σκέλος ελέγχου, οι οποίοι ελάμβαναν υψηλή δόση δεξαμεθαζόνης, η

χορήγηση θεραπείας με VELCADE. Το ποσοστό συνολικής ανταπόκρισης που επιτεύχθηκε με το VELCADE ήταν 38% συγκριτικά με το αντίστοιχο της dexamethasone που ήταν 18% [268, 269].

*Μελέτες σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες*

Το 2008 στην VISTA φάσεως III μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ του συνδυασμού bortezomib+melfhalan+prednisone (VMP) και του MP μόνο του σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ [270]. Ο μέσος χρόνος εξέλιξης της νόσου (TTP) ήταν 24 μήνες με τον συνδυασμό VMP συγκριτικά με τους 16.6 μήνες με τον MP συνδυασμό, ενώ 63% των ασθενών που είχαν ανταποκριθεί στην αρχική θεραπεία με το bortezomib παρέμειναν ευαίσθητοι στο συγκεκριμένο φάρμακο, μετά από επανέκθεσή τους κατόπιν υποτροπής και ο μέσος TTP ήταν ίσος με 9.3 μήνες [271]. Παρόλα αυτά σημαντικές τοξικότητες αναφέρθηκαν με κυριότερες τις γαστρεντερικές διαταραχές και την περιφερική νευροπάθεια.

Για το λόγο αυτό, η Ισπανική ομάδα σχεδίασε ένα καινούριο αποτελεσματικό αλλά ταυτόχρονα λιγότερο τοξικό δοσολογικό σχήμα, βάσει του οποίου οι ασθενείς λάμβαναν 1 φορά την εβδομάδα bortezomib, συγκριτικά με τις έως τώρα 2 φορές εβδομαδιαίως, μαζί με prednisone, melfhalan (VMP) ή thalidomide (VTD) ακολουθούμενη από μία δεύτερη τυχαιοποίηση για θεραπεία συντήρησης με bortezomib-thalidomide (VT) ή bortezomib-prednisone (VP) [272]. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά ανταπόκρισης, αλλά οι τοξικότητες σταδίου 3 ή 4 περιορίστηκαν στο 7% μόνο στο σκέλος VMP. Μετά τη θεραπεία συντήρησης το CR που επιτεύχθηκε ήταν 40% και στα 2 σκέλη και μόνο το 3% των VP και το 9% των VT ασθενών ανέπτυξαν σταδίου 3 περιφερική νευροπάθεια [273]. Η μέση PFS και TTP ήταν 31 και 35 μήνες αντίστοιχα και το ποσοστό της ολικής επιβίωσης στα 3 χρόνια ήταν 70%. Σε μία άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσεως III που διεξήχθη από την Ιταλική ομάδα συγκρίθηκε το VMP-thalidomide ακολουθούμενο από θεραπεία συντήρησης με VT με το VMP μόνο του σε ασθενείς μη υποψήφιους για ASCT. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τους ρυθμούς ανταπόκρισης και το PFS ήταν ευνοϊκά υπέρ του σκέλους VMPT-VT [274, 275]. Οι συγκεκριμένες 2 μελέτες φάσεως III τεκμηρίωσαν από τη μία το εβδομαδιαίο VMP δοσολογικό σχήμα, περιορίζοντας έτσι τις τοξικότητες και

από την άλλη μαζί με την φάσεως 3b UPFRONT μελέτη την bortezomib-βασιζόμενη θεραπεία συντήρησης στους ηλικιωμένους ασθενείς [245].

Στην IFM2005-01 φάσεως III μελέτη έγινε σύγκριση του bortezomib-dexamethasone με το vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) ως πρώτης γραμμής θεραπεία στους υποψήφιους ASCT ασθενείς. Τα ποσοστά ανταπόκρισης ήταν υψηλότερα στο σκέλος bortezomib-dexamethasone ανεξάρτητα από το στάδιο της ασθένειας και τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, ενώ παρατηρήθηκε και μία σημαντική τάση για βελτίωση του PFS. Τα αποτελέσματα αυτά κατέστησαν το bortezomib-dexamethasone τον βασικό σκελετό στην πρώτη γραμμή θεραπειών στους υποψήφιους ASCT ασθενείς [276, 245].

Η προσθήκη τρίτου παράγοντα στον συνδυασμό bortezomib-dexamethasone, όπως thalidomide (VTD), (liposomal) doxorubicin (VDD/PAD), lenalidomide (VRD) και cyclophosphamide (VCD) έχει εξεταστεί σε αρκετές φάσεως II μελέτες και τα αποτελέσματα ήταν πολύ καλύτερα συγκριτικά με τον διπλό συνδυασμό. 3 μελέτες έχουν ήδη δείξει ότι το VTD είναι ανώτερο από το TD ή το bortezomib-dexamethasone όσον αφορά τα ποσοστά ανταπόκρισης [277-279], καθιστώντας από το 2012 τον τριπλό συνδυασμό το πρότυπο θεραπείας πριν την αυτόλογη μεταμόσχευση [280].

Όσον αφορά τους ασθενείς με υποτροπιάζον/επιδεινούμενο ΠΜ, σε μία φάσεως III μελέτη έγινε σύγκριση του bortezomib μόνο του με bortezomib+pegylated liposomal doxorubicin (PLD) και παρατηρήθηκε αύξηση του TTP από τους 6.5 στους 9.3 μήνες στο σκέλος bortezomib-PLD, οδηγώντας στην έγκριση αυτού του συνδυασμού για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος ΠΜ το 2007 [281].

Εκτός από την ανωτέρω φάσεως III μελέτη, λίγα είναι τα δεδομένα που προκύπτουν από τις τυχαίοποιημένες φάσεως III μελέτες για τους bortezomib-βασιζόμενους συνδυασμούς στο υποτροπιάζον ΠΜ. Πρόσφατα το Inregroupe Francophone du Myelome (IFM) και η Ευρωπαϊκή Ομάδα Μεταμόσχευσης Μυελού διεξήγαγαν μία συγκριτική μελέτη μεταξύ του bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) και του thalidomide-dexamethasone (TD) σε ασθενείς οι οποίοι έχουν υποτροπιάσει μετά από υψηλής δόσης θεραπεία σε συνδυασμό με αυτόλογη μεταμόσχευση. Η μελέτη αυτή έδειξε για πρώτη φορά ότι η bortezomib-βασιζόμενη τριπλέτα είναι ανώτερη συγκριτικά με τη thalidomide-βασιζόμενη διπλέτα για το υποτροπιάζον ΠΜ όσον αφορά κυρίως τα ποσοστά ανταπόκρισης και το υψηλότερο TTP [282]. Στην VANTAGE 088 φάσεως III μελέτη δείχτηκε ένα μικρό κλινικό πλεονέκτημα υπέρ του συνδυασμού του αναστολέα της

απακετυλάσης των ιστονών vorinostat+ bortezomib συγκριτικά με το bortezomib μόνο του [283]. Η αποτελεσματικότητα των συνδυασμών με άλλους παράγοντες, όπως το perifosine και το ranobinostat εκτιμάται ήδη σε τρέχουσες μελέτες φάσεως II και III [245, 284].

### 1.3.2.3. Κλινικές μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου

#### *Άλλες αιματολογικές κακοήθειες*

Προκλινικά δεδομένα έχουν δείξει συνεργική αντικαρκινική δράση του bortezomib σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του non-Hodgkin λεμφώματος (NHL) [285, 286]. Φάσεως I μελέτες έδειξαν ότι η μέγιστη ανεκτή δόση για το bortezomib σε προηγουμένως θεραπεύσιμους NHL ασθενείς είναι παρόμοια με εκείνη για το ΠΜ [287, 288]. Το 2006 στην φάσεως II μελέτη PINNACLE 155 ασθενείς με επιδεινούμενο και υποτροπιάζον λέμφωμα μανδύα (mantle cell lymphoma, MCL) έλαβαν μονοθεραπεία με bortezomib και το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης που επιτεύχθηκε ήταν ίσο με 32%, οδηγώντας στην έγκρισή του από το FDA για τη θεραπεία του MCL [289, 290]. Άλλες μελέτες φάσεως II που συνδυάζουν το bortezomib με το rituximab και με άλλους παράγοντες, όπως ανάλογα πουρίνης ή αλκυλιωτικούς παράγοντες [291, 292] έδειξαν συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης 50-75%. Συνδυασμός του bortezomib με την πρότυπη θεραπεία Rituxan+HyperCVAD σε νεο-διαγνωσθέντες MCL ασθενείς επέτυχε ποσοστό ανταπόκρισης 90-100% [293, 294], ενώ σε συνδυασμό με το rituximab έδωσε αντίστοιχο ποσοστό 85% σε ασθενείς με waldenstrom's macroglobulinemia [295]. Επίσης, το bortezomib έχει αξιολογηθεί και σε μυελοειδείς κακοήθειες, ειδικότερα στην οξεία μυελοειδή λευχαιμία. Σε μία μικρού εύρους φάσεως II μελέτη, οι μισοί από τους 14 ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων αλλά έντονη περιφερική νευροπάθεια [296]. Συνδυασμός του bortezomib με άλλους κυτταροτοξικούς [297, 298] ή διαφοροποιητικούς παράγοντες, όπως είναι το all-trans retinoic acid [299] ίσως δώσει καλύτερα αποτελέσματα.



### *Συμπαγείς όγκοι*

Τα αποτελέσματα από την χορήγηση του Bortezomib στους συμπαγείς όγκους ήταν λιγότερο εντυπωσιακά. Τελικά δεν αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στον καρκίνο του μαστού μόνο του [300, 301] ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία [302], στον ορμονο-ανθεκτικό καρκίνο του προστάτη σε συνδυασμό με prednisone ή docetaxel [303], στους προχωρημένου σταδίου ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίοι δεν έχουν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία [304], στο μεταστατικό γαστρικό ή γαστροοισοφαγικό αδενοκαρκίνωμα [305], στους μεταστατικούς νευροενδοκρινείς όγκους [306] και στον προχωρημένου σταδίου καρκίνο του νεφρού [307]. Ο καθορισμός τυχόν μηχανισμών ανθεκτικότητας στο φάρμακο είναι κρίσιμη για τον σχεδιασμό νέων πιο αποτελεσματικών bortezomib-βασιζόμενων θεραπειών.

#### **1.3.2.4. Έγκριση του bortezomib**

Τα αποτελέσματα από τις ανωτέρω φάσεως II μελέτες (CREST & SUMMIT) οδήγησαν το 2003 στην έγκριση του bortezomib από τον Αμερικανικό Οργανισμό φαρμάκων (U.S. FDA) για τη θεραπεία του επιδεινούμενου ΠΜ, λαμβάνοντας πλέον την εμπορική ονομασία VELCADE®. Το 2005 βάσει της φάσεως III μελέτης APEX εγκρίθηκε κανονικά από το U.S. FDA για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζον ΠΜ, που έχουν ήδη υποβληθεί τουλάχιστον μία φορά σε προηγούμενη θεραπεία. Στις 23 Ιουνίου του 2008, το U.S. FDA μετά από τα αποτελέσματα της VISTA μελέτης ενέκρινε το bortezomib ως πρώτη γραμμής θεραπείας για το ΠΜ. Επίσης, το 2006 έλαβε έγκριση για τη θεραπεία του επιδεινούμενου και υποτροπιάζοντος λεμφώματος μανδύα (mantle cell lymphoma) και το 2014 ως πρώτη γραμμής θεραπεία για τους ασθενείς με λέμφωμα μανδύα [255].

#### **1.3.2.5. Μηχανισμός δράσης**

Ο μηχανισμός της δράσης του bortezomib περιλαμβάνει την σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση ως συνέπεια της πρωτεασωμικής αναστολής,

αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών και επιδράσεις στο μικροπεριβάλλον του όγκου [332] (Εικόνα 1.12) [254]. Στον πίνακα 1.5 φαίνονται μερικοί από τους κυριότερους πρωτεϊνικούς στόχους του bortezomib.

#### 1.3.2.5.1. Αναστολή του NF-kB μονοπατιού

Ιδιοσύστατη ενεργοποίηση του NF-kB έχει συνδεθεί με ανάπτυξη/πολλαπλασιασμό και με ανθεκτικότητα σε διάφορους ΧΜΘ παράγοντες, επηρεάζοντας διαφορικά την ευαισθησία στους πρωτεασωμικούς αναστολείς στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά [308]. Η ενεργοποίησή του περιλαμβάνει: φωσφορυλίωση του IκB από την IκBa κινάση, ουβικουϊτινίωση από την E3RS(I-kB/β-TrCP), μία SCF τύπου E3 λιγάση ουβικουϊτίνης και πρωτεασωμική αποικοδόμηση του φωσφορυλιωμένου IκBa, οδηγώντας στην απελευθέρωση και πυρηνική μετατόπισή του p50/p65 NF-kB, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύεται στις ομόλογες αλληλουχίες που εντοπίζονται στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη/επιβίωση, επάγοντας την μεταγραφή τους [309, 310]. Σε αυτά περιλαμβάνονται κυτοκίνες (IL-6 και TNF-α), η κυκλίνη D, χημοκίνες, διάφοροι παράγοντες που επάγουν την επιβίωση, όπως αναστολείς των πρωτεϊνών απόπτωσης και BclXI και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το VCAM και η E-σελεκτίνη, [310, 311]. Προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών επάγει την NF-kB-μεσολαβούμενη μεταγραφή και έκκριση των IL-6 και IGF-1 [312, 313], οδηγώντας σε επιβίωση των MM κυττάρων στον μυελό των οστών, παρεμποδίζοντας την dexamethasone-μεσολαβούμενη απόπτωση [314]. Τα χημειοευαίσθητα MM κύτταρα έχει βρεθεί να παρουσιάζουν μικρότερη NF-kB ενεργότητα σε σύγκριση με τα χημειοανθεκτικά, γεγονός που δείχνει τον ρόλο του NF-kB στην χημειοανθεκτικότητα [315]. Επίσης, αυξημένα επίπεδα του NF-kB έχουν αναφερθεί στα MM κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς, οι οποίοι έχουν υποτροπιάσει μετά τη χημειοθεραπεία [313]. Το bortezomib αναστέλλει τη δράση του NF-kB, παρεμποδίζοντας την αποικοδόμηση του IκB [316-318], μειορρυθμίζοντας έτσι την έκφραση διαφόρων παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την επιβίωση, την αγγειογένεση και την προσκόλληση [254, 319]. Οι Ma et al., 2003 [320] έδειξαν μειωμένη NF-kB δεσμευτική ικανότητα και πυρηνική μετατόπιση στις χημειοευαίσθητες και χημειοανθεκτικές MM κυτταρικές σειρές. Σε άλλες μελέτες, το bortezomib βρέθηκε να αναστέλλει την παρακρινή

κυτταρική ανάπτυξη και σηματοδότηση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, μέσω παρεμπόδισης της έκκρισης της IL-6 [321], ενώ οι *Roccaro et al., 2006* [322] έδειξαν ότι το bortezomib μπλοκάρει τον επαγόμενο από την δέσμευση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα προερχόμενα από ΠΜ ασθενείς, πολλαπλασιασμό της MM.1S κυτταρικής σειράς, μέσω δοσο-εξαρτώμενης αναστολής της έκκρισης των VEGF και IL-6 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το bortezomib έχει βρεθεί να αναστέλλει το μη κανονικό NF-kB μονοπάτι και την επαγόμενη NF-kB δράση και οι *Hideshima et al., 2009* [323] έδειξαν ενεργοποίηση του NF-kB εντοπισμένη στα περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος, αλλά αναστολή του στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, δείχνοντας διαφορικές δράσεις του NF-kB ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

#### 1.3.2.5.2. Επίδραση στα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK & PI3K/Akt

Παρομοίως με το μονοπάτι NF-kB, το p44/42 MAPK μονοπάτι έχει βρεθεί να εμπλέκεται τόσο σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι οι λευχαιμίες όσο και σε συμπαγείς όγκους όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, συμμετέχοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αναστολή της απόπτωσης και την αγγειογένεση. Μέσω επιπρόσθετων γεγονότων φωσφορυλίωσης, οι κινάσες p44 και p42 βρέθηκε να ρυθμίζουν τη δράση αρκετών σηματοδοτικών μορίων και μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των c-Myc και NF-kB. Υπερέκφραση του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης Her2 συνιστά άσχημο προγνωστικό δείκτη για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ενώ αυξημένη p44/42 ενεργότητα ίσως σχετίζεται με φτωχότερη κλινική έκβαση ανεξάρτητα από την έκφραση του υποδοχέα Her2. Η δράση του πρωτεασωμικού αναστολέα bortezomib στο συγκεκριμένο μονοπάτι έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε *in vitro* καρκινικά μοντέλα μαστού, όπου εφαρμογή του οδήγησε σε απώλεια των φωσφορυλιωμένων ενεργών μορφών p44/42. Μελέτες με φαρμακολογικούς παράγοντες και κατασκευές με κυρίαρχες-αρνητικές μεταλλάξεις που αναστέλλουν την p44/42 σηματοδότηση ενίσχυσε την αποπτωση, ενώ επαγωγή της ενεργοποίησης του p44/42 μονοπατιού την παρεμπόδισε [638].

Επίσης, σε προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη σε ΠΜ κυτταρικές σειρές βρέθηκε ότι το bortezomib ανέστειλε την επαγόμενη από την IL-6 φωσφορυλίωση των p42/44 στην MM1.S κυτταρική σειρά, ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου το STAT3 μονοπάτι [321].

Παρακάτω παρατίθενται μερικές από τις πιο πρόσφατες και σημαντικές BTZ-μεσολαβούμενες δράσεις που εμπλέκουν κυρίως αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI3K/Akt.

### *Αναστολή των NP-μεσολαβούμενων μιτογόνων και αντι-αποπτωτικών σημάτων*

Σε μία προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, βρέθηκε ότι το BTZ αναστέλλει την μεσολαβούμενη από τα νευροπεπτίδια κυτταρική ανάπτυξη μέσω σταθεροποίησης των προ-αποπτωτικών παραγόντων που συνιστούν υποστρώματα του πρωτεασώματος (p21, p27, p53, Bad) και αναστολής του NF-κB και της μεταγραφικής του ενεργότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη. Εκτός των ανωτέρω, αξιοσημείωτο ήταν ότι η δράση του BTZ φάνηκε να εμπλέκει αναστολή του MAPK μονοπατιού, δεδομένου ότι αυτό συνιστά ένα από τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τα νευροπεπτίδια επάγοντας μιτογόνα και αντι-αποπτωτικά σήματα. Αντίθετα, το μονοπάτι Akt επηρεάστηκε σε μικρότερο βαθμό από το bortezomib, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι και οι δύο κυτταρικές σειρές, PC3 και LNCaP που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζουν μία υπερενεργοποίηση του Akt σε βασικές συνθήκες ανάπτυξης ως αποτέλεσμα της μεταλλαγμένης μορφής του PTEN που διαθέτουν. Βέβαια, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για το εάν το bortezomib μπλοκάρει τα συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια άμεσα (π.χ. δρώντας ως αναστολέας κινασών) ή έμμεσα μεταβάλλοντας τη σταθερότητα άλλων υποστρωμάτων του πρωτεασώματος [561].

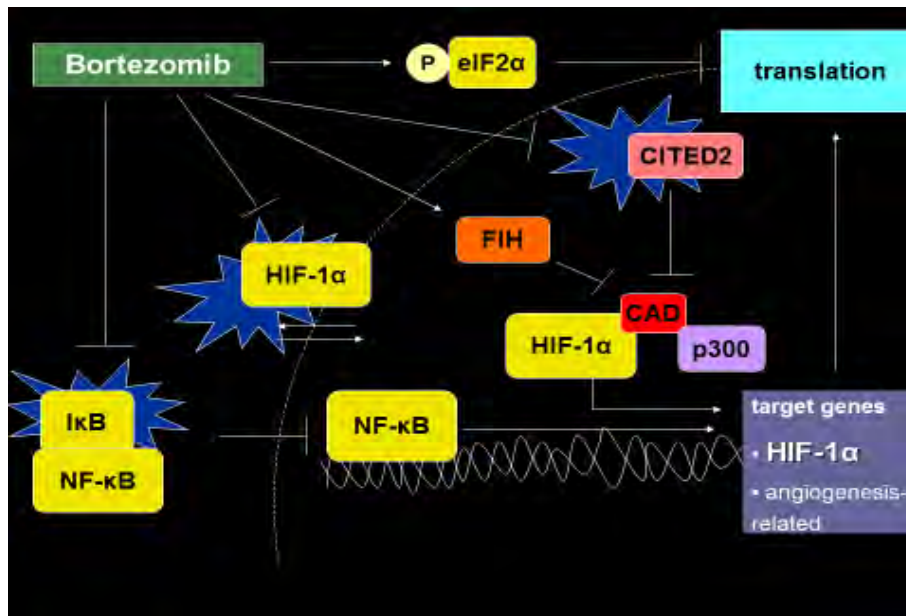
### *Αναστολή της δράσης του HIF-1α*

Το bortezomib έχει βρεθεί να αναστέλλει την αγγειογένεση σε κύτταρα ΠΜ και ενδοθηλιακά, μειώνοντας τα επίπεδα του VEGF, μέσω καταστολής του παράγοντα HIF-1. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1, ο οποίος συνίσταται από τις υπομονάδες, HIF-1α και HIF-1β έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή σε χαμηλές συνθήκες οξυγόνου και στην προόδο του καρκίνου, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που

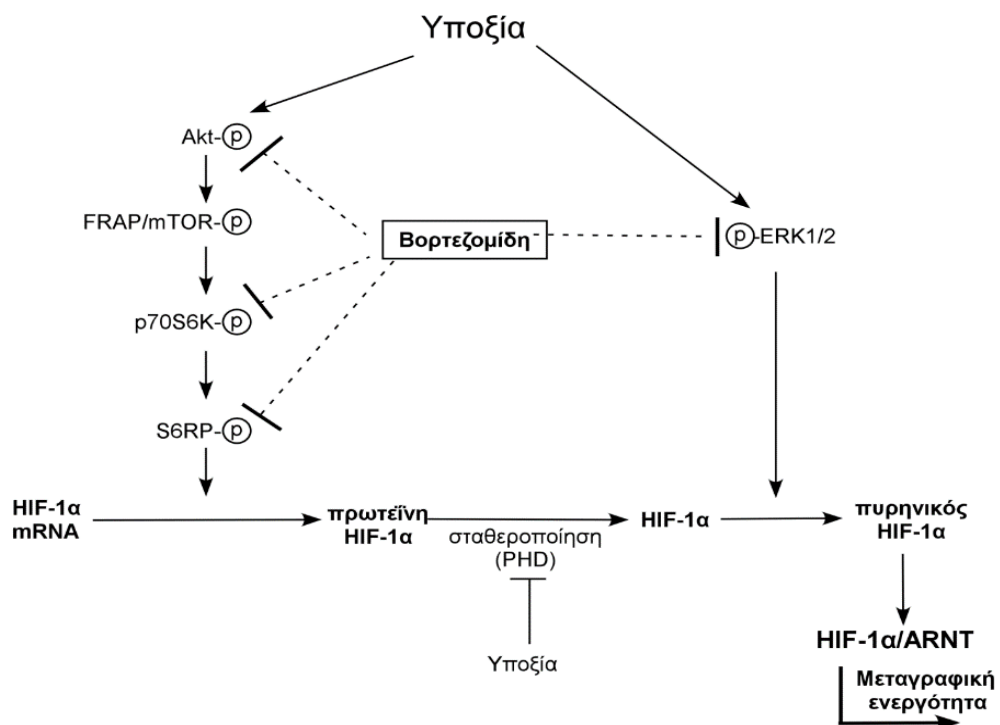
εμπλέκονται στην αγγειογένεση, τον κυτταρικό μεταβολισμό, την απόπτωση, την επιθετικότητα και/ή την μετάσταση. Εκτός από την οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1, το MAPK μονοπάτι βρέθηκε να τον ενεργοποιεί, μέσω επαγωγής του σχηματισμού και της trans-ενεργοποίησης του HIF-p300/CBP συμπλέγματος, και μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης του HIF-1a.

Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή της δράσης του HIF-1a δεν είναι πλήρως κατανοητοί και τα αποτελέσματα των μελετών αντιφατικά. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το BTZ αναστέλλει την απόκριση στην υποξία, ενεργοποιώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της C-τελικής υπομονάδας ενεργοποίησης (C-terminal activation domain, CAD) του HIF-1a και του FHI (Factor inhibiting HIF-1), παρεμποδίζοντας έτσι την στρατολόγηση του p300 συνενεργοποιητή στο HIF-1 (**Εικόνα 10**) [636]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το bortezomib ανέστειλε την μετάφραση του HIF-1a στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, μέσω φωσφορυλίωσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (translation initiation factor 2a, eIF2a) (**Εικόνα 1.10**) [637].

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας, δείχτηκε για πρώτη φορά ότι το bortezomib αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1a, μέσω καταστολής του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR και προκαλεί παρεμπόδιση της πυρηνικής μετατόπισης και της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1, παρεμβαίνοντας στο μονοπάτι MAPK σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη (**Εικόνα 1.11**) [633].



Εικόνα 1.10: Μηχανισμοί αναστολής της δράσης του HIF-1 από το BTZ



Εικόνα 1.11: Σχηματικό μοντέλο των πιθανών μηχανισμών μειορύθμισης του HIF-1α από το BTZ. Το BTZ καταστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση του HIF-1α και την πυρηνική συσσώρευση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη, μέσω αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt/mTOR και MAPK αντίστοιχα [633].

## 1.3.2.5.3. Αυξορύθμιση αποπτωτικών μονοπατιών

Επιπροσθέτως, *in vitro* βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει: **a)** ενεργοποίηση των κλασικών πρωτεϊνών απόκρισης στο stress, όπως οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ Hsp27, Hsp70 και Hsp90 [324, 325], **b)** αυξορύθμιση της c-jun NH<sub>2</sub>-τελικής κινάσης (JNK) και αυξημένη φωσφορυλίωση του c-Jun μαζί με μειωμένη ενεργότητα της FLICE-like ανασταλτικής πρωτεΐνης (c-FLIP), έναν αρνητικό ρυθμιστή της Fas-επαγόμενης απόπτωσης [326] **c)** ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από τις κασπάσες απόπτωσης μέσω 3 διακριτών μονοπατιών: του κλασικού ενδοκυττάριου μιτοχονδριακού μονοπατιού, που περιλαμβάνει την απελευθέρωση στο κυτοσόλιο του κυτοχρώματος c και άλλων δευτερευόντων μιτοχονδριακών ενεργοποιητών των κασπασών, επάγοντας τον καταρράκτη κασπάση 9→κασπάση 3 [325], του μεσολαβούμενου από την κασπάση 8 εξωκυττάριου μονοπατιού που ενεργοποιείται από τους υποδοχείς θανάτου (Death Receptors, DR) [326] και του μονοπατιού απόκρισης στο stress του ενδοπλασματικού δικτύου, που περιλαμβάνει τις κασπάσες -2/-4/-12 [319]. Επίσης, η μεσολαβούμενη από το BTZ απόπτωση έχει βρεθεί να συνοδεύεται από μεταβολές στο μιτοχονδριακό μεμβρανικό δυναμικό και παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου [328-330].

Συγκεκριμένα, αναστολή του πρωτεασώματος από το bortezomib σχετίζεται με συσσώρευση και μεταγραφική ενεργοποίηση των BH3-πρωτεϊνών, όπως είναι οι PUMA, BIM, NOXA ή BIK, οι οποίες ανταγωνίζονται τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας BCL-2, όπως είναι οι BCL-2, BCL-xL, ή Mcl-1 και μπορούν να ενεργοποιήσουν τα προ-αποπτωτικά μέλη BAX και BAK. Οι ενεργοποιημένες μορφές των BAX και BAK δημιουργούν πόρους στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγώντας στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και των Smad/Diablo από την ενδομεμβρανική περιοχή στο κυτοσόλιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης 9, την αναστολή του IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) και την επακόλουθη απόπτωση από τις κασπάσες τελεστές [649].

Εκτός από τις ανωτέρω δράσεις, οι Gomez-Bougie *et al.*, 2007 [334] έδειξαν ότι η επαγόμενη από το bortezomib απόπτωση στα μυελωματικά κύτταρα σχετίζεται με αυξορύθμιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Noxa και με αποικοδόμηση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Mcl-1. Ακόμη, το bortezomib βρέθηκε να σταθεροποιεί τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bid και Bax [341].

Παρόμοιοι μηχανισμοί έχουν αναφερθεί και στις Β-κυτταρικές σειρές λεμφώματος. Ενεργοποίηση των κασπασών -8 και -9 και της επακόλουθης απόπτωσης έχει παρατηρηθεί στις DHL-7 και DHL-4 κυτταρικές σειρές λεμφώματος μετά από έκθεση στο bortezomib μαζί με αναστολή της DNA δεσμευτικής ικανότητας του NF-kB [344]. Σε αντίθεση με τις MM κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε αύξηση της Bcl-2 αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης και στις 2 ανωτέρω σειρές που συνοδεύτηκε από αυξήσεις στις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak [344]. Επιπροσθέτως, στις MCL κυτταρικές σειρές το bortezomib προκάλεσε αναστολή της ιδιόσυστατης NF-kB ενεργότητας και της έκφρασης της κυκλίνης D1, οδηγώντας σε επαγωγή απόπτωσης που σχετίζεται με μιτοχονδριακή διατάραξη [345]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μειορύθμιση των αντιποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-XL και Bfl/A1 και ενεργοποίηση της κασπάσης -3, οδηγώντας σε αποικοδόμηση του Bcl-2 και σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [345]. Επίσης, το bortezomib βρέθηκε να επάγει απόπτωση στις κυτταρικές σειρές της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και του Burkitt λεμφώματος, η οποία σχετίζεται με αυξορύθμιση των TRAIL και DR4, DR5 καθώς και με μειωμένα επίπεδα του c-FLIP [346].

#### 1.3.2.5.4. Επίδραση στον κυτταρικό κύκλο

Η αναστολή του πρωτεασώματος βρέθηκε να επηρεάζει τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 (p53), ενώ μελέτες έδειξαν σταθεροποίηση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27 [341]. Σε μία μελέτη δείχτηκε ότι το bortezomib επάγει απόπτωση και στα αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα μυελωματικά κύτταρα [321], το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως του παχέως εντέρου, στο γλοιοβλάστωμα και στα λευχαιμικά κύτταρα [337-339]. Η επαγόμενη από το bortezomib απόπτωση στα μυελωματικά κύτταρα βρέθηκε να σχετίζεται με φωσφορυλίωση του p53 (Ser15) [340]. Πιθανόν μεταλλάξεις στο -COOH τμήμα του p53, που περιέχει την κύρια περιοχή της λιγάσης ουβικουΐνης να επηρεάζει την επαγόμενη από το bortezomib κυτταροτοξικότητα [168].



#### 1.3.2.5.5. Επίδραση σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA

Η ανθεκτικότητα στη θεραπεία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος οφείλεται κυρίως στην υψηλή έκφραση του ενζύμου O6-μεθυλοτρανσφεράση της μεθυλογουανίνης (O6-methylguanine methyltransferase, MGMT), το οποίο συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA [639]. Ο μηχανισμός της δράσης του περιλαμβάνει την απομάκρυνση των αλκυλομάδων από το DNA και τη μεταφορά τους σε ένα κατάλοιπο Cys-143. Το ενδιάμεσο S-αλκυλκυστεΐνης δεν δύναται να μετατραπεί σε Cys και η αλκυλιωμένη μορφή του MGMT αναγνωρίζεται από τη λιγάση της ουβικουΐτινης και οδηγείται σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση από το 26S πρωτεάσωμα [640]. Εκτός από την μετα-μεταφραστική του ρύθμιση από το 26S πρωτεάσωμα, το MGMT έχει βρεθεί να ρυθμίζεται μεταγραφικά, μέσω απευθείας δέσμευσης του παράγοντα NF-κB στις αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης στον προαγωγέα του *MGMT* [641].

Σε μία πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας, δείχτηκε ότι ο μηχανισμός της δράσης του BTZ σε κυτταρικές σειρές πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, περιλαμβάνει απευθείας αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA, με παρεμπόδιση του ενζύμου MGMT, μέσω εξασθένησης της NF-κB-επαγόμενης μεταγραφής του και αναστολής της εξαρτώμενης – από τη φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2a μετάφρασης του [642].

Επίσης, εκτός από την MGMT, το bortezomib έχει βρεθεί να καταστέλλει τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA, δρώντας μέσω απενεργοποίησης της DNA-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης [331].

#### 1.3.2.5.6. Διατάραξη του μονοπατιού απόκρισης στις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR)

Η πρωτεϊνική ομοιοστασία απαιτεί τη δράση των σαπερωνινών και του UPS μονοπατιού για την απενεργοποίηση και την αποικοδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Όταν οι πρωτεΐνες δεν αναδιπλώνονται σωστά οδηγούνται σε αποικοδόμηση από το 26S πρωτεάσωμα. Εάν δεν ακολουθήσει πρωτεασωματική αποικοδόμηση, τότε σχηματίζουν συσσωματώματα, οδηγώντας στο stress του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress), το οποίο με τη σειρά του επάγει το μονοπάτι UPR, ώστε να κατασταλεί η συσσώρευση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και να αποκατασταθεί η δράση του Ε.Δ. Το UPR μονοπάτι μεσολαβείται από το PERK/eIF2a/ATF-4 και από 2 άλλες

διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τις IRE1 και ATF6. Υπό συνθήκες ER stress, το ενεργό IRE1 απομακρύνει ένα ιντρόνιο 26 νουκλεοτιδίων από το XBP-1 mRNA και προκύπτει το ματισμένο XBP-1 mRNA, το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί τον ενεργό XBP-1 μεταγραφικό παράγοντα. Αυτά τα μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα την αυξορύθμιση της μεταγραφής των UPR γονιδίων-στόχων, όπως της ER σαπερονίνης BiP/GRP78 και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ER-σχετιζόμενη αποικοδόμηση (ER-Associated Degradation, ERAD), η οποία συμβάλλει στην αποκατάσταση της πρωτεϊνικής ομοιοστασίας. Όταν όμως το ER stress επιμένει τότε η UPR σηματοδότηση επάγει σήματα προ-αποπτωτικά και όχι επιβίωσης [335, 336].

Αναστολή του 26S πρωτεασώματος από το bortezomib έχει βρεθεί να επάγει προ-αποπτωτικό ER stress στο ΠΜ [643], συνιστώντας έναν σημαντικό μηχανισμό της δράσης του καθώς τα μυελωματικά κύτταρα παράγουν υψηλές ποσότητες ανοσοσφαιρινών και ένα λειτουργικό UPR απαιτείται για την επιβίωσή τους, καθώς επίσης και στους καρκίνους του παγκρέατος [644], του κρανίου και του λαιμού [645] και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [646].

#### 1.3.2.5.7. Επαγωγή νέκρωσης

Η νέκρωση συνιστά μία εναλλακτική οδό κυτταρικού θανάτου, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί κάτω από συνθήκες μεταβολικού stress όταν ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι ελαττωματικός (μπλοκάρισμα των κασπασών από φαρμακευτικούς αναστολείς ή μη ενεργοποίηση των εξαρτώμενων-από τις κασπάσες μονοπατιών απόπτωσης) ή από μακρόχρονη αυτοφαγία [647].

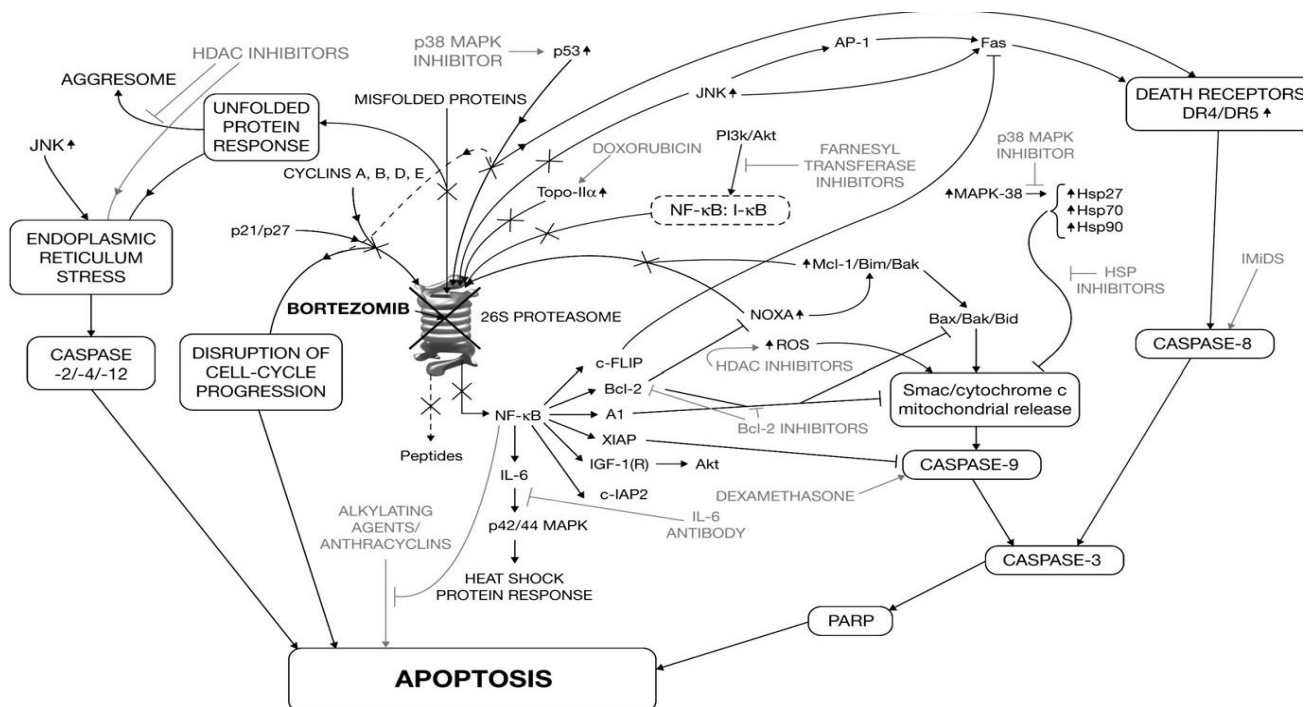
Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο μηχανισμός της δράσης του bortezomib περιλαμβάνει κυρίως ενεργοποίηση των μεσολαβούμενων από τις κασπάσες αποπτωτικών μονοπατιών. Παρόλα αυτά, σε μία πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη στην καρκινική κυτταρική σειρά παχέως εντέρου DLD-1, βρέθηκε ότι το bortezomib μπορεί να επάγει κυτταρικό θάνατο όχι μόνο μέσω απόπτωσης αλλά και μέσω νέκρωσης. Συγκεκριμένα, επώαση με συγκεντρώσεις του bortezomib, οι οποίες δεν ξεπερνούσαν το IC<sub>50</sub> για 48h, επήγαγε εξαπλάσια αύξηση της νέκρωσης σε συνθήκες υποξίας και τετράπλασια αύξηση σε συνθήκες νορμοξίας σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control κύτταρα [648].

### 1.3.2.5.8. Αναστολή φωσφορυλίωσης της καβεολίνης-1

Σε μία μελέτη αναφέρθηκε ότι το bortezomib παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της καβεολίνης-1, στα MM κύτταρα [342]. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην κινητικότητα και μετανάστευση σε διάφορους ιστούς και για την ενεργοποίησή της απαιτείται φωσφορυλίωση. Στην ανωτέρω μελέτη, το bortezomib βρέθηκε να μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση της καβεολίνης-1 από το VEGF, μία προαγγειογενετική κυτοκίνη που συνιστά επίσης μεταγραφικό στόχο του NF-κB [37], οδηγώντας έτσι σε αναστολή της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων και της αγγειογένεσης [342].

### 1.3.2.5.9. Επίδραση στην δευτεροταγή δομή του πρωτεασώματος

Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι πολύ μικρές συγκεντρώσεις του bortezomib, πέτυχαν έντονη αναστολή της πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα MM κύτταρα, η οποία ξεπερνούσε το αναμενόμενο, εάν ληφθεί υπόψη η μικρή αναλογία ενεργών περιοχών που το bortezomib αναστέλλει. Αυτή την έντονη αναστολή οι συγγραφείς την απέδωσαν στην επαγωγή δευτεροταγών αλλαγών στη δομή του πρωτεασώματος, η οποία περαιτέρω προκαλεί παρεμπόδιση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας [343].



Εικόνα 1.10: Αναστολή του 26S πρωτεασώματος από το bortezomib [319].

Πίνακας 1.5: Ενδοκυττάριοι στόχοι του bortezomib [341].

Protein	Function	Effect of bortezomib	References
IκBα	Regulates the activity of the transcription factor, NF-κB	Stabilization	Hideshima et al [15], 2001 Russo et al [16], 2001 Sunwoo et al [17], 2001 Hideshima et al [18], 2002 Tan and Waldmann [19], 2002 Ma et al [20], 2003
JNK	Phosphorylates and activates the transcription factor c-Jun	Activation	Hideshima et al [21], 2003 Chauhan et al [22], 2004 Yang et al [23], 2004
p21, p27	CDK inhibitors	Stabilization	Shah et al [24], 2001 Hideshima et al [15], 2001 Yang et al [23], 2004
p53	Transcription factor and Tumor suppressor	Stabilization	Williams and McConkey [25], 2003 Hideshima et al [21], 2003 Yang et al [23], 2004
Bid	Proapoptotic protein	Stabilization	Breitschopf et al [26], 2000
Bax	Proapoptotic protein	Stabilization	Li and Dou [27], 2000
Caveolin-1	Promotes cell migration	Inhibition of activation	Podar et al [28], 2004
gp130	Cytokine signaling receptor	Downregulation	Hideshima et al [29], 2003
DNA-PKcs	DNA repair	Cleavage	Hideshima et al [21], 2003
ATM	DNA repair	Cleavage	Hideshima et al [21], 2003

### 1.3.2.6. Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας

Η είσοδος του πρωτεασωμικού αναστολέα bortezomib και του ανοσοκατασταλτικού παράγοντα thalidomide στην κλινική πράξη παρέτεινε την ολική επιβίωση στους ΠΜ ασθενείς με ένα σημαντικό ποσοστό τους να βρίσκεται σε ύφεση για αρκετά χρόνια [347]. Παρόλα αυτά, η ανθεκτικότητα στο bortezomib και οι τοξικότητες που συνοδεύουν την πρωτεασωμική αναστολή αποτελούν σημαντικά κλινικά προβλήματα. Μελέτες έδειξαν ότι το 52% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών, στους οποίους το bortezomib χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία, δεν κατάφεραν να παρουσιάσουν καλή κλινική απάντηση στο φάρμακο, ενώ αυτή παρέμεινε χαμηλή και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους [348, 349]. Στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας περιλαμβάνονται (**Εικόνα 1.13**):

#### 1) Σημειακές μεταλλάξεις ή υπερέκφραση του PSMB5 γονιδίου:

Αρχικές μελέτες που διεξήχθησαν σε BTZ-ανθεκτικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες αναπτύχθηκαν μετά από έκθεσή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, ταυτοποίησαν μεταλλάξεις οι οποίες επηρέασαν το σχήμα της S1 περιοχής δέσμευσης της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος (που είναι υπεύθυνη για την δράση χυμοτροψίνης) [350, 351]. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις αφορούν κυρίως αντικατάστασεις αμινοξέων, όπως της Ala49 με Thr ή Val όπως έχει παρατηρηθεί σε 6 διαφορετικές μελέτες

[352-354], ενώ άλλες πρόσθετες μεταλλάξεις περιλαμβάνουν A50V, C52F, M45V, M45I, C63F και T21A [246]. Οι *Oerlemans et al.*, 2008 [355] εξέθεσαν την ανθρώπινη λευχαιμική κυτταρική σειρά THP1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις BTZ, παράγοντας κλώνους οι οποίοι ήταν 500 φορές πιο ανθεκτικοί στο φάρμακο συγκριτικά με την αρχική μητρική κυτταρική σειρά. Παρομοίως, δημιουργήθηκαν BTZ-ανθεκτικοί κλώνοι της ανθρώπινης T-λευχαιμικής κυτταρικής σειράς Jurkat. Και στις 2 περιπτώσεις γενετικές και πρωτεωμικές αναλύσεις αποκάλυψαν μία μεταλλάξη στην περιοχή δέσμευσης για το φάρμακο [354]. Παρόλα αυτά, η σημασία τους στην κλινική πράξη είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν αντίστοιχες μεταλλάξεις σε δείγματα ΠΜ ασθενών που υποτροπίασαν μετά από θεραπεία με BTZ [356]. Δύο μελέτες απέτυχαν να ανιχνεύσουν τις ίδιες PSMβ5 μεταλλάξεις στα MM κυτταρικά μοντέλα και στους ασθενείς, ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ απόκρισης των ασθενών στο BTZ και των PSMβ5 μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών [357-359]. Συγκεκριμένα, ο A108T πολυμορφισμός, ο οποίος αποτελεί τον πιο συχνά εντοπιζόμενο στις BTZ-ανθεκτικές κυτταρικές σειρές δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δείγματα των 10 ασθενών που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο BTZ καθώς ούτε και στα δείγματα των 6 ασθενών οι οποίοι ήταν αρχικά ευαίσθητοι και υποτροπίασαν πριν από την συλλογή των δειγμάτων [357-359].

Επιπλέον, αυξορύθμιση του PSMβ5 (αγρίου τύπου και/ή μεταλλαγμένο) έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στο BTZ. Υπερέκφρασή του έχει ανιχνευτεί τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικό στα MM κύτταρα τα οποία ήταν ανθεκτικά στο BTZ και στην εποξομυκίνη [360], ενώ παράλληλα έχει αναφερθεί στις BTZ-ανθεκτικές MM κυτταρικές σειρές και αυξορύθμιση των β1 και β2 υπομονάδων και του 11S ρυθμιστικού συμπλέγματος [361]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους εκτός του ΠΜ [362, 353, 355], παρόλο που οι *Oerlemans et al.* 2008 [355] δεν παρατήρησαν αυξορύθμιση του PSMβ5 σε επίπεδο mRNA, κάνοντας λόγο για πιθανό μετα-μεταγραφικό μηχανισμό. Καταστολή του PSMβ5 μεσολαβούμενη από RNAi μερικώς αποκατέστησε την BTZ ευαισθησία στα ανθεκτικά κύτταρα. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η αυξορύθμιση του PSMβ5 συμβάλει στην BTZ ανθεκτικότητα δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά φαίνεται να εμπλέκει αύξηση της δραστηριότητας χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος [362, 354]. Παρόλα αυτά, σε άλλες μελέτες δεν έχουν αναφερθεί αλλαγές στην δραστηριότητα χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος στα BTZ-ανθεκτικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το PSMβ5 [355], ενώ τα

αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα PSMβ5 παρέμειναν ως υψηλού μοριακού βάρους κυτταρικά κλάσματα, προτείνοντας ότι περίσσεια του PSMβ5 σχετίζεται είτε με το πρωτεάσωμα είτε σχηματίζει υψηλού μοριακού βάρους συσσωματώματα. Ένας θεωρητικός ρόλος της περίσσειας των υπομονάδων PSMβ5 στην επαγωγή ανθεκτικότητας είναι η εκκαθάριση του συνόλου του BTZ. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το PSMβ5 αυξορυθμίζεται φαίνεται να εμπλέκει είτε μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς είτε αλλαγές του αριθμού αντιγράφων του PSMβ5 ή της αρχιτεκτονικής του χρωμοσώματος που περιβάλλει το συγκεκριμένο γονίδιο [355, 360].

Όσον αφορά το ανοσοπρωτεάσωμα, οι *Franke et al.*, παρατήρησαν μία αύξηση του λόγου β5i/β5 στις ανθεκτικές MM κυτταρικές σειρές, αλλά καθόλου μεταβολές στις ανθεκτικές κυτταρικές σειρές οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας [363]. Σε μία άλλη μελέτη που διεξήχθη σε ανθεκτικές κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, δύο παρουσίασαν αυξορύθμιση των υπομονάδων του ανοσοπρωτεασώματος, ενώ η τρίτη δεν παρουσίασε καμία αλλαγή, δείχνοντας ότι η ρύθμιση του ανοσοπρωτεασώματος ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ανθεκτικών καρκινικών κυτταρικών σειρών [364].

## 2) Μεταβολές στην γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση στα μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης, απόπτωσης και απόκρισης στο stress.

Υψηλή έκφραση των HSPs και άλλων σαπερωνινών έχει βρεθεί να σχετίζεται με ανθεκτικότητα στο BTZ, πιθανόν μέσω αναστολής του BTZ-επαγόμενου μιτοχονδριακού αποπτωτικού σηματοδοτικού μονοπατιού. Αυξημένα επίπεδα σαπερωνινών, όπως του Hsp27 ανέστειλε την ενεργοποίηση της απόκρισης στις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο ΕΔ και την επακόλουθη απόπτωση [365-367]. Οι *Singarpure et al., 2006* [365], έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs: HSP70, HSP27, HSP90) καθώς και άλλες πρωτεΐνες με δράση σαπερωνίνης παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην ανθεκτική B-λεμφοκυτταρική σειρά SUDHL-4 συγκριτικά με την BTZ-ευαίσθητη SUDHL-6. Παρεμπόδιση του Hsp27 με antisense-Hsp27 επανέφερε τα επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ στην DHL-4 κυτταρική σειρά, ενώ αντίστοιχα εκτοπική έκφραση του αγρίου τύπου HSP27 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή ανθεκτικότητας στην ευαίσθητη DHL-6 κυτταρική σειρά [365-367]. Επίσης, συνεργική δράση παρατηρήθηκε μεταξύ του BTZ και του HSP90 αναστολέα 17-AAG σε μία BTZ-ανθεκτική MM κυτταρική σειρά καθώς και σε δείγματα ασθενών [368].

Το BTZ επήγαγε μία σημαντική αυξορύθμιση των ATF3, ATF4, ATF5, c-Jun και JunD πρωτοογκογονιδίου στην SUDHL-6 κυτταρική σειρά. Η ενεργοποίηση του JNK-1 σε απόκριση στο BTZ επιβεβαιώθηκε από την αύξηση του φωσφο-JNK1 καθώς και από την αυξημένη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του JNK, c-Jun και ATF-2 στην ευαίσθητη SUDHL-6 κυτταρική σειρά σε αντίθεση με την ανθεκτική SUDHL-4 στην οποία δεν παρατηρήθηκε παρόμοια ενεργοποίηση του JNK-1. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε 15 φορές αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα TCF-4 στην ανθεκτική SUDHL-4 κυτταρική σειρά σε σχέση με την ευαίσθητη. Το TCF-4 παίζει σημαντικό ρόλο στο Wnt μονοπάτι, το οποίο εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου, τη διαφοροποίηση και την ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι βασικά γονίδια-στόχοι του TCF-4/ $\beta$ -κατενίνης συμπλέγματος, η κυκλίνη D1 και το c-myc παρουσιάζουν αυξορύθμιση στα SUDHL-4 κύτταρα, προτείνοντας έτσι νέους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο BTZ και ταυτοποιώντας μοριακούς στόχους, ώστε να ξεπεραστεί η ανθεκτικότητα στο BTZ στις αιματολογικές κακοήθειες. Ακόμη, οι Zhou *et al.*, 2008 έδειξαν ότι οι MM κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα  $\beta$ -κατενίνης, μίας σημαντικής πρωτεΐνης του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού, είναι λιγότερο ευαίσθητες στο BTZ και συνδυαστική θεραπεία με χαμηλές δόσεις 2-methoxyestradiol, arsenic trioxide και BTZ μείωσαν την συσσώρευση της  $\beta$ -κατενίνης ενισχύοντας την ευαισθησία στο BTZ [369, 367].

Επιπροσθέτως, η IL-6 και ο IGF-1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει βρεθεί να επάγει την ανάπτυξη και την ανθεκτικότητα στο BTZ μέσω ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B μέσω των μονοπατιών Raf/MEKK1 και PI3K/Akt [370, 371]. Αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα IGF-1 και του προσδέτη του, έχουν βρεθεί αυξημένα στο ΠΜ και έχουν συσχετιστεί με την πρόοδο και την σοβαρότητα της νόσου [372-374]. Μελέτες έδειξαν αυξορύθμιση του IGF-1/IGF-1R στις BTZ-ανθεκτικές μυελωματικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες προέκυψαν μετά από συνεχόμενη έκθεση των αντίστοιχων μητρικών RPMI-8226, OPM-2, ANBL-6 και KAS-6/1 στο φάρμακο, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν PSMB5 μεταλλάξεις. Παρεμπόδιση των μορίων τελεστών του IGF-1/IGF-1R, PI3K και mTOR έδειξε να αυξάνει την ευαισθησία στο BTZ. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν μετά από καταστολή του IGF-1R με φαρμακολογικούς ή γενετικούς μηχανισμούς, προτείνοντας τον σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα συνδυάζουν το BTZ με αναστολείς του υποδοχέα IGF-1R, ώστε να αντιμετωπιστεί η ανθεκτικότητα στο BTZ [375].

Άλλες μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση του υποδοχέα τυροσινικών κινασών, c-Met στις ανθρώπινες μυελωματικές κυτταρικές σειρές, προάγοντας την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στο BTZ. Αποσιώπηση του c-Met ενίσχυσε την ευαισθησία στο BTZ στην ανθρώπινη μυελωματική κυτταρική σειρά U266, μέσω αναστολής της δραστηριότητας του Akt/mTOR μονοπατιού [376]. Οι *Kim et al., 2012* δημιούργησαν BTZ-ανθεκτικές σειρές λεμφώματος μανδύα οι οποίες χαρακτηρίζονταν από αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Akt και mTOR. Αναστολή και των 2 σηματοδοτικών μορίων με το BEZ235 ξεπέρασε την ανθεκτικότητα στο BTZ [377].

Ανάλυση με μικροσυστοιχίες αποκάλυψε ότι τα επίπεδα mRNA του Rad (Ras associated with diabetes) ήταν υψηλότερα στην BTZ-ανθεκτική Jurkat-R κυτταρική σειρά συγκριτικά με την μητρική. Αποσιώπηση του Rad ξεπέρασε την ανθεκτικότητα στο BTZ και επήγαγε την μιτοχondριακή απόπτωση μέσω τροποποίησης του Noxa/Bcl2. Λευχαιμικές κυτταρικές σειρές με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του Rad (K-563, Raji, IM-9 και Jurkat-R) παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο BTZ συγκριτικά με εκείνες με τα χαμηλότερα επίπεδα Rad (Sup-B15, JVM-2, U266 και Jurkat) [378]. Επίσης, οι *Gu et al., 2012* έδειξαν ότι η επαγωγή διαφοροποίησης σχετίζεται με ευαισθησία στο BTZ στις MM κυτταρικές σειρές, λόγω αύξησης του φόρτου εργασίας των πρωτεασωμάτων εξαιτίας της αυξημένης έκκρισης ανοσοσφαιρινών και μείωσης της πρωτεασωμικής δραστηριότητας [379].

### 3) Multi-drug resistance (MDR)

Η έξοδος του BTZ μέσω του μεταφορέα P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gr) έχει βρεθεί να σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας στο φάρμακο, συνιστώντας πιθανόν έναν λιγότερο σημαντικό μηχανισμό αντίστασης. Η λεμφοειδής κυτταρική σειρά CEM/VLB βρέθηκε να παρουσιάζει υπερέκφραση του P-gr, συμβάλλοντας στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο carfilzomib (114-φορές) και μικρότερης στο BTZ (4.5 φορές) [380]. Οι *Minderman et al., 2007* έδειξαν ότι ανάμεσα στις LRP και P-gr, μόνο η P-gr βρέθηκε να εμπλέκεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ (2-φορές) [381], ενώ οι *Rumpold et al., 2007* έδειξαν ότι αποσιώπηση του MDR1 επανευαισθητοποίησε τα λευχαιμικά κύτταρα στο BTZ [382].

### 4) Ανθεκτικότητα στην απόπτωση και αυτοφαγία:

Ο παράγοντας Myeloid-cell leukemia-1 (Mcl-1), μέλος της προ-αποπτωτικής Bcl-2 οικογένειας έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη ρύθμιση της ευαισθησίας στο BTZ [383, 384].



Υπερέκφρασή του αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του ΠΜ και φαίνεται να εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα στο BTZ, δρώντας κυρίως μέσω παρεμπόδισης της ενεργότητας των προαποπρωτικών μορίων που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και στην επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών-9 και -3 [385, 386].

Η αυτοφαγία, μία διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα καταβολίζουν οργανίδια και άλλα κυτταροπλασματικά συστατικά βρέθηκε να σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση και την ανθεκτικότητα στο BTZ. Τα BTZ-ανθεκτικά κύτταρα έδειξαν να παρουσιάζουν 4 φορές υψηλότερα επίπεδα αυτοφαγίας συγκριτικά με τα ευαίσθητα, ενώ συνδυασμός του hydroxychloroquine, ενός παράγοντα έναντι της μαλάριας και αναστολέα της αυτοφαγίας μαζί με αναστολείς απακετυλασών ιστονών (HDAC) και του bcl-2 αναστολέα ABT737 ενίσχυσαν την δραστικότητα του BTZ [387]. Έως τώρα μόνο μία κλινική μελέτη έχει διεξαχθεί στους υποτροπιάζοντες ΠΜ ασθενείς, δοκιμάζοντας τον συνδυασμό του hydroxychloroquine με BTZ, και το 28% των ασθενών παρουσίασε ανταπόκριση στη θεραπεία [388]. Παρόλα αυτά, τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη σχετικά με την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού δεν ήταν ασφαλή και απαιτούνται επιπλέον μελέτες, ώστε να επιτευχθεί μία πιο βελτιωμένη θεραπεία [356].

5) Aggresome (Συσσωμάτωμα):

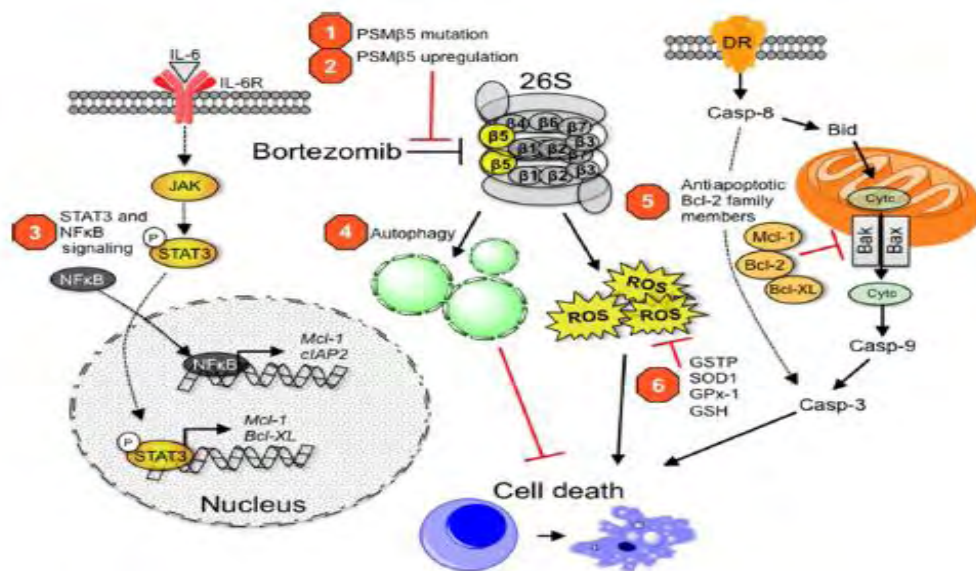
Ο σχηματισμός του συσσωματώματος που έχει ως ρόλο του την μεσολαβούμενη από την αυτοφαγία αποικοδόμηση των ουβικουϊτινωμένων μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών είναι ένας εναλλακτικός μηχανισμός που επιτρέπει στα κύτταρα να επιβιώσουν κάτω από συνθήκες αναστολής του πρωτεασώματος. Οι αναστολείς HDAC αποτρέπουν τον σχηματισμό των συσσωματωμάτων, παρουσιάζοντας συνεργική δράση με το BTZ ενισχύοντας την ευαισθησία των κυττάρων στον πρωτεασωμικό αναστολέα [389, 390]. Κλινικές μελέτες φάσεως I και II με τους HDAC αναστολείς vorinostat και panobinostat έδειξαν σημαντικές αποκρίσεις ακόμη και των ανθεκτικών στο BTZ ασθενών [391-393].

6) Πρόσθετοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας:

Η αυξημένη έκκριση των αντισωμάτων από τα MM κύτταρα αποτελεί βασικό παράγοντα που επηρεάζει την ευαισθησία τους στην πρωτεασωμική αναστολή. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι BTZ-ανθεκτικές κυτταρικές σειρές εκκρίνουν λιγότερα επίπεδα ανοσοσφαιρινών από τις ευαίσθητες [394]. Επίσης, οι BTZ-ευαίσθητες σειρές έχει βρεθεί να είναι CD93 και CD69 θετικές συγκριτικά με τις ανθεκτικές που είναι CD93 και CD69 αρνητικές. Ακόμη, η LPS-επαγόμενη ωρίμανση των πλασματοκυττάρων

επανευαισθητοποίησε τα BTZ-ανθεκτικά κύτταρα, μέσω αύξησης της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών και της έκφρασης των CD93 και CD69 δεικτών [395]. Η έκφραση του CD93 έχει αποτελέσει και βασικό βιοδείκτη της εξέλιξης των ΠΜ ασθενών [395].

Μία πρόσφατη έρευνα υποστηρίζει τον κύριο ρόλο της ωρίμανσης των πλασματοκυττάρων στην ανθεκτικότητα στο BTZ [396]. Χρησιμοποιώντας δείγματα ΠΜ ασθενών, οι συγγραφείς έδειξαν ότι το Xbp1s, ένας μεσολαβητής του UPR και της ωρίμανσης των πλασματοκυττάρων, εμπλέκεται στην εμφάνιση κλινικής ανθεκτικότητας στο BTZ. Η σηματοδότηση μέσω του Xbp1s που είναι απαραίτητη για την *in vitro* τοξικότητα του BTZ, βρέθηκε να καταστέλλεται στα BTZ-ανθεκτικά πρωτογενή κύτταρα [397] και τα επίπεδα του να σχετίζονται με την εξέλιξη του ΠΜ [398]. Τα Xbp1s αρνητικά κύτταρα τα οποία αντιστοιχούν στα MM B-κύτταρα ή στους προ-πλασμαβλάστες βρέθηκε να αυξάνονται σε αριθμό στα BTZ-ανθεκτικά δείγματα, επιβιώνοντας από την τοξική δράση του φαρμάκου. Ένας μικροπληθυσμός των Xbp1s αρνητικών κυττάρων εκφράζουν μικρότερα επίπεδα ανοσοσφαιρινών και των UPR δεικτών, οδηγώντας σε μειωμένο ER-stress και σε μικρότερη εξάρτηση από το UPR μονοπάτι συγκριτικά με τα Xbp1s θετικά πλασματοκύτταρα [396]. Δύο μεταλλάξεις στο Xbp1s ανιχνεύθηκαν σε 20 δείγματα ασθενών, οι οποίες δεν συνοδεύονταν από αντίστοιχες στο PSMB5 [399].



**Εικόνα 1.13:** Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στο BTZ [356].

### 1.3.2.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας

Οι κυριότερες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στο BTZ αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω (**Εικόνα 1.15**).

1. Δεύτερης γενιάς πρωτεασωμικοί αναστολείς

Το BTZ έδωσε την ώθηση για τον σχεδιασμό νέων πρωτεασωμικών αναστολέων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από αυξημένη δεσμευτική συγγένεια για τις πρωτεασωμικές υπομονάδες, καλύτερες φαρμακευτικές ιδιότητες και λιγότερες παρενέργειες, με σκοπό τη βελτίωση της κλινικής αποτελεσματικότητας και τη μείωση της τοξικότητας (**Εικόνα 1.14**).

➤ **Carfilzomib (PR-171/Kyprolis<sup>®</sup>)**: Αποτελεί έναν μη αναστρέψιμο πρωτεασωμικό αναστολέα εποξυκετόνης με υψηλότερη εξειδίκευση για την δράση χυμοτροψίνης της β5 υπομονάδας συγκριτικά με το BTZ. Στις κυτταροκαλλιέργειες βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλότερη κυτταροτοξικότητα συγκριτικά με το BTZ με τις κυτταρικές σειρές αιματολογικών κακοηθειών να είναι πιο ευαίσθητες στην έκθεσή του σε σχέση με εκείνες των συμπαγών όγκων και των μη μετασχηματισμένων κυττάρων. Η δράση του φαίνεται να περιλαμβάνει συσσώρευση των πρωτεασωμικών υποστρωμάτων, σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Η αναστολή του πρωτεασώματος βρέθηκε να διαρκεί περισσότερο με τον συγκεκριμένο παράγοντα, συγκριτικά με το BTZ, λόγω της ισοσθενούς δέσμευσής του με την πρωτεΐνη-στόχο και η εποξυκετόνη είναι εξειδικευμένη για τα NH<sub>2</sub>-τελικά κατάλοιπα Thr που είναι υπεύθυνα για την ενζυμική δραστηριότητα σε κάθε μία από τις πρωτεολυτικές ενεργές περιοχές του πρωτεασώματος [255]. Το 2012 βάσει των υποσχόμενων αποτελεσμάτων της φάσεως II μελέτης που έδειξε 23.7% ποσοστό ανταπόκρισης, μέση διάρκεια απόκρισης τους 7.8 μήνες και μέση ολική επιβίωση τους 15.6 μήνες, το carfilzomib έλαβε FDA έγκριση για τη θεραπεία του επιδεινούμενου ΠΜ, μετά από τουλάχιστον 2 θεραπείες που περιλαμβάνουν BTZ και έναν ανοσοτροποποιητικό παράγοντα [400]. Υψηλότερες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν όταν το carfilzomib χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τους lenalidomide και low-dose dexamethasone [401, 402], ενώ φάσεως III μελέτες βρίσκονται εν εξελίξει [284, 247].

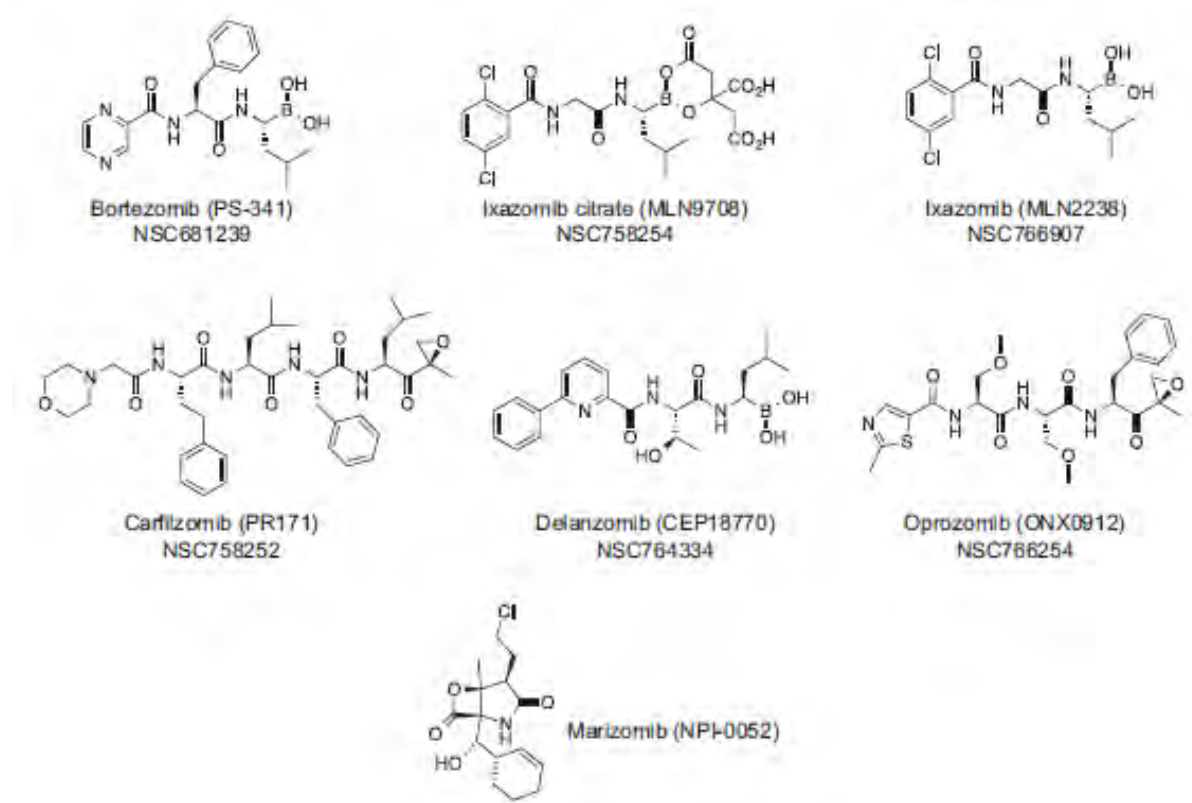
➤ **Marizomib (NPI-0052, Salinosporamide A)**: Πρόκειται για έναν φυσικό μη πεπτιδικό γ-λακταμ-β-λακτόνη δικυκλικό μη αναστρέψιμο πρωτεασωμικό αναστολέα που αναστέλλει και τις 3 δράσεις πρωτεασών [403, 404]. Χορηγείται 2 φορές την εβδομάδα ενδοφλεβίως και η δράση του προς το παρόν μελετάται σε φάσεως Ib μελέτες στο ΠΜ,

στους συμπαγείς όγκους, στο λέμφωμα και στην λευχαιμία. Το Marizomib έχει βρεθεί να παρουσιάζει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (<5 λεπτά) και μεγάλη ιστική κατανομή (διαπερνά και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό), ενώ μελέτες σε ασθενείς με BTZ-επιδεινούμενο ΠΜ έδειξαν σημαντικές αποκρίσεις [405].

➤ **Ixazomib (MLN9708/MLN2238):** Αποτελεί τον πρώτο per os αναστρέψιμο βιοδραστικό πρωτεασωμικό αναστολέα βορονικού οξέος, του οποίου η δράση μελετάται στη θεραπεία του ΠΜ [406]. Βρέθηκε να αναστέλλει την δράση χυμοτρυψίνης στα MM κύτταρα και να επάγει τη συσσώρευση ουβικουΐτινωμένων πρωτεϊνών, ενώ στα ανθεκτικά σε κοινούς ΧΜΘ παράγοντες και στο BTZ MM κύτταρα προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση, χωρίς να επηρεάζει την βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων. Ανοσοφθορισμός των MM xenografts έδειξε αναστολή της ανάπτυξης, απόπτωση και μειωμένη αγγειογένεση, ενώ σε συνδυασμό με lenalidomide, vorinostat ή dexamethasone αυξήθηκε η κυτταροτοξικότητα και η αντικαρκινική δράση [406]. Φάσεως I και II μελέτες έδειξαν καλή κλινική αποτελεσματικότητα σε ΠΜ ασθενείς με υποτροπιάζον και /ή επιδεινούμενο ΠΜ, με σποραδική περιφερική νευροπάθεια [406, 407]. Τώρα βρίσκονται εν εξελίξει μελέτες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητά του στο υποτροπιάζον ΠΜ, σε προχωρημένου σταδίου συμπαγείς όγκους, στη λεμφοβλαστική λευχαιμία, στο non-Hodgkin's λέμφωμα και στην AL αμυλοείδωση [408], ενώ μελετάται και ως θεραπεία συντήρησης στο ΠΜ [247].

➤ **Oprozomib (ONX0912, PR-047):** Πρόκειται για ένα αναστρέψιμο per os τριπεπτίδιο εποξυκετόνης ανάλογο του carfilzomib. Βρέθηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη και να επάγει την απόπτωση σε MM κύτταρα ανθεκτικά στους κοινούς ΧΜΘ παράγοντες και στο BTZ και η κυτταροτοξικότητά του οφείλεται στην ταυτόχρονη ενεργοποίηση των κασπασών-8, -9, και -3 και της poly(ADP) πολυμεράσης της ριβόζης. Ακόμη, μελέτες έδειξαν ότι αναστέλλει την μετανάστευση των MM κυττάρων και όπως το BTZ δρα μέσω παρεμπόδισης της δράσης χυμοτρυψίνης. Σε κλινικά επιτεύξιμες συγκεντρώσεις, το oprzomib και το carfilzomib ανέστειλαν την δράση των οστεοκλαστών και την οστική επαναρόφηση ενισχύοντας την οστεογενική διαφοροποίηση [255]. Το βέλτιστο ανεκτό δοσολογικό σχήμα του oprzomib εξετάζεται σε εν εξελίξει κλινικές μελέτες φάσεως I και II σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες (συμπεριλαμβανομένου του ΠΜ) και με συμπαγείς όγκους [247].

➤ **Delanzomib (CEP-18770):** Αποτελεί έναν αναστρέψιμο βορονικού οξέος πρωτεασωμικό αναστολέα της δράσης χυμοτρυψίνης που οδηγεί σε μείωση της δράσης του NF-κΒ και των τελεστών του. Έχει βρεθεί να επάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στις MM κυτταρικές σειρές και στα CD-138 πρωτογενή MM κύτταρα, ενώ έχει παρουσιάσει αντι-αγγειογενετική δράση και καταστολή της RANKL οστεοκλαστογένεσης [255]. Η χορήγησή του μπορεί να επιτευχθεί και per os και ενδοφλέβια, παρουσιάζοντας ανασταλτική δράση παρόμοια με εκείνη του BTZ στους αιματολογικούς και συμπαγείς όγκους καθώς και στα πρωτογενή κύτταρα των ΠΜ ασθενών [247]. Εν εξελίξει βρίσκονται κλινικές μελέτες φάσεως I και II στο ΠΜ, λέμφωμα και συμπαγείς όγκους [409].



**Εικόνα 1.14:** Χημική δόμη των πρωτεασωμικών αναστολέων [255].

## 2. Αναστολείς ανοσοπρωτεασώματος

Ο εξειδικευμένος αναστολέας IPSI-001 αναστέλλει την 20S δραστικότητα του ανοσοπρωτεασώματος (κύριως μέσω δέσμευσης στην β1i υπομονάδα), καταστέλλοντας

τον πολλαπλασιασμό και επάγοντας απόπτωση στις MM κυτταρικές σειρές καθώς και στα δείγματα ασθενών [410]. Επίσης, βρέθηκε να ξεπερνά την ανθεκτικότητα στους κοινούς ΧΜΘ παράγοντες και στο BTZ [411]. Δύο άλλοι αναστολείς εποξυκετόνης, οι ONX-0914 και PR-924 μη αναστρέψιμα αναστέλλουν την β5i υπομονάδα με τον ONX-0914 να είναι 20-40 φορές πιο εξειδικευμένος για την β5i υπομονάδα συγκριτικά με τις β5 και β1i υπομονάδες [412].

### 3. Αναστολείς των E3 ενζύμων

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το HDM2, η E3 λιγάση που ρυθμίζει την αποικοδόμηση του p53 [413]. Αναστολή του HDM2 είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του p53 και την αυξημένη έκφραση του γονιδίου-στόχου του p21, οδηγώντας στην σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το αγρίου-τύπου p53, αλλά όχι σε εκείνα με το μεταλλαγμένο p53 [414]. Προς το παρόν βρίσκονται σε φάσεως I μελέτες τουλάχιστον 7 HDM2 αναστολείς, οι οποίοι περιλαμβάνουν μη πεπτιδικά μικρά μόρια και τις nutlins, μία ομάδα cis-ιμιδιζαλονικών αναλόγων [415, 416]. Ακόμη, τα IAPs (Inhibitors of Apoptosis) συνιστούν μία ομάδα E3 λιγασών, που περιλαμβάνουν τα XIAP, cIAP1, cIAP2 και ML-IAP και είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της απόπτωσης. Μιμητικά μόρια του Smac (Second-Mitochondria-Derived Activator of Caspases. DIABLO), μίας IAP-δεσμευτικής πρωτεΐνης που ρυθμίζει τα επίπεδα και τη δράση των IAPs, μέσω επαγωγής της αυτοουβικουϊτινώσεως και επακόλουθης αποικοδόμησης καθώς και τα IAP antisense μόρια εξετάζονται προς το παρόν σε μελέτες φάσεως I/II [416].

### 4. Αναστολείς του 19S πρωτεασώματος και των αποουβικουϊτινασών

Οι ubistatinA και ubistatinB συνιστούν 2 μικρά μόρια που διαταράσσουν την αναγνώριση του υποστρώματος από την 19S ρυθμιστική υπομονάδα, στοχεύοντας στην ουβικουϊτίνη-ουβικουϊτίνη διεπιφάνεια των K48-αλυσίδων, η οποία αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς ουβικουϊτίνης του πρωτεασώματος [417]. Επίσης, οι αποουβικουϊτινάσες αποτελούν έναν εναλλακτικό πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο, ο οποίος έχει περιγραφεί αναλυτικά στην ενότητα 1.2.4.

### 5. Αλλοστερικοί πρωτεασωμικοί αναστολείς

Πρωτεασωμικοί αναστολείς που δεσμεύονται εξωτερικά των ενεργών θέσεων ίσως αποτελούν σημαντικές θεραπευτικές στρατηγικές με σκοπό να ξεπεραστεί η ανθεκτικότητα

στο BTZ. Προς το παρόν, έχουν αναπτυχθεί πεπτιδικοί (PR-39) και χημικοί (Chloroquine, 5-amino-hydroxyquinoline/5AHQ, Clloquinol) αλλοστερικοί αναστολείς του πρωτεασώματος, οι οποίοι εξετάζονται *in vitro* και/ή *in vivo*, αλλά δεν έχουν ακόμη προχωρήσει σε κλινικές μελέτες [201].

#### 6. Οξειδοαναγωγή

Η αυξημένη έκκριση ανοσοσφαιρινών στα MM κύτταρα συνιστά μία διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξειδωτικού stress, ως παραπροϊόν. Ένα πλασματοκύτταρο είναι ικανό για την σύνθεση χιλιάδων Ig μορίων/sec, δηλ. ~100,000 δισουλφιδικών δεσμών/sec. Το μοριακό οξυγόνο χρησιμεύει ως δέκτης των ηλεκτρονίων για κάθε δισουλφιδικό δεσμό που σχηματίζεται, οδηγώντας στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) [356]. Για την σταθεροποίηση των αυξημένων ROS, τα κύτταρα αυξάνουν την παραγωγή αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όπως της γλουταθειόνης (GSH) [418]. Τα BTZ-ανθεκτικά MM κύτταρα βρέθηκε να υπερεκφράζουν σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD ή SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx-1), του GSH και του N-acetyl-cysteine (NAC) [419]. Επίσης, υπερέκφραση του φάσεως II αποτοξίνωσης ενζύμου glutathione S-transferase-pi (GSTP) βρέθηκε σε >80% των ΠΜ και MGUS ασθενών [420, 421], ενώ αναστολή του έδειξε να ενισχύει τη δράση του BTZ [422]. Πολλοί παράγοντες είναι προς το παρόν σε προκλινική ανάπτυξη ή χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πράξη, συμπεριλαμβανομένων των GSTP-ενεργοποιημένου προφαρμάκου TLK286 (canfosfamide, Telcyta), των νιτρικού οξέος (NO)-παραγόμενων προφαρμάκων JS-K, PABA/NO και μιμητικά του GSH (GSSG), όπως το NOV-002 και ο χηλωτής μετάλλων disulfiram (Antabuse®) [356]. Άλλες ομάδες προοξειδωτικών ΧΜΘ παραγόντων περιλαμβάνουν τα παράγωγα θειόλης, όπως το arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), το οποίο έλαβε έγκριση για τη θεραπεία της οξείας προμυελοτικής λευχαιμίας [423], ενώ έχει βρεθεί να παρουσιάζει συνεργική δράση με το BTZ στο ΠΜ και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες [424].

#### 7. IL-/STAT3 σηματοδότηση

Το μονοκλωνικό αντίσωμα CNTO328 (siltuximab) έναντι του IL-6 σηματοδοτικού μονοπατιού παρεμπόδισε την δραστηριότητα του STAT3 και ενίσχυσε την ευαισθησία στο BTZ στα MM κύτταρα [425], αλλά συνδυασμός του με το BTZ δεν φάνηκε να δίνει υποσχόμενα αποτελέσματα στις κλινικές μελέτες. Παρομοίως, το sorafenib (Nexavar®), ένας αναστολέας της Raf κινάσης βρέθηκε να αναστέλλει την φωσφορυλίωση του STAT3

με ταυτόχρονη μειорύθμιση του Mcl-1 στα MM κύτταρα [426] αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά, όπως φάνηκε από 2 φάσεως I/II μελέτες [427, 428].

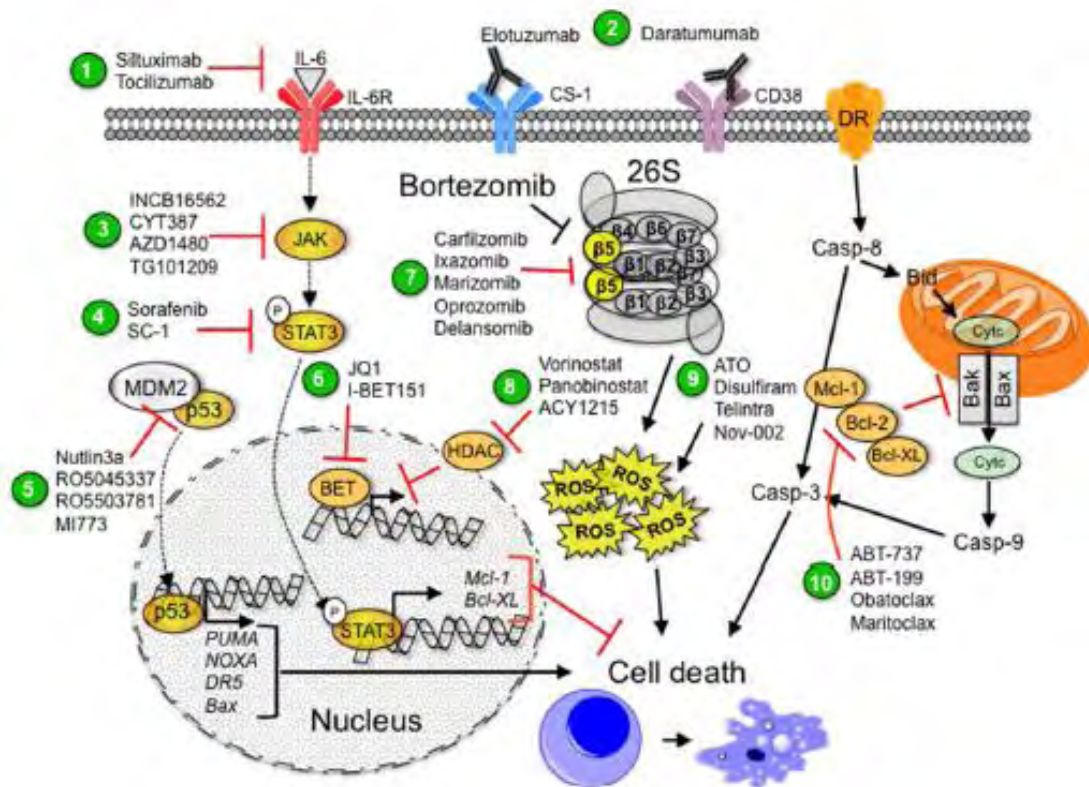
#### 8. Μονοκλωνικά αντισώματα

Το anti-CD38 MAb, daratumumab, έλαβε πρόσφατα από το FDA Breakthrough Therapy Designation για το ΠΜ, το οποίο είναι επιδεινούμενο σε έναν PI και IMiD. Το CD38 που συνιστά μία επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη με ενεργότητα κυκλικής ADP ριβόζης υδρολάσης βρέθηκε να υπερεκφράζεται κυρίως στα MM κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και τους αιμοποιητικούς προγενήτορες, οι οποίοι δεν το εκφράζουν [429]. Ο συγκεκριμένος παράγοντας δρα μέσω αντίσωμα-εξαρτώμενης κυτταρο μεσολαβούμενης κυτοτοξικότητας (ADCC) και της εξαρτώμενης από το συμπλήρωμα κυτοτοξικότητας, ενώ έχει δείχτει να ενισχύει τη δράση των υπάρχουσών ΠΜ θεραπειών, συμπεριλαμβανομένου και του BTZ [430]. Επίσης, το anti-CS1 MAb, elotuzumab, αποτελεί έναν νέο παράγοντα για τη θεραπεία του ΠΜ, παρουσιάζοντας θετικά αποτελέσματα στις κλινικές μελέτες και μόνο του και σε συνδυασμό με άλλους ΧΜΘ παράγοντες, όπως το BTZ [431].

#### 9. Επιγενετικοί τροποποιητές

Τα μέλη της BET οικογένειας (BRD2, BRD3, BRD4 και BRDT) που εμπλέκονται στις φάσεις έναρξης και επιμήκυνσης της μεταγραφής μέσω δέσμευσης στα ακετυλιωμένα κατάλοιπα Lys της ενεργοποιημένης χρωματίνης, αποτελούν μία νέα ομάδα επιγενετικών φαρμακευτικών στόχων [356]. Οι αναστολείς των BET, όπως το JQ1 βρέθηκε να καταστέλλει την έκφραση και τη δράση του c-Myc, ενός από τα πιο απορρυθμισμένα ογκογονίδια στο ΠΜ [432, 433]. Δύο μελέτες υποστηρίζουν την χρήση των BET αναστολέων σε συνδυασμό με το BTZ για την θεραπεία του BTZ-επιδεινούμενου ΠΜ [434, 435]. Ακόμη, οι HDAC αναστολείς επάγουν την ακετυλίωση των ιστονών, επηρεάζοντας την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην επιβίωση, τον πολ/σμό, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και τον μεταβολισμό, ενώ έχει βρεθεί να είναι σημαντικοί αντι-MM παράγοντες ενισχύοντας τη δράση του BTZ [356]. Πρόσφατα το panobinostat έλαβε έγκριση από το FDA, βάσει μελετών που έδειξαν βελτίωση του PFS [356].





Εικόνα 1.15: Θεραπευτικοί παράγοντες που αυξάνουν την ευαισθησία στο BTZ [356].

## 1.4. ΟΔΟΣ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

### 1.4.1. Γενική επισκόπηση

Τα νευροπεπτίδια (Neuropeptides, NPs) παράγονται και εκκρίνονται από τα νευροενδοκρινή κύτταρα και τους νευρώνες και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η διαβίβαση και/ή μεσολάβηση ορμονικών σημάτων σε συγκεκριμένους ιστούς και κύτταρα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν διάφορα ενεργά ενδογενή πεπτίδια, όπως τα οπιούχα πενταπεπτίδια Met- και Leu-εγκεφαλίνη, η ουσία P, η βραδυκίνη, η αγγειοτενσίνη 1 και 2, η ενδοθελίνη 1 και πεπτίδια τύπου βομβεσίνης [436, 437].

Τα συγκεκριμένα μικρά βιοενεργά πεπτίδια μαζί με τους GPCR υποδοχείς τους έχει βρεθεί επίσης να εμπλέκονται με ένα αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο σε διάφορους επιθηλιακούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του πνεύμονα, του

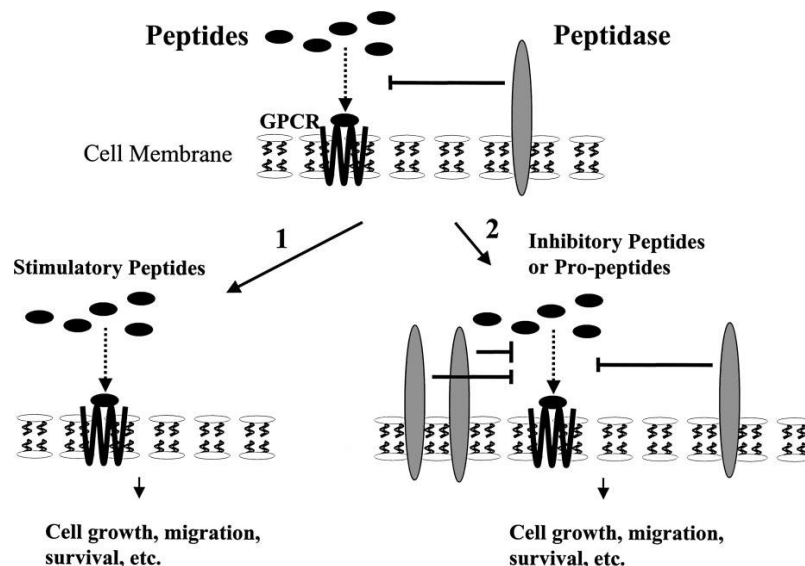
παχέως εντέρου, του μαστού, του παγκρέατος και του προστάτη, επάγοντας τον πολ/σμό των καρκινικών κυττάρων και την μετάσταση, ενεργοποιώντας την σύνθεση κοινών δεύτερων μεταβιβαστών αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια φωσφορυλίωσης των τυροσινών [438-440].

Οι πεπτιδάσες της κυτταρικής επιφάνειας συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυσιολογικών κυττάρων, ρυθμίζοντας την πρόσβαση των πεπτιδίων στους μεμβρανικούς υποδοχείς τους. Πάνω από 25 πεπτιδάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και ιστούς, μεταξύ των οποίων είναι: η angiotensin-converting-enzyme, aminopeptidase A, aminopeptidase N (CD13) dipeptidyl peptidase IV (CD26), neprin A και η neutral endopeptidase (CD10) [441]. Πρόκειται για μεμβρανικές πρωτεΐνες με το καταλυτικό τους κέντρο εκτεθειμένο στην εξωκυττάρια επιφάνεια και την NH<sub>2</sub>- ή COOH- τελική επικράτεια εντοπισμένη ενδοκυττάρια, ενώ πολλές από αυτές έχουν βρεθεί στα εξωκυττάρια υγρά ως διαλυτές ισομορφές, παρόλο που οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τον εντοπισμό τους στην κυτταρική επιφάνεια δεν είναι πλήρως γνωστοί [442].

Μεταξύ αυτών, η νευροπεπτιδάση (NEP/CD10), μία μεταλλο-ενδοπεπτιδάση ψευδάργυρου τύπου θερμολυσίνης της οικογένειας M13 πεπτιδασών, που εκφράζεται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του προστάτη, διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια μήκους έως και 30 αμινοξέων στην αμινική πλευρά των υδρόφοβων αμινοξέων τους, ιδιαίτερος σε θέσεις Phe ή Tyr, υδρολύοντας και απενεργοποιώντας τα νευροπτίδια που αναφέρθηκαν ανωτέρω. Με αυτόν τον τρόπο, η NEP μειώνει την τοπική συγκέντρωση νευροπεπτιδίων που είναι διαθέσιμα για σύνδεση με τον υποδοχέα και την επαγωγή μηνύματος νευροπεπτιδίου μέσω της σύνδεσής του με τον υποδοχέα της πρωτεΐνης G. Έτσι, λειτουργεί σε διάφορα συστήματα οργάνων για να μειώσει την ανταπόκριση σε αυτές τις πεπτιδικές ορμόνες (436, 437). Εκτός από την ενζυμική δράση της, η NEP αναστέλλει την φωσφορυλίωση της FAK κινάσης και την κυτταρική μετανάστευση μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της κυτταροπλασματικής περιοχής της με τις κινάσες Lyn και PI3-K [443].

Δύο είναι κυρίως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πεπτιδάσες έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στην καρκινική διαδικασία. Ο πρώτος αφορά την απώλεια της λειτουργίας/έκφρασής τους, που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσβαση των πεπτιδίων στους GPCRs, επάγοντας την κυτταρική ανάπτυξη, την επιθετικότητα, την κυτταρική

μετανάστευση και την κυτταρική επιβίωση, σήματα τα οποία συμβάλλουν στον καρκινικό φαινότυπο. Από την άλλη, υπερέκφραση των πεπτιδάσων μπορεί να συμβάλλει στην απενεργοποίηση ανασταλτικών πεπτιδίων ή σε ενεργοποίηση ενός βιοδραστικού πεπτιδίου, μέσω απελευθέρωσης της βιολογικά ενεργής μορφής του από ένα προπεπτίδιο (Εικόνα 1.16) [442].



**Εικόνα 1.16:** Μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πεπτιδάσες της κυτταρικής επιφάνειας εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκινικού φαινοτύπου [442].

## 1.4.2. Άξονας Ενδοθηλίνης-1 (ET-1 Axis)

### 1.4.2.1. Ενδοθηλίνες: Φυσιολογικός ρόλος, σύνθεση, ρύθμιση και υποδοχείς τους

Ο άξονας της ενδοθηλίνης (ET axis) συνίσταται από μία οικογένεια 3 μικρών πεπτιδίων μεγέθους 21-αα, ET-1, ET-2 και ET-3, τα οποία έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο σε διάφορους ιστούς, ρυθμίζοντας την αγγειοσύσπαση, την διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή ορμονών. Οι ενδοθηλίνες ασκούν τη δράση τους μέσω δέσμευσής τους στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, ETA (ET<sub>A</sub>R) και ETB (ET<sub>B</sub>R) που ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs υποδοχέων (G-protein coupled receptors). Ο ETB δεσμεύει και τα 3 πεπτίδια με την ίδια συγγένεια, ενώ ο ETA την ET-1 με μεγαλύτερη συγγένεια από τις υπολοιπες ισομορφές [444-446] (Εικόνα 1.17).

Η ενδοθηλίνη-2 παράγεται κυρίως από τους νεφρούς και το έντερο, ενώ μικρότερες ποσότητες από το μυοκάρδιο, τον πλακούντα και τη μήτρα. Σε αντίθεση με την ET-1 δεν παρουσιάζει μοναδικές φυσιολογικές δράσεις. Η ET-3, όπως και η ET-1, εντοπίζεται στο πλάσμα, αλλά η προέλευσή της δεν είναι πλήρως γνωστή. Απαντά στον γαστρεντερικό σωλήνα, στους πνεύμονες και στους νεφρούς και σε υψηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο [447], ενώ ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες στους νευρώνες και στα αστροκύτταρα, όπως την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό.

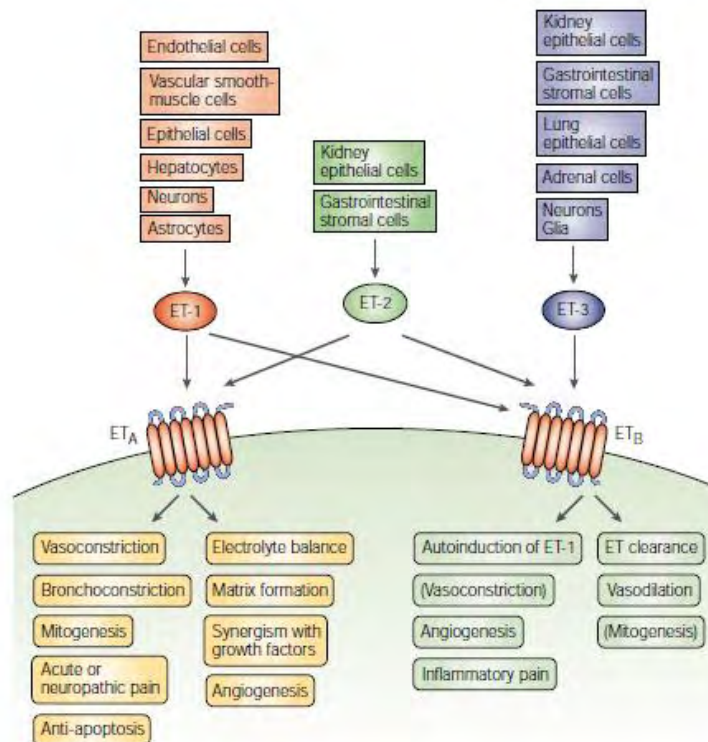
Η ET-1 παράγεται από μία ποικιλία φυσιολογικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων και των αστροκυττάρων στο ΚΝΣ, των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και από διάφορους επιθηλιακούς ιστούς, όπως των βρόγχων, του ενδομητρίου, του μαστού, του προστάτη, του νεφρού και του ήπατος και δρα ως μιτογόνος παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και των βρόγχων, τους ινοβλάστες, τα μεσαγλοιακά κύτταρα, τους οστεοβλάστες, τα μελανοκύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου. Η μιτογόνος δράση της ενισχύεται από τις συνεργικές αλληλεπιδράσεις με άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (b-FGF), της ινσουλίνης, του IGF, του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF), και της IL-6 [448].

Οι ET-1, ET-2 και ET-3 που χαρακτηρίζονται από μία α-έλικα και 2 δισουλφιδικούς δεσμούς στις θέσεις Cys3-Cys11 και Cys1-Cys15 [449], κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια (*EDN1*, *EDN2*, *EDN3*) που ρυθμίζονται στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το *EDN1* με μέγεθος 6.8 kb το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 αποτελούμενο από 5 εξόνια κωδικοποιεί το πρόδρομο μόριο pre-pro-ET-1 και φαίνεται να ρυθμίζεται κυρίως στο μεταγραφικό επίπεδο καθώς επάγεται από 20 διαφορετικά σήματα (φορβολικοί εστέρες, θρομβίνη, αγγειοτενσίνη II και ινσουλίνη) που το καθένα δρα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους και ιστούς και ρυθμίζεται από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες [450]. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του TATA-box προαγωγέα, ενώ σε διπλανό σημείο έχει ταυτοποιηθεί μία θέση της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης 1, η οποία συνιστά σημείο δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων FOS και JUN. Άλλα ρυθμιστικά στοιχεία περιλαμβάνουν θέσεις δέσμευσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας GATA, τους TGF-β-activated SMAD μεταγραφικούς παράγοντες και τον hypoxia-inducible factor 1 (HIF1),

ενώ επίσης σε πιο μακρινές θέσεις από τον προαγωγέα του *EDNI* εντοπίζονται στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες (που ενεργοποιούνται από στεροειδείς ορμόνες ή ανόργανα κορτικοειδή), θέση δέσμευσης του παράγοντα NF-kb (που ενεργοποιείται από γλυκόζη, TNF- $\alpha$ , ιντερφερόνη- $\gamma$ , ιντερλευκίνη-1 $\beta$ , και άλλες κυτοκίνες), ένα μοτίβο E-box και δύο θέσεις δέσμευσης των πυρηνικών παραγόντων των ενεργοποιημένων T κυττάρων [450]. Επίσης, διάφοροι επιγενετικοί μηχανισμοί, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών θεωρούνται σημαντικοί για την ρύθμιση του *EDNI*, όπως αναφέρθηκε σε καρκινικά κύτταρα του μαστού [450, 451], ενώ πρόσφατα βρέθηκαν διάφοροι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν τη σταθερότητα του mRNA, όπως είναι η 3'-UTR περιοχή του *EDNI* mRNA που περιέχει AUUUA μοτίβα που στρατολογούν πρωτεΐνες που δεσμεύονται στα συγκεκριμένα AU-στοιχεία ρυθμίζοντας την αποικοδόμηση του RNA ή τη σταθεροποίησή του [450]. Επιπρόσθετα, το mRNA του *EDNI* έχει βρεθεί να υπόκειται σε microRNA(miRNA) ρύθμιση [452, 453].

Τα σήματα που επάγουν την σύνθεση της ET-1 περιλαμβάνουν την IL-1 $\beta$ , τον TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , τον PDGF, την βαζοπρεσίνη, την υποξία και το shear stress, ενώ στους ανασταλτικούς παράγοντες ανήκουν το NO, η προστακυκλίνη και το atrial natriuretic peptide [440]. Το αρχικό μεταφραστικό προϊόν του *EDNI* είναι το pre-pro-ET-1 με μέγεθος 212-αα, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται από μία ενδοπεπτιδάση και προκύπτει το 38-αα βιολογικά ανενεργό πρόδρομο μόριο, γνωστό ως big-ET-1. Το συγκεκριμένο προϊόν αποτελεί υπόστρωμα είτε για το endothelin-converting enzyme (ECE-1), είτε εναλλακτικά για την χυμάση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενεργού μορίου ET-1 [6 φρομ 25]. Ο μεσός χρόνος ζωής του *EDNI* mRNA είναι ~15-20 min και αντίστοιχα της ET-1 στο πλάσμα είναι ~4-7 min [454, 455].

Επίσης, δύο είναι τα μονοπάτια που έχουν περιγραφεί για την απομάκρυνση της ET-1 (clearance): **a)** η πρόσληψή της από τον υποδοχέα ETB, με επακόλουθη λυσοσωμική αποικοδόμηση και **b)** ο καταβολισμός της από την εξωκυττάρια neutral endopeptidase (NEP/CD10, EC 3.4.24.11) [456].



**Εικόνα 1.17:** Ενδοθηλίνες και οι μεσολαβούμενες από τους  $ET_A R/ET_B R$  δράσεις τους [457].

Όσον αφορά τους υποδοχείς των ενδοθηλινών, ο  $ET_A$  εκφράζεται κυρίως στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στα καρδιακά μυοκύτταρα και εμπλέκεται στις αγγειοσυσπαστικές δράσεις της  $ET-1$ . Η ενεργοποίηση του  $ET_A$  οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) η οποία με τη σειρά της επάγει τον σχηματισμό της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλογλυκερόλης (DAG), τα οποία οδηγούν σε αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων  $Ca^{+2}$ , με αποτέλεσμα την επαγωγή αγγειοσύσπασης [458]. Επίσης, η DAG και τα αυξημένα επίπεδα του  $Ca^{+2}$  επάγουν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία είναι υπεύθυνη για τις μιτογόνες δράσεις της  $ET-1$  [459]. Από την άλλη, ο υποδοχέας  $ET_B$  εντοπίζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και τα σηματοδοτικά μόρια που ενεργοποιούνται είναι παρόμοια με εκείνα που αναφέρθηκαν για τον  $ET_A$ . Παρόλα αυτά, ο  $ET_B$  δεσμεύεται και σε ανασταλτικές  $G_i$  πρωτεΐνες, οι οποίες σε ορισμένα κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν σε αναστολή της παραγωγής του cAMP και της ενεργοποίησης του  $Na^+-H^+$  ανιμεταφορέα [460, 461]. Δέσμευση της  $ET-3$  με τον  $ET_B$  προκαλεί χάλαση των αγγείων, η οποία

επάγεται από την αυξημένη παραγωγή του NO και των προστακυκλινών και από την ενεργοποίηση των καναλιών καλίου [462, 463]. Ακόμη, ο άξονας ET-3/ETB είναι απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη των επιδερμικών μελανοκυττάρων και των γαγγλιακών νευρικών κυττάρων του εντέρου [464].

#### 1.4.2.2. Η σηματοδότηση της ET-1 στον καρκίνο

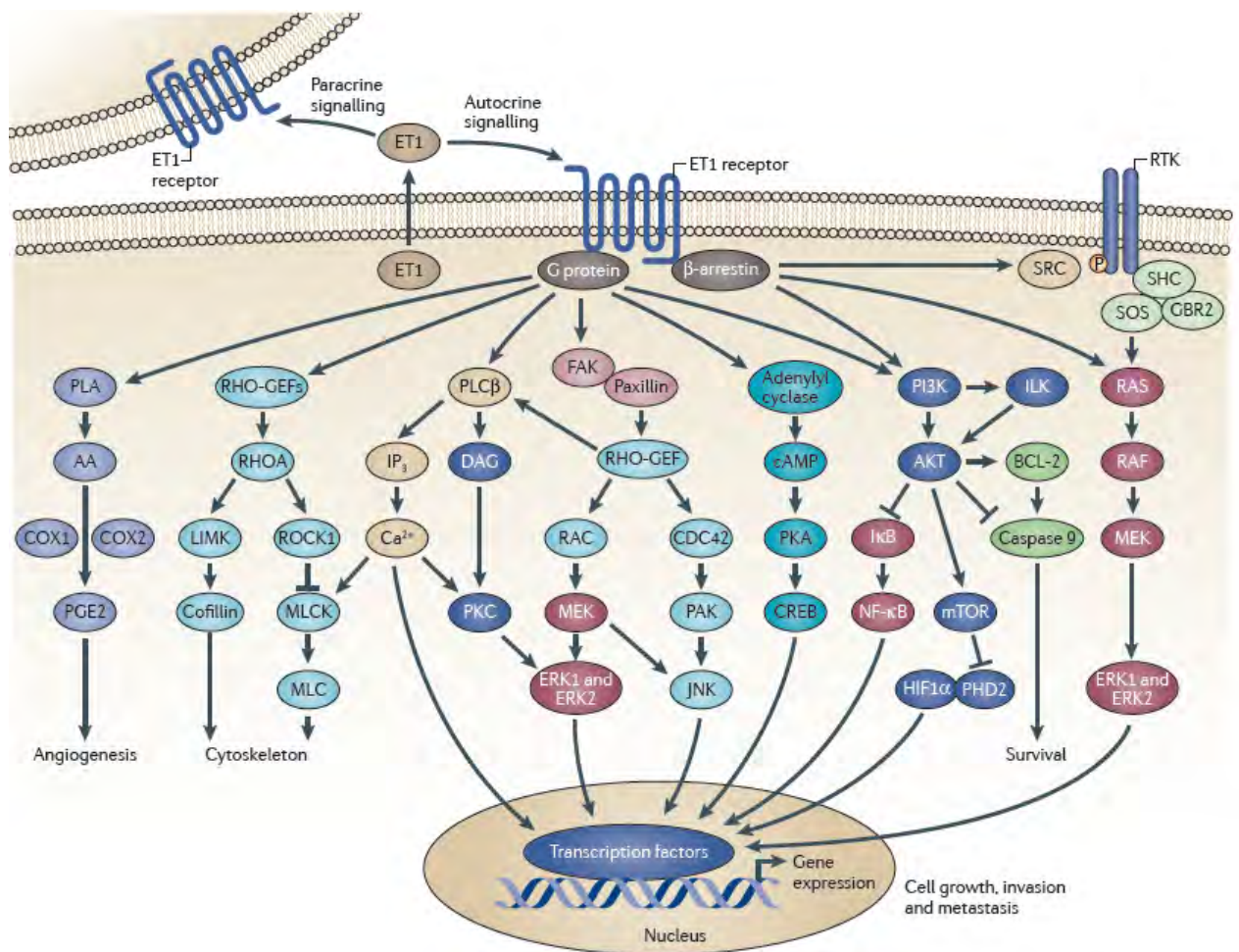
Ανώμαλη ενεργοποίηση του άξονα της ET-1 έχει βρεθεί να εμπλέκεται μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μονοπατιών στην ανάπτυξη και πρόοδο διαφόρων συμπαγών μορφών καρκίνου, όπως του καρκίνου του προστάτη, των ωοθηκών, του μαστού, του παχέως εντέρου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστεως, του τραχήλου της μήτρας, καθώς επίσης και σε όγκους του ΚΝΣ, στο μελάνωμα, στο Karosi's σάρκωμα και στις οστικές μεταστάσεις [465]. Αυτή η ενεργοποίηση μπορεί να οφείλεται είτε σε υπερέκφραση της ET-1, είτε σε απώλεια κάποιου αρνητικού ρυθμιστή είτε σε απορρυθμισμένη έκφραση των ET-1 υποδοχέων ή των μορίων του ικριώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο άξονας της ET-1 να επάγει την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού, την ανθεκτικότητα στην απόπτωση, τον σχηματισμό νέων αγγείων, τη ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων, την ανώμαλη οστεογένεση, την επιθετικότητα και την μετάσταση [466]. Τόσο τα καρκινικά κύτταρα όσο και τα σχετιζόμενα με τον καρκίνο κύτταρα, όπως είναι οι ινοβλάστες, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει βρεθεί να υπερεκφράζουν την ET-1 και τους υποδοχείς της [467-469].

Οι υποδοχείς της ET-1, κυρίως ο ETA και σε μικρότερο βαθμό ο ETB, συνδέονται με τις G πρωτεΐνες καθώς και με μόρια του ικριώματος, όπως είναι οι β-αρεστίνες, οδηγώντας στην ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του PLCβ/DAG/PKC και PLCβ/IP3/ Ca<sup>2+</sup>/PKC καθώς και των MAP κινασών (ERK σηματοδότηση). Επίσης, η ET-1 σηματοδότηση οδηγεί σε διασταυρούμενη ενεργοποίηση των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTKs), όπως των EGFR και VEGFR3 μέσω στρατολόγησης του SRC [470-474]. Μία εναλλακτική οδός μέσω της οποίας η ET-1 ενεργοποιεί τον EGFR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεάσης ADAM17, η οποία οδηγεί σε αποικοδόμηση και σε τοποθέτηση της εξωκυττάριας επικράτειας του TNF-α και των υπόλοιπων EGFR προσδετών, επάγοντας την EGFR σηματοδότηση [475]. Άλλο μονοπάτι που

ενεργοποιείται από την ET-1 είναι η φωσφολιπάση A (PLA), η οποία με τη σειρά της επάγει το αραχιδονικό οξύ (AA), το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση των κυκλοοξυγενασών COX1 και COX2, με αποτέλεσμα την παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Επιπρόσθετα, η ET-1 ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR καθώς και την focal adhesion kinase (FAK)-paxillin, που με τη σειρά της επάγει τον RHO-guanine nucleotide exchange factor (RHO-GEF). Επίσης, η ET-1 ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-kB και παράλληλα επάγει τις RHO-GEF και μία μικρή GTPase πρωτεΐνη που παρουσιάζει ομολογία με την Ras (RHOA), οδηγώντας σε αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού μέσω της κινάσης ROCK1 (RHO-associated coiled-coil containing protein kinase 1) [466] (**Εικόνα 1.18**).

Ακόμη, αλληλεπίδραση μεταξύ της β-αρεστίνης 1 και των ET-1 υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση του axis inhibition 1 (AXIN1), το οποίο συμβάλλει σε απελευθέρωση και απενεργοποίηση της κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β) και σε σταθεροποίηση της β-κατενίνης είτε σε trans-ενεργοποίηση του EGFR μέσω του SRC η οποία προκαλεί την φωσφορυλίωση της τυροσίνης της β-κατενίνης και την ενεργοποίησή της [473]. Επίσης, η ενεργοποίηση του ETAR από την ET-1, έχει ως αποτέλεσμα την πυρηνική μετατόπιση της β-αρεστίνης 1 η οποία δεσμεύεται απευθείας στην β-κατενίνη ενισχύοντας την πυρηνική συσσώρευσή της την μεταγραφική ενεργότητά της. Το σύμπλοκο β-αρεστίνης 1/β-κατενίνης έχει βρεθεί να επάγει γονίδια, όπως τα *EDN1*, *AXIN2*, matrix metalloproteinase (*MMP2*) και κυκλίνης D1 (*CCND1*), μέσω αποικοδόμησης της απακετυλάσης 1 των ιστονών και στρατολόγησης της p300 ακετυλτρανσφεράσης στους προαγωγείς των συγκεκριμένων γονιδίων, ενισχύοντας την ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 [476]. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του *EDN1* από την β-κατενίνη έχει παρατηρηθεί στις καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέως εντέρου, προστάτη και ωοθηκών [476], συνιστώντας έναν θετικό feedback loop.





**Εικόνα 1.18:** Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον άξονα ET-1/ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R [466].

#### 1.4.2.3. Ρόλος του άξονα της ET-1 στον καρκίνο

Στην **εικόνα 1.19** παρουσιάζονται συνολικά οι δράσεις της ET-1 στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου.

➤ **Πολλαπλασιασμός:** Προηγούμενες μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας έχουν αποκαλύψει επαγωγή της ανάπτυξης από την ET-1, η οποία αναστάλθηκε από τους ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστές, atrasentan (ABT-627) και zibotentan (ZD4054), δείχνοντας ότι η ενδογενής ET-1 μπορεί να δράσει ως αυτοκρινής ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του ET<sub>A</sub>R. Η μιτογόνο δράση της έχει βρεθεί να ενισχύεται από τις συνεργικές αλληλεπιδράσεις της με άλλους

αυξητικούς παράγοντες, όπως των EGFR, b-FGF, insulin, IGF-1, PDGF, TGFβ και IL-6 [466].

➤ Κυτταρική επιβίωση: Η ET-1 έχει βρεθεί να δρα ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, ρυθμίζοντας την επιβίωση μέσω των μονοπατιών PI3K/Akt και NF-kB. Παρεμπόδιση του ET<sub>A</sub>R σε καρκινικά κύτταρα προστάτη με το atrasentan επήγαγε την απενεργοποίηση του NF-kB με επακόλουθη μείωση των επιπέδων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> και survivin, οδηγώντας έτσι σε απόπτωση. Σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, η ET-1 βρέθηκε να αναστέλλει την paclitaxel-επαγόμενη απόπτωση, ως αποτέλεσμα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών BCL-2 και η δράση αυτή αναστράφηκε μετά από επίδραση με τον εξειδικευμένο ETAR αναστολέα BQ123. Συνδυασμένη χορήγηση χημειοθεραπείας με ETAR (atrasentan και zibotentan) ή με ETAR/ETBR (macitentan) ανταγωνιστές μπορεί να επάγει αποτελεσματικότερα την απόπτωση *in vitro* και *in vivo* όπως παρατήρηθηκε στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, του παχέως εντέρου και του τραχήλου της μήτρας [466].

➤ Μετανάστευση και επιθετικότητα: Κατά τη διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου, τα κύτταρα απελευθερώνουν πρωτεάσες, χάνουν την πολικότητά τους και τις κύτταρο-κύτταρο αλληλεπιδράσεις, αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο και εισβάλλουν στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM) μεταναστεύοντας σε αποκρυσμένες θέσεις. Αυτές οι μεταβολές χαρακτηρίζονται από την αποσυναρμολόγηση των χασμοσυνδέσμων (gap junction intercellular communications, GJICs), των στενών συνδεσμών και των συνδέσμων προσκόλλησης, από την αναδιοργάνωση των συμπλεγμάτων προσκόλλησης και την αναδιαμόρφωση του κυτοσκελετού [478]. Πρόσφατα, ο ρόλος της ET-1 στην επιθετικότητα μελετήθηκε εκτενώς στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) [479]. Η lactoferrin-μεσολαβούμενη επαγωγή της επιθετικότητας στα καρκινικά κύτταρα του μαστού βρέθηκε να μεσολαβείται από την αυξημένη έκφραση και έκκριση της ET-1, ενώ προσθήκη του BQ123 φάνηκε να αναστέλλει την επαγόμενη από την ET-1 και την λακτοφερρίνη μετανάστευση και επιθετικότητα [479]. Επίσης, η ET-1 βρέθηκε να ρυθμίζει τόσο στο επίπεδο έκκρισης και ενεργοποίησης των προενζύμων όσο και στο μεταγραφικό, 2 οικογένειες πρωτεασών που σχετίζονται με την μετάσταση, τις MMPs και το urokinase-type plasminogen activator system. Για παράδειγμα, η ET-1 στα καρκινικά κύτταρα οδήγησε σε ενεργοποίηση των διαλυτών μορφών MMPs, όπως των MMP2, MMP9, MMP3, MMP7 και MMP13 καθώς και της μεμβρανικής μορφής MT1-MMP, ενώ μείωσε

την έκκριση των αναστολέων TIMP1 και TIMP2, προκαλώντας την αποικοδόμηση της ECM [480, 481]. Ακόμη, η ET-1 έχει αναφερθεί να επάγει την κινητικότητα και την αποδιοργάνωση των ινών ακτίνης, ενεργοποιώντας τις p125 focal adhesion kinase (FAK), paxillin και RHO, οδηγώντας στην μεταγωγή σημάτων που εμπλέκονται στην επιθετικότητα [482, 483]. Επιπρόσθετα, στον καρκίνο των ωοθηκών και στο μελάνωμα, η ET-1 μέσω των ETAR και ETBR βρέθηκε να επάγει την φωσφορυλίωση της κονεξίνης CX43 μέσω του SRC μονοπατιού, οδηγώντας έτσι σε μειωμένη κυτταρική σύζευξη [484, 485].

➤ Νεοαγγειογένεση: Η ET-1 έχει βρεθεί να επάγει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης του VEGF με δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μεταγραφική αυξορύθμιση του VEGF έχει σχετιστεί με τον HIF-1α, τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα που επάγεται από την υποξία και τους αυξητικούς παράγοντες. Σε καρκινικά κύτταρα κάτω από την επίδραση της ET-1 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του HIF-1α, σχηματισμός του μεταγραφικού συμπλόκου HIF-1 και δέσμευσή του στα HRE στοιχεία. Οπότε, υπό υποξικές συνθήκες η ET-1 ενίσχυσε το σήμα της υποξίας μέσω σταθεροποίησης του HIF-1α και παραγωγής του VEGF [486]. Προσθήκη του ETAR ανταγωνιστή μπλόκαρε την ET-1-επαγόμενη αυξορύθμιση της έκφρασης και έκκρισης του VEGF καθώς και της δραστηριότητας του HIF-1. Μελέτες έχουν δείξει μία αμοιβαία σχέση μεταξύ της έκφρασης της ET-1 και της δραστηριότητας του HIF-1: τόσο η ET-1 σταθεροποιεί τον HIF-1α κατά τη διάρκεια νορμοξικών και υποξικών συνθηκών, οδηγώντας στην HIF-1α-μεσολαβούμενη μεταγραφή αγγειογενετικών γονιδίων, όσο και ο HIF-1α μεσολαβεί στην μεταγραφή της ET-1 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους [487]. Σε συνθήκες νορμοξίας και κυρίως υποξίας, η ET-1 βρέθηκε να επάγει την έκφραση των κυκλοοξυγενασών COX-1 και -2 τόσο σε mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, την δραστηριότητα του COX-2 προαγωγέα και την παραγωγή της προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Αναστολείς των COX-1 και COX-2 μπλόκαραν την ET-1-επαγόμενη απελευθέρωση των PGE2 και VEGF, την δραστηριότητα του MMP και την επιθετικότητα. Αποσιώπηση του HIF-1α με siRNA απευαισθητοποίησε την COX-1 μεταγραφική ενεργότητα, την PGE2 και VEGF παραγωγή και την MMP δραστηριότητα σε απόκριση στην ET-1, δείχνοντας ότι το σύμπλοκο HIF-1α/COX αποτελεί στόχο του ET-1 άξονα [488].

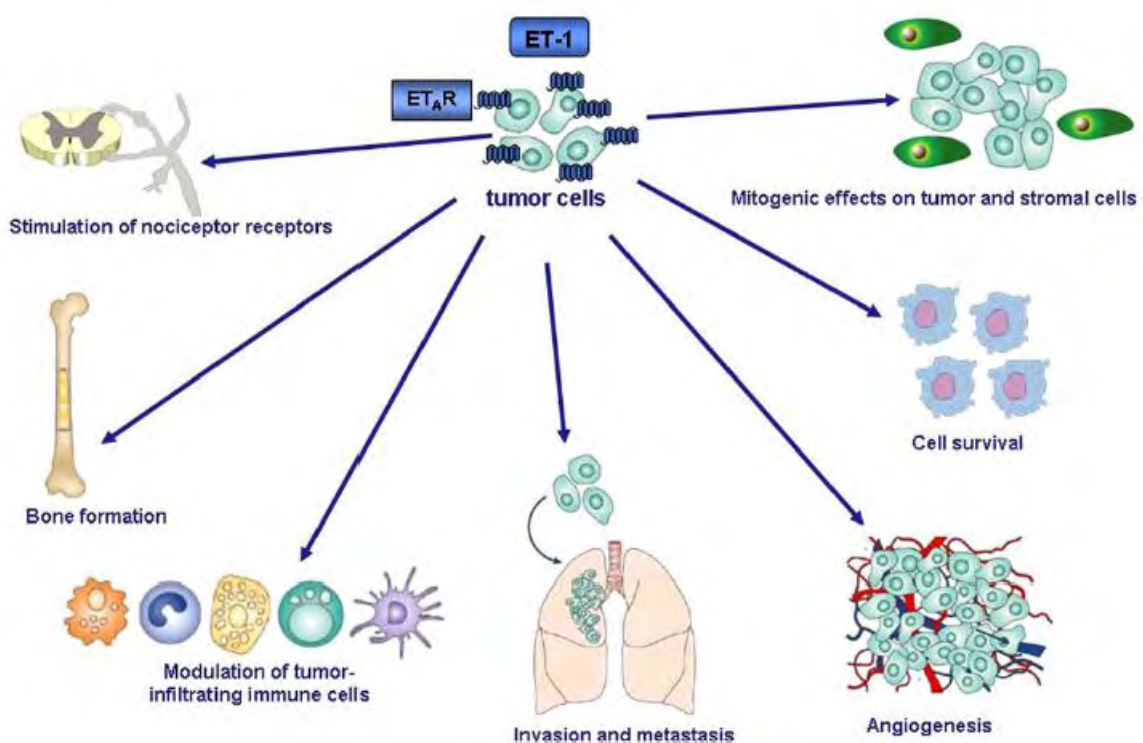
➤ Οστεογένεση: Η οστεοβλαστική μετάσταση συχνά παρατηρείται σε προχωρημένα στάδια διάφορων καρκίνων, όπως του προστάτη και του μαστού και οφείλεται κυρίως σε

παράγοντες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και στην ET-1. Οι οστεοβλάστες παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα του ET<sub>A</sub>R και απαντούν στην ET-1, επάγοντας την μιτογένεση στους οστεοβλάστες και τη μείωση της οστεοκλαστικής αναρρόφησης και της οστεοκλαστικής κινητικότητας [489]. Πρόσφατα δεδομένα σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό της ET-1-μεσολαβούμενης ενεργοποίησης των οστεοβλαστών φαίνεται να εμπλέκουν το calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T cells) μονοπάτι [490].

➤ Χημειοανθεκτικότητα: Η σηματοδότηση ET-1/ET<sub>A</sub>R έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή του EMT φαινοτύπου, μέσω ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του όγκου. Αποσιώπηση του ET-1/ET<sub>A</sub>R έχει δείχτει να αναστρέφει τον EMT φαινότυπο, να αναστέλλει την επιθετικότητα και να βελτιώνει τις δράσεις των ΧΜΘ παραγόντων [491]. Έχει επίσης προταθεί ότι η ET<sub>A</sub>R-μεσολαβούμενη EMT σηματοδότηση στα καρκινικά κύτταρα συμβαίνει κατά τη διάρκεια ανάπτυξης χημειοανθεκτικότητας. Πράγματι, ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις στον καρκίνο των ωοθηκών έχουν δείξει υπερέκφραση του ET<sub>A</sub>R στα χημειοανθεκτικά κύτταρα, προτείνοντας ότι τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα πρόβλεψης της χημειοανθεκτικότητας [492]. Ακόμη, η υποξία βρέθηκε να έχει κρίσιμο ρόλο στην απόκτηση του EMT φαινοτύπου και στην ανάπτυξη της χημειοανθεκτικότητας. Η ενεργοποίηση του ET-1/ET<sub>A</sub>R πιθανόν να μιμείται τις δράσεις του υποξικού περιβάλλοντος μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντας HIF-1α [492].

➤ Ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος: Οι ETs βρέθηκε να παίζουν σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση των σχετιζόμενων-με τον καρκίνο μακροφάγων. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα βρέθηκε να εκφράζουν τόσο τους υποδοχείς ενδοθηλίνης όσο και τις ETs, και οι ETs μέσω του ETB υποδοχέα επάγουν την χημειοταξία και το MAPK-μεσολαβούμενο σηματοδοτικό μονοπάτι. Παρόλα αυτά, ETs δεν έχουν ανιχνευτεί στα κυτταρικά λύματα από ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα. Επίσης, ο ET-1 άξονας έχει δείχτει να συνιστά σημαντικό ρυθμιστή του homing των λεμφοκυττάρων και ότι υπερέκφραση του ETB στους όγκους παρεμποδίζει το Tcell homing, προτείνοντας ότι παρεμπόδιση του ίσως να αποτελεί σημαντική θεραπευτική προσέγγιση, αυξάνοντας το Tcell homing στους όγκους [457].

➤ Ρύθμιση του πόνου: Τοπική χορήγηση της ET-1 βρέθηκε να προκαλεί πόνο μέσω του ET<sub>A</sub>R, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αναλγησία μέσω του ET<sub>B</sub>R μέσω επαγωγής της απελευθέρωσης β-ενδορφίνης και ενεργοποίησης των οπιοειδών υποδοχέων. Ανταγωνιστές του ET<sub>A</sub>R έχουν δείξει να βελτιώνουν τον πόνο, αποτελώντας μία υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση κυρίως στους ασθενείς με προχωρημένη μορφή καρκίνου [457].



**Εικόνα 1.19:** Δράσεις της ET-1 στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου [488].

#### 1.4.2.4. Ρόλος του άξονα της ET-1 σε διάφορους τύπους καρκίνου

Στον **πίνακα 1.6** παρουσιάζονται οι μεσολαβούμενες ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R δράσεις της ET-1 στους κυριότερους τύπους καρκίνου.

➤ Καρκίνος του προστάτη: Στον φυσιολογικό προστατικό αδένα, η ET-1 παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις της εντοπίζονται στα

σπερματικά υγρά [493]. Στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου η έκφραση των βασικών παραγόντων απομάκρυνσης της ET-1, της νευροπεπτιδάσης και του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R βρέθηκε να μειώνεται, οδηγώντας σε αύξηση τοπικά της συγκέντρωσης της ET-1 [494]. Παρατηρείται επίσης, υψηλή έκφραση του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου, ενώ του ET<sub>B</sub>R μειώνεται εξαιτίας της γονιδιακής αποσιώπησης λόγω μεθυλίωσης του προαγωγέα. Ακόμη, έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις του μονοπατιού ET-1/ET<sub>A</sub>R με άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως των IGF-1, IGF-2, PDGF, FGF2 και EGF. Επιπρόσθετα, εξειδικευμένοι ETA-ανταγωνιστές, όπως το atrasentan έχει βρεθεί να μπλοκάρει τις πολλαπλασιαστικές ιδιότητες της εξογενούς ET-1 και των άλλων αυξητικών παραγόντων στα προστατικά καρκινικά κύτταρα και στους οστεοβλάστες [495, 496].

➤ Καρκίνος των ωοθηκών: Η ET-1 βρέθηκε να επάγει τον πολλαπλασιασμό σε πρωτογενείς καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών *in vitro* [497]. Το mRNA της ET-1 έχει δειχτεί να αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Επίσης, χορήγηση του ETA-ανταγωνιστή BQ123 ανέστειλε την ET-1-επαγόμενη ανάπτυξη, ενώ αναστολή του ETB με τον εξειδικευμένο ανταγωνιστή BQ788 δεν είχε καμία επίδραση [497]. Ακόμη, η ET-1 δρώντας μέσω του ETA επάγει την υπερέκφραση και την ενεργοποίηση πρωτεϊνών, οι οποίες είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την επιθετικότητα και την μετάσταση, ενώ χορήγηση του BQ123 μπλόκαρε αυτή τη δράση [498, 499]. Επιπροσθέτως, η ET-1 μέσω του ETA έχει δειχτεί να επάγει την παραγωγή του VEGF, αυξάνοντας τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1a [500, 501], ενώ δρα και ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας, αναστέλλοντας την paclitaxel-επαγόμενη απόπτωση. Προσθήκη του BQ123 παρεμπόδισε την ET-1 επαγόμενη επιβίωση [502, 503].

➤ Καρκίνος του παχέως εντέρου: Αυξημένα επίπεδα του pre-pro-ET-1, του ECE της ενεργούς ET-1 και του ETA υποδοχέα βρέθηκαν στα αδενώματα και στα αδενοκαρκινώματα [504]. Αυξορύθμιση του ETA και μειορύθμιση του ETB έχει παρατηρηθεί στα καρκινικά κύτταρα και στα σχετιζόμενα με τον καρκίνο κύτταρα, όπως στα ενδοθηλιακά και στους ινοβλάστες συγκριτικά με τα αντίστοιχα στον φυσιολογικό ιστό. Σε ένα *in vivo* μοντέλο μετάστασης χορήγηση του BQ123 ανέστειλε την καρκινική ανάπτυξη [505].

➤ Καρκίνος του μαστού: Αυξημένα επίπεδα όλων των ισομορφών των ενδοθηλινών καθώς και του υποδοχέα ETA και σε μικρότερο βαθμό του ETB έχουν ανιχνευτεί στον

καρκίνο του μαστού [506]. Υψηλότερα είναι τα επίπεδα έκφρασης του ETA σε πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου τα οποία βρέθηκε να σχετίζονται και με αυξημένη ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η υποξία επάγει την επιθετικότητα μέσω απελευθέρωσης της ET-1 [507].

➤ Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας: Οι HPV-θετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας βρέθηκε να υπερεκφράζουν τα mRNA των ET-1 και ET<sub>A</sub>R και να χαρακτηρίζονται από την αυξημένη έκκριση ET-1. Αντίθετα, οι HPV-αρνητικές κυτταρικές σειρές δεν εξέφραζαν ανιχνεύσιμα επίπεδα της ET-1. Χορήγηση του ETA ανταγωνιστή BQ123 ανέστειλε τον ET-1-επαγόμενο πολλαπλασιασμό, ενώ ανταγωνιστής του ETB δεν είχε καμία επίδραση. Επίσης, χορήγηση του atrasentan ανέστειλε την ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στα xenografts και παρουσίασε συνεργική δράση όταν συνδυάστηκε με το κυτταροτοξικό φάρμακο paclitaxel [465].

➤ Καρκίνος του πνεύμονα: Η ET-1 έχει αποτελέσει βασικό προγνωστικό παράγοντα στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και υψηλή έκφραση των ET-1, ET<sub>A</sub>R και ECE-1 έχει παρατηρηθεί στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό. Αντίθετα, η έκφραση του ET<sub>B</sub>R ελαττώνεται, ενώ η ET-1 έχει σχετιστεί με έκφραση του VEGF και με φτωχή πρόγνωση στον NSCLC [457].

➤ Kaposi's σάρκωμα: Μελέτες έχουν δείξει ότι η ET-1 δρα ως αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας μέσω και των 2 υποδοχέων ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R. Δέσμευση των ET-3 και ET-1 και στους 2 υποδοχείς βρέθηκε να επάγει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την επιθετικότητα της κυτταρικής σειράς KS IMM, μέσω ενεργοποίησης των πρωτεασών. Χορήγηση του μικρού ETA/ETB αναστολέα A182086 σε KS xenografts οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου που σχετίζεται με τις αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις στα κύτταρα του όγκου και με τις αντιαγγειογενετικές δράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον ETB [508, 509].

➤ Μελάνωμα: Τα μεταλλαγμένα μελανοκύτταρα έχει βρεθεί να εκφράζουν και τους 2 υποδοχείς των ενδοθηλινών ETA και ETB. Πρόσφατα, το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης και οι ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις στο μελάνωμα έχουν ταυτοποιήσει τον ET<sub>B</sub>R ως τον κύριο υποδοχέα που εμπλέκεται στην πρόοδο του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου, συμμετέχοντας στις αντι-αποπτωτικές δράσεις της ET-1. Παρεμπόδιση του μέσω του ανταγωνιστή BQ788 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης και τον κυτταρικό

θάνατο και *in vivo* και *in vitro* [510]. Οι ET-1 και ET-3 μέσω δέσμευσης στον ET<sub>B</sub>R επάγουν την απενεργοποίηση των χασμοσυνδέσμων μέσω φωσφορυλίωσης του Cx43, τον κύριο ρυθμιστή επαφής των κερατινοκυττάρων, ενώ βρέθηκε να εμπλέκονται στη διατάραξη των καρκινικών κυττάρων-μικροπεριβάλλοντος αλληλεπιδράσεων μέσω μειορύθμισης της έκφρασης της E-cadherin και της σχετιζόμενης β-κατενίνης, με ταυτόχρονη αυξορύθμιση του *Snail* και της N-cadherin. Παράλληλα, οι ETs δείχτηκε να επάγουν την έκφραση των ανβ3- και α2β1- ιντεγκρινών και την ενεργοποίηση των MMP-9 και MMP-2, ενώ η ETBR-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση των MAPK και FAK σηματοδοτικών μονοπατιών οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προσκόλληση, μετανάστευση και MMP-εξαρτώμενη επιθετικότητα [511, 512]. Σε συνθήκες νορμοξίας, ενεργοποίηση του ETBR μέσω των ET-1 και ET-3 βρέθηκε να ενισχύει την έκφραση του HIF-1a και να επάγει την αυξορύθμιση των VEGF, COX-1, COX-2 και του PGE2 μονοπατιού. Οι μεταβολές αυτές ήταν πιο έντονες σε συνθήκες υποξίας, ενώ ο ETB ανταγωνιστής μπλόκαρε τις ET-μεσολαβούμενες δράσεις. Σε ανθρώπινα xenografts, χορήγηση του εξειδικευμένου ανταγωνιστή A-192621 κατέστειλε την συσσώρευση του HIF-1a, την ανάπτυξη του όγκου, την νεοαγγειογένεση και την έκφραση των VEGF και MMP-2 [513]. Παρεμπόδιση και των 2 υποδοχέων ET-1 με το bosentan έδειξε να μειώνει τον πολλαπλασιασμό, να επάγει την απόπτωση και να βελτιώνει τις δράσεις των αντικαρκινικών παραγόντων [514]. Σε μία φάσεως II μελέτη σε σταδίου IV μεταστατικό μελάνωμα το bosentan έδειξε σταθεροποίηση της νόσου σε 6 από τους 32 ασθενείς [515].



**Πίνακας 1.6:** Ρόλος της ET-1 και των υποδοχέων της σε διάφορους τύπους καρκίνου [440]

	Action of ET-1	Endothelin receptors	Receptor antagonists showing activity
Prostate cancer <sup>11,16,37-43</sup>	Promotes growth and inhibits apoptosis through ET <sub>A</sub> receptor	High ET <sub>A</sub> -receptor expression; decreased or absent ET <sub>B</sub> -receptor expression; frequent methylation of ET <sub>B</sub> -receptor gene	Atrasentan
Ovarian cancer <sup>18,30,32,35,36,44-47</sup>	Promotes cell proliferation, survival and invasion through ET <sub>A</sub> receptor	High ET <sub>A</sub> -receptor expression	Atrasentan, BQ123, BQ788
Melanoma <sup>66,68-71</sup>	Promotes proliferation and invasion	ET <sub>A</sub> -receptor downregulated; ET <sub>B</sub> -receptor expression seems to be increased	BQ788
Bone malignancies <sup>25-29,72</sup>	Increases the expression of osteocalcin and new bone formation	Both ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> receptors expressed	Atrasentan, BQ123
Breast cancer <sup>62-64</sup>	Increased expression; decreased tumour-cell differentiation	High expression of ET <sub>B</sub> receptor	BQ123, BQ788
Renal cancer <sup>53</sup>	ET1 inhibits apoptosis	ET <sub>A</sub> -receptor expression	
Lung cancer <sup>19,48-50</sup>	ET1 detected	Both ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> receptors expressed; ET <sub>A</sub> receptor seems to be downregulated	
Colon cancer <sup>23,24,51,52</sup>	Inhibits apoptosis	Increased expression of ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> receptors	Bosentan
Cervical cancer <sup>54,55</sup>	Induces proliferation	Increased expression of ET <sub>A</sub> receptor on HPV-positive cells; also expresses ET <sub>B</sub> receptors	Atrasentan, BQ123
Kaposi's sarcoma <sup>65</sup>	Induces cell proliferation, migration and invasion	Both ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> receptors expressed	BQ123, BQ788
CNS tumours <sup>56-58</sup>	Promotes meningioma cell proliferation	Both ET <sub>A</sub> and ET <sub>B</sub> receptors expressed	BQ123, RES-701-3

CNS, central nervous system.

#### 1.4.2.5. Αναστολείς των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R

Δεδομένου ότι τα νευροπεπτίδια (NP's) και κυρίως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1 axis) έχουν βρεθεί να συνδέονται με την ανάπτυξη και την πρόοδο διαφόρων τύπων καρκίνου, αποτελούν ήδη έναν από τους βασικούς στόχους της αντικαρκινικής θεραπείας (516, 517). Ο ανταγωνιστής και των 2 τύπων υποδοχέων της ET-1, ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R, bosentan και οι εκλεκτικοί ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστές Atrasentan, YM-598 και Zibotentan είναι οι μοναδικοί έως τώρα ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1 που έχουν αξιολογηθεί και σε προκλινικές και σε κλινικές μελέτες (518). Άλλες λιγότερο ανεπτυγμένες ET-1 θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τον ET<sub>B</sub>R αγωνιστή IRL-1620, ο οποίος αυξάνει την διήθηση των καρκινικών κυττάρων βελτιώνοντας την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών παραγόντων και της ακτινοθεραπείας, την αναστολή του ECE-1 είτε από

εξειδικευμένους παράγοντες είτε από φυσικά προϊόντα, όπως το πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί και οι βιολογικά δραστικές πολυφαινόλες και την τροποποίηση της αποικοδόμησης της ET-1 μέσω αυξορύθμισης της NEP δραστηριότητας [466] (Εικόνα 1.20).

Στον **πίνακα 1.7** παρουσιάζονται οι κυριότεροι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1 και οι κλινικές μελέτες για την αξιολόγησή τους.

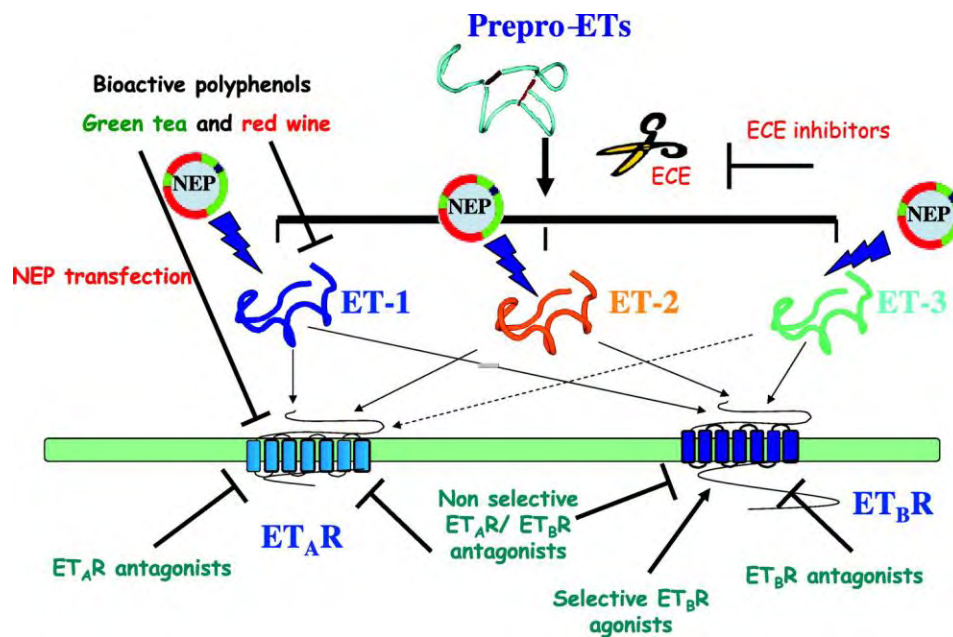
➤ *BQ123 & BQ788 (Banyu Pharmaceutical Co; Merck)*: Ο BQ123 συνιστά έναν διαλυτό και εξειδικευμένο ανταγωνιστή του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R με IC<sub>50</sub> τιμές ίσες με 8.3nM και 61 μM για τον ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R αντίστοιχα [519]. Πρόκειται για τον πρώτο ανταγωνιστή που αναπτύχθηκε και η χρήση του σε προκλινικά μοντέλα αποκάλυψε τον ρόλο του ET<sub>A</sub>R στην καρκινική κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την μετανάστευση και την επιθετικότητα [520, 521, 522, 523]. Παρόλη την ευρεία χρήση του στα προκλινικά μοντέλα, η εφαρμογή του έχει περιοριστεί μόνο σε μικρού μεγέθους κλινικές μελέτες εξαιτίας της παρεντερικής χορήγησής του (το πεπτίδιο υδρολύεται από τις πεπτιδάσες στην συστηματική κυκλοφορία και στον ΓΣ σωλήνα) και του υψηλού κόστους που απαιτείται για την ανάπτυξή του [524]. Ο BQ788 συνιστά έναν εξειδικευμένο ανταγωνιστή του ET<sub>B</sub>R με IC<sub>50</sub> τιμές ίσες με 1300 nM και 1.2 nM για τους ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R αντίστοιχα [525]. Προκλινικές μελέτες με τον BQ788 έχουν δείξει τον ρόλο του ET<sub>B</sub>R στην επιβίωση, την ανάπτυξη και την μετάσταση στο μελάνωμα και στο γλοίωμα [526, 527]. Ακόμη, το BQ788 έχει βρεθεί να αναστέλλει διάφορα μονοπάτια που μεσολαβούνται από την ET-1, όπως την βρογχοσυσπαση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εκκαθάριση της ET-1 [528].

➤ *Bosentan (Actelion Pharmaceuticals Ltd)*: Σε προκλινικές μελέτες το bosentan έδειξε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την σύνθεση του DNA και να επάγει απόπτωση [529]. Μία φάσεως II μελέτη έδειξε ότι το bosentan ως μονοθεραπεία ίσως να συνιστά κατάλληλη θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα σταδίου IV, επιτυγχάνοντας σταθεροποίηση της νόσου στο 19% των ασθενών την 6<sup>η</sup> εβδομάδα που επιβεβαιώθηκε την 12<sup>η</sup>. Ακόμη, 5 ασθενείς παρουσίασαν σταθερότητα και μετά από 24 εβδομάδες, ενώ 2 παρέμειναν σταθεροί ακόμη και μετά από 2 χρόνια από την έναρξη της θεραπείας [530]. Βάσει των συγκεκριμένων πολλά υποσχόμενων αποτελεσμάτων, διεξήχθη μία φάσεως II τυχαίοποιημένη διπλά τυφλή μελέτη σε έναν παρόμοιο πληθυσμό, η οποία όμως δεν έφερε τα αναμενόμενα καλά αποτελέσματα μετά από συνδυασμένη χορήγηση του bosentan με την 1<sup>η</sup> γραμμής

χημειοθεραπεία dacarbazine όσον αφορά διάφορες παραμέτρους, όπως τον χρόνο εξέλιξης της νόσου (TTP), το PFS και το OS [531]. Το bosentan έχει λάβει έγκριση για την θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης και τη μείωση του σχηματισμού έλκους σε ασθενείς με συστηματική σκλήρωση, ενώ προς το παρόν δεν έχουν αναφερθεί άλλες κλινικές μελέτες για την αξιολόγησή του στον καρκίνο [518].

➤ Atrasentan (Abbott Laboratories) & Zibotentan (AstraZeneca): Οι συγκεκριμένοι ΕΤΑ ανταγωνιστές έχουν επιδείξει σημαντική αντικαρκινική δράση σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου του προστάτη [518, 532]. Δοκιμάστηκαν σε φάσεως II μελέτες σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη παρουσιάζοντας πολύ καλά αποτελέσματα. Βάσει αυτών διεξήχθησαν και φάσεως III μελέτες σε ασθενείς με μη μεταστατικό καρκίνο του προστάτη ή με προχωρημένο μεταστατικό καρκίνο σε συνδυασμό με πρότυπους ΧΜΘ παράγοντες (docetaxel). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών κρίθηκαν ανασφαλή, ενώ η μελέτη που εξέτασε το zibotentan ως μονοθεραπεία στους ασθενείς με μη μεταστατικό καρκίνο του προστάτη διακόπηκε πρόωρα λόγω του ότι οι στόχοι για βελτιωμένο OS και PFS δεν επιτεύχθηκαν [533]. Επίσης, τα πολύ καλά αποτελέσματα που λήφθηκαν με το zibotentan στα *in vitro* καρκινικά μοντέλα ωοθηκών οδήγησαν στην διεξαγωγή μίας φάσεως II κλινικής μελέτης. Στην συγκεκριμένη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του zibotentan σε συνδυασμό με carboplatin και paclitaxel σε 120 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου καρκίνο ωοθηκών και όπως φάνηκε δεν παρατηρήθηκε βελτίωση του PFS. Παρόλα αυτά, λήφθηκαν και ορισμένα καλά αποτελέσματα, τα οποία όμως δεν μπορούν να θεωρηθούν ασφαλή λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη [534]. Ακόμη, η φαρμακολογική αναστολή του ET<sub>A</sub>R βρέθηκε να διαταράσσει την ισορροπία με τον ET<sub>B</sub>R υποδοχέα, οδηγώντας σε αυξορύθμιση της ET<sub>B</sub>R-μεσολαβούμενης σηματοδότησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Αυτή βρέθηκε να δρα ως προ-αγγειογόνος, παρεμβαίνοντας στην ανοσοποίηση, μέσω παρεμπόδισης της ωρίμανσης και της δράσης των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία είναι απαραίτητα για τις T κυτταρικές-μεσολαβούμενες ανοσολογικές αποκρίσεις και για το homing των T-κυττάρων στους όγκους [535]. Αυτό πιθανόν μπορεί να εξηγήσει την αποτυχία μερικών εξειδικευμένων ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστών να παράγουν στατιστικά σημαντικά κλινικά αποτελέσματα στους διάφορους καρκίνους καθώς η αναστολή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης πιθανόν να επηρεάζει την ολική επιβίωση [466]. Οι ETAR/ETBR ανταγωνιστές βρέθηκε να παρουσιάζουν ανεκτό προφίλ

τοξικότητας και καλά αποτελέσματα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών και για αυτό μπορούν να θεωρηθούν υποψήφιοι παράγοντες για μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, παρόλο βέβαια που τέτοιου είδους συνδυασμοί δεν έχουν προς το παρόν επιδείξει σημαντική αποτελεσματικότητα, όπως φάνηκε από τις κλινικές μελέτες ασθενών με μελάνωμα και γλοιοβλάστωμα [466].



**Εικόνα 1.20:** Ο άξονας της ET-1 ως θεραπευτικό στόχος στον καρκίνο [457].

**Πίνακας 1.7:** Ανταγωνιστές των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R & ET<sub>B</sub>R στη θεραπεία του καρκίνου [466].

Compound	Company	ET1 receptor antagonist	Tumour type	Clinical development	Outcome
Zibotentan	AstraZeneca	Specific for ETAR	Non-metastatic CRPC <sup>106</sup>	Phase III (monotherapy)	<ul style="list-style-type: none"> <li>OS HR = 1.13; (95% CI = 0.73–1.76)</li> <li>PFS HR = 0.89; (95% CI = 0.71–1.12)</li> </ul>
			HRPC with bone metastases <sup>144</sup>	Phase III (monotherapy)	<ul style="list-style-type: none"> <li>OS = 24.5 versus 22.5 months</li> <li>PFS = 6.2 versus 6.5 months</li> </ul>
			Metastatic HRPC*	Phase III (zibotentan plus docetaxel)	<ul style="list-style-type: none"> <li>OS = 20.0 versus 19.2 months</li> <li>PFS = 7.0 versus 7.9 months</li> </ul>
Zibotentan	AstraZeneca	Specific for ETAR	NSCLC <sup>145</sup>	Phase II (zibotentan plus pemetrexed)	<ul style="list-style-type: none"> <li>OS = 146 versus 193 days</li> <li>PFS = 110 versus 87 days</li> </ul>
Atrasentan	Abbott	Selective for ETAR	Non-metastatic HRPC <sup>146</sup>	Phase III (monotherapy)	<ul style="list-style-type: none"> <li>TTP = 764 versus 671 days</li> <li>OS = 1,477 versus 1,403 days</li> </ul>
			Metastatic HRPC <sup>147</sup>	Phase III (monotherapy)	<ul style="list-style-type: none"> <li>TTP HR = 0.89 (95% CI = 0.76–1.04)</li> <li>OS HR = 0.97 (95% CI = 0.81–1.17)</li> </ul>
			Metastatic HRPC <sup>†</sup>	Phase III (atrasentan plus docetaxel plus prednisone)	NR
YM-598	Astellas Pharma	Selective for ETAR	Prostate cancer <sup>§</sup>	Phase II (monotherapy)	NR
			Metastatic prostate cancer <sup>  </sup>	Phase II (YM598 plus mitoxantrone plus prednisone)	NR
Bosentan	Actelion	Dual ETAR and ETBR	Metastatic melanoma <sup>148</sup>	Phase II (monotherapy)	SD = 34%
			Metastatic melanoma <sup>149</sup>	Phase II (bosentan plus dacarbazine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>OS = 13.0 versus 10.6 months</li> <li>PFS = 1.6 versus 2.8 months</li> </ul>
Macitentan	Actelion	Dual ETAR and ETBR	Recurrent glioblastoma <sup>¶</sup>	Phase I (macitentan plus temozolomide)	NR

CI, confidence interval; CRPC, castration-resistant prostate cancer; ET1, endothelin 1; ETAR, endothelin A receptor; ETBR, endothelin B receptor; HR, hazard ratio; HRPC, hormone-refractory prostate cancer; mCRPC, metastatic CRPC; NR, not reported; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; SD, stable disease; TTP, time to disease progression.\*ClinicalTrials.gov identifier: [NCT00617669](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00617669). †ClinicalTrials.gov identifier: [NCT00134056](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00134056). ‡ClinicalTrials.gov identifier: [NCT00050297](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00050297). §ClinicalTrials.gov identifier: [NCT00048659](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00048659). ¶ClinicalTrials.gov identifier: [NCT01499251](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01499251).

#### 1.4.2.6. Ρόλος των νευροπεπτιδίων (ET-1) στην ανάπτυξη λεμφοπολλαπλασιαστικών ασθενειών του ανοσοποιητικού συστήματος

Φυσιολογικά, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχει βρεθεί να παράγουν ορμόνες και νευροπεπτίδια, μεταξύ των οποίων POMC-προερχόμενα πεπτίδια, όπως η αδενοκορτικοτροπίνη (ACTH) και οι β-ενδορφίνες, ο παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF), η αυξητική ορμόνη (GH), η προλακτίνη (PRL), η ινσουλίνη και ο IGF-1 καθώς και νευροπεπτίδια, όπως τα vasoactive intestinal peptide (VIP), substance P (SP), και somatostatin (SS), τα οποία έχουν ανιχνευτεί τόσο σε RNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο [536-539, 540-542], ενώ κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση ανοσολογικών/ φλεγμονωδών αποκρίσεων (Πίνακας 1.8). Ένας αριθμός άλλων μεσολαβητών περιλαμβάνει τις vasopressin, oxytocin, bombesin, enkephalin και neurophysin, ενώ έχουν αναφερθεί και υποδοχείς του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, όπως των CRF, ACTH και των POMC-σχετιζόμενων πεπτιδίων, καθώς και των γλυκοκορτικοειδών, των οιστρογόνων και της τεστοστερόνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

Παρόλα αυτά, η σημασία τους στην ανάπτυξη των λεμφοπολλαπλασιαστικών ασθενειών είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το neuropeptide Y (NPY) συντίθεται στους κακοήθεις B-πρόδρομους λεμφοβλάστες είτε στον μυελό των οστών είτε στα περιφερικά κύτταρα παιδιών με οξεία λευχαιμία [543]. Η ανοδοδραστικότητα του NPY στο πλάσμα βρέθηκε αυξημένη στα παιδιά με λευχαιμία συγκριτικά με τα controls, ενώ ήταν ιδιαίτερα υψηλή σε παιδιά που παρουσίαζαν καλύτερη έκβαση της νόσου συγκριτικά με τα φυσιολογικά επίπεδα του NPY στο πλάσμα [543]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα του NPY στο πλάσμα ανιχνεύτηκαν σε ασθενείς με B-πρόδρομη λευχαιμία, αλλά όχι σε B-, T-, και μυελοειδή λευχαιμία, όπου τα επίπεδα του παρέμειναν φυσιολογικά [543]. Ακόμη, υψηλά επίπεδα του SP βρέθηκαν σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα καθώς και σε δείγματα διαφόρων λευχαιμιών, ενώ τα επίπεδα ήταν μη ανιχνεύσιμα σε μη ενεργοποιημένα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Αντίθετα, τα φυσιολογικά μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα βρέθηκε να το εκφράζουν [544].

Επίσης, διάφοροι υποδοχείς των νευροπεπτιδίων έχουν αναφερθεί σε λεμφοπολλαπλασιαστικές ασθένειες. Υψηλής συγγένειας VIP υποδοχείς έχουν ανιχνευτεί

στην ανθρώπινη μυελωματική κυτταρική σειρά U266 και στην T-λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat [545]. Μέσω αναλύσεων RT-PCR ένας αριθμός λεμφοειδών κυτταρικών σειρών διαφορετικής προέλευσης (T-, B-, μύελωμα-, και λευχαιμία-) έχει βρεθεί να εκφράζει ποικίλα mRNA επίπεδα των υποδοχέων της somatostatin, sst2, sst3, sst4 και sst5, ενώ το sst1 δεν ανιχνεύτηκε καθόλου [546]. Ακόμη, τα mRNA επίπεδα του sst2 βρέθηκαν χαμηλά στα φυσιολογικά ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα (PBMCs) συγκριτικά με την έκφραση του συγκεκριμένου υποτύπου στις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και στα PBMCs από ασθενείς, καθώς και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές T- και B-προέλευσης [547]. Πρόσφατα σε μία μελέτη δείχτηκε ότι το octreotide, ένα αναλόγο της somatostatin ανέστειλε την ανάπτυξη σε διάφορες IL-6-εξαρτώμενες και μη, ανθρώπινες μυελωματικές κυτταρικές σειρές [548]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το octreotide επάγει την αναστολή της ανάπτυξης φαίνεται να εμπλεκεί είτε μειорύθμιση της έκφρασης του IGF-1 είτε αύξηση της παραγωγής των ανασταλτικών IGF-1 δεσμευτικών πρωτεϊνών, παρεμβαίνοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι του IGF-1 [549]. Ακόμη, υποδοχείς της somatostatin, SSRs έχουν βρεθεί με αυτοραδιογραφία σε βιοψίες ασθενών με T- και B- μη Hodgkin's λέμφωμα καθώς και με Hodgkin's νόσο [550, 551].

**Πίνακας 1.8:** Ορμόνες και νευροπεπτίδια που παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [552].

Source	Peptides or proteins
T lymphocytes	ACTH, TSH, GH, PRL, HCG, Endorphins, Metenkephalin, PTH related protein, IGF-I
B lymphocytes	ACTH, GH, Endorphins, IGF-I, NPY
Macrophages	ACTH, GH, Endorphins, IGF-I, SP, SS, ANP
Splenocytes	LH, FSH, CRH, $\alpha$ -MSH
Thymocytes	LHRH, CRH, AVP, OXT, GH
Mast cells/PBMC	VIP, SS
Megakaryocytes	NPY

Abbreviations: ACTH – adrenocorticotrophin; TSH – thyrotropin; GH – growth hormone; PRL – prolactin; PTH – parathyroid hormone; IGF-I – insulin-like growth factor I; NPY – neuropeptide Y; SP – substance P; SS – somatostatin; ANP – atrial natriuretic peptide; LH – luteinizing hormone; FSH – follicle-stimulating hormone; AVP – arginin vasopressin; OXT – oxytocin; VIP – vasoactive intestinal polypeptide; PBMC – peripheral blood mononuclear cells.

Παρόλα αυτά, η οδός της ET-1 ενώ έχει βρεθεί να συνδέεται με την ανάπτυξη και την πρόοδο διαφόρων τύπων συμπαγών όγκων, δεν υπάρχουν προς το παρόν προκλινικά και κλινικά δεδομένα σχετικά με τον βιολογικό της ρόλο σε αιματολογικούς καρκίνους. Σε μία μόνο πρόσφατη μελέτη, οι *Maffei et al., 2014* [590] έδειξαν τον ρόλο της ET-1 μέσω του ET<sub>A</sub>R στην παθοφυσιολογία της χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Chronic Lymphocytic Leukemia B cells, CLL), προάγοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την χημειο-ανθεκτικότητα, προτείνοντας έτσι ότι ο άξονας ET-1/ET<sub>A</sub>R ίσως συνιστά έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο στην CLL.

Σχετικά με το ΠΜ, υπάρχουν 7 δημοσιευμένοι μοριακοί υπότυποι του, οι οποίοι παρουσιάζουν διακριτά προφίλ γονδιακής έκφρασης, σχετιζόμενα με γνωστές γενετικές βλάβες, όπως υπερδιπλοειδία, μετατοπίσεις, κυτταρικό πολ/σμό και αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού. Από αυτούς, οι υπότυποι LB και HY είναι αυτοί που σχετίζονται με την έκφραση ET-1 και ETB αντίστοιχα (**Πίνακας 1.9**). Συγκεκριμένα, στην ομάδα LB (Low Bone Disease, αποτελεί το ~12% των νέων διαγνωσμένων ασθενών), η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλές εστιακές οστικές βλάβες παρατηρήθηκε υπερέκφραση της ET-1 και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του DKK-1, δείχνοντας έτσι ότι η ET-1 μειορυθμίζει την έκφραση του συγκεκριμένου παράγοντα στα MM κύτταρα. Επίσης, χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση του IL6R, αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού NF-kb και από απώλεια του χρωμοσώματος 13 και κέρδος του 1q [553, 554]. Ο μοριακός υπότυπος πολλαπλού μυελώματος HY (Hyperdiploid class), ο οποίος αποτελεί το 1/3 (~31%) των νέων διαγνωσμένων ασθενών, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα-παγίδα ET<sub>B</sub>R και του παράγοντα DKK-1. Στη συγκεκριμένη ομάδα, η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντικότερες εστιακές οστικές βλάβες συγκριτικά με δύο άλλες υποομάδες πολλαπλού μυελώματος (MS και MF classes), η απώλεια του χρωμοσώματος 13, το κέρδος του 1q και η έκφραση του IL6R είναι σπάνια γεγονότα [553, 554].



**Πίνακας 1.9:** Χαρακτηριστικά των μοριακών υποτύπων του ΠΜ [554].

<i>Molecular subtype</i>	<i>% of newly diagnosed patients<sup>a</sup></i>	<i>Genetic characteristics</i>	<i>Characteristic genes elevated in class</i>	<i>Risk</i>	<i>Features</i>
MS ( <b>MMSET</b> )	17	t(4;14)	<i>FGFR3, MMSET, CCND2, IL6R</i>	High	Overexpression MMSET and FGFR3; FGFR3 not evident in ~30%; bone disease is rare
MF ( <b>MAF/MAFB</b> )	6	t(14;16) or t(14;20)	<i>MAF or MAFB, CCND2, IL6R</i>	High/Moderate	Elevated expression of <i>CCND2</i> ; bone disease rare; low <i>DKK1</i> ; High NF-κB signature; low TNF-α induced gene <i>TNFAIP8</i> .
CD-1 ( <b>CCND1</b> or <b>CCND3</b> )	6	t(11;14) or t(6;14)	<i>CCND1 or CCND3</i>	Low	Few cases express <i>CCND2</i> in absence of <i>CCND1</i> or <i>CCND3</i> ; can have high <i>DKK1</i>
CD-2 ( <b>CCND1</b> or <b>CCND3</b> ) with <i>CD20</i> expression	12	t(11;14) or t(6;14)	<i>CCND1 or CCND3, CD20, VPREB3</i>	Low	Few cases express <i>CCND2</i> in absence of <i>CCND1</i> or <i>CCND3</i>
HY ( <b>HY</b> perdiploid)	31	Typical trisomies +3, +5, +7, +9, +11, +15, +19;	<i>GNG11, DKK1, FRZB</i>	Moderate	Low-ectopic expression of <i>CCND1</i> ; del13 and gain of 1q are rare; high expression of interferon-induced genes
LB ( <b>Low Bone</b> disease)	12	Typical HY trisomies; exception is frequent del13, gain of 1q, rare gain of 11	<i>CCND2, CST6, ARHE, IL6R</i>	Low	Expression of <i>CCND2</i> ; low level <i>DKK1, FRZB, CCR2, HIF1A, SMAD1</i> ; low expression of interferon-induced genes
PR ( <b>PR</b> oliferation)	10	Made up of all subgroups	<i>CCNB1, CCNB2, PCNA, MKI67, TOP2A, TYMS</i>	High	Overexpression of 1q genes; evolves from other groups

#### 1.4.2.7. Αλληλεπιδράσεις της οδού των νευροπεπτιδίων (ET-1) με την οδό ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της οδού των νευροπεπτιδίων με την οδό ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος είναι αρκετά περιορισμένα. Οι οδοί NEP/NPs και NF-κB/UPS είναι δύο συστήματα που έχει βρεθεί να εμπλέκονται στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη [630, 631], αλλά που δεν έχουν μελετηθεί για τις ακριβείς αλληλεπιδράσεις και δυναμικές τους.

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, βρέθηκε ότι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη PC3 και LNCaP, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντιπροσωπευτικά ανδρογόνου-ανεξάρτητα και ανδρογόνου-εξαρτώμενα *in vitro* μοντέλα αντίστοιχα, παρουσίασαν σε συνθήκες βασικής κατάστασης διαφορετικό pattern, με τα PC3 κύτταρα να εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα του NF-κB/UPS μονοπατιού και

αυξημένα επίπεδα νευροπεπτιδίων, εξαιτίας της απώλειας του NEP και τα LNCaP να έχουν την εντελώς αντίθετη εικόνα [556].

Σε επέκταση της προηγούμενης μας έρευνας, δείξαμε επίσης ότι αυτά τα δύο μονοπάτια αλληλεπιδρούν απευθείας μεταξύ τους, και ότι αυτές οι συσχετίσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη, ενώ μπορούν να αποτελέσουν και έναν συνδυαστικό πιθανό κλινικό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία των ασθενών με προχωρημένου σταδίου ορμονο-άντοχο καρκίνο του προστάτη [562].

Συγκεκριμένα, δείχτηκε ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις των νευροπεπτιδίων ET-1 και BBS επήγαγαν την πυρηνική μετατόπιση του NF-kB στα PC3 κύτταρα με επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-kB ως μεταγραφικού παράγοντα, όπως επιβεβαιώθηκε από την αυξημένη δέσμευσή του στο DNA με τα πειράματα EMSA. Επίσης, αυτή η δράση στον παράγοντα NF-kB αποδόθηκε εξόλοκληρου στα NPs, καθώς η EMSA ως πιο ευαίσθητη τεχνική αποκάλυψε στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα της δεσμευτικής ικανότητας του NF-kB στα LNCaP κύτταρα που εκφράζουν την νευροπεπτιδάση NEP, ενώ επώαση των PC3 κυττάρων με την rhNEP παρεμπόδισε αποτελεσματικά την πυρηνική μετατόπιση του NF-kB και την ενεργοποίησή του. Περαιτέρω πειράματα αναστολής των αντίστοιχων υποδοχέων των νευροπεπτιδίων, επιβεβαίωσαν ότι η αυξορύθμιση του NF-kB είναι NP-επαγόμενη, και ότι η δράση αυτή μεσολαβείται κυρίως μέσω του ET<sub>A</sub>R υποδοχέα [562].

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα NPs μπορούν να επάγουν την 20 S πρωτεασωματική δραστηριότητα [561, 562] σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης από αυτούς που απαιτούνται για την επίτευξη της NF-kB ενεργότητας, δείχνοντας ότι η αύξηση στην πρωτεασωματική δραστηριότητα συμβαίνει αρκετά νωρίς μετά την NP διέγερση και προηγείται της πυρηνικής μετατόπισης του NF-kB. Αυτό ίσως δείχνει ότι τα NPs επάγουν την πρωτεασωματική δραστηριότητα και όταν αυτή φτάσει σε ένα κρίσιμο επίπεδο διεγείρουν την NF-kB ενεργότητα μέσω μείωσης των ολικών IκBa επιπέδων. Τα LNCaP κύτταρα έχουν ενδοκυττάρια έκφραση της NEP και μειωμένη έκφραση του ECE-1, οδηγώντας σε αποικοδόμηση της παρακρινούς εκκρινόμενης ET-1 και σε μειωμένη παραγωγή του πεπτιδίου. Για αυτό στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά η εφαρμογή ακόμη και υψηλών δόσεων της ET-1, δεν κατάφερε να επάγει την 20S πρωτεασωματική δραστηριότητα και την πυρηνική μετατόπιση του NF-kB, μέσω μείωσης των επιπέδων του IκBa [562].

Ο ακριβής μηχανισμός της επαγωγής της 20S πρωτεασωμικής δραστηριότητας από τα NPs δεν είναι γνωστός. Ίσως η NP-μεσολαβούμενη αύξηση στα επίπεδα του IκΒα οδηγεί σε επαγωγή του πρωτεασώματος από το υπόστρωμα., ενώ απευθείας αλληλεπίδραση των οδών NPs και UPS ή NF-κΒ-εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης ρυθμιστικών συστατικών του UPS μονοπατιού δεν μπορούν να αποκλειστούν και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση [562].

# 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

---

## 2.1. ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Το bortezomib γνωστό με το κωδικό όνομα PS-341 και το εμπορικό όνομα VELCADE είναι ο πρώτος σε κλινική εφαρμογή αναστολέας πρωτεασώματος που εγκρίθηκε το Μάιο του 2003 από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία του επιδεινούμενου και υποτροπιάζοντος πολλαπλού μυελώματος (MM), σε ασθενείς οι οποίοι έχουν ήδη υποβληθεί τουλάχιστον μία φορά σε θεραπεία [269] και του λεμφώματος μανδύα [289].

Παρόλη όμως την κλινική επιτυχία του συγκεκριμένου φαρμάκου στο πολλαπλό μυέλωμα [128], η ανθεκτικότητά του συνεχίζει να παραμένει ένα κλινικά σημαντικό πρόβλημα. Μελέτες του bortezomib που πραγματοποιήθηκαν σε διαγνωσμένους ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, έδειξαν ότι το 52% δεν κατάφερε να έχει ανταπόκριση στη θεραπεία και ότι η πλειοψηφία αυτών που ανταποκρίνεται τελικά υποτροπιάζει [348, 349].

Τα νευροπεπτίδια (NP's) και κυρίως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1 axis) έχει βρεθεί να συνδέονται με την ανάπτυξη και την πρόοδο διαφόρων τύπων καρκίνου, αποτελώντας ήδη έναν από τους βασικούς στόχους της αντικαρκινικής θεραπείας. Οι δράσεις της ET-1 μεσολαβούνται μέσω των υποδοχέων της, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R. Παρόλο που ο ET<sub>A</sub>R έχει βρεθεί να παίζει έναν ρόλο-κλειδί στους περισσότερους συμπαγείς όγκους, ο ET<sub>B</sub>R πρόσφατα έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη του ολιγοδενδρογλοιοβλαστώματος και του μελανώματος. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε κλινικά δείγματα και κυτταρικές σειρές μελανώματος ταυτοποίησαν τον ET<sub>B</sub>R ως έναν βασικό προγνωστικό δείκτη που σχετίζεται με έναν πιο επιθετικό φαινότυπο [510].

Παρόλο που ο άξονας της ET-1 έχει μελετηθεί με ιδιαίτερη λεπτομέρεια στους συμπαγείς όγκους, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον ρόλο του στο ΠΜ. Σε μία μόνο πρόσφατη μελέτη οι *Zhan et al, 2006* ανέφεραν έναν νέο υπότυπο της ασθένειας, τον LB (Low bone disease class) που συνιστά ~12% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών και ο οποίος διακρίνεται από τις υπόλοιπες μοριακές υποομάδες από υπερέκφραση της ET-1 και από στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του DKK-1, προτείνοντας

ίσως ότι η ET-1 μειορυθμίζει τον συγκεκριμένο παράγοντα στα ΠΜ κύτταρα [553, 554].

Το μονοπάτι UPS έχει βρεθεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ΠΜ, καθώς υψηλά επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας έχουν αναφερθεί στα ΠΜ κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στην δράση των πρωτεασωμικών αναστολέων. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι οι οδοί NER/NPs και NF-Kb/UPS, οι οποίοι συνιστούν δύο βασικά συστήματα που εμπλέκονται στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη [630, 631], αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ET-1 επήγαγε μία σταδιακή αύξηση της δραστηριότητας του 20S πρωτεασώματος και των επιπέδων του NF-kB στην PC3 προστατική καρκινική κυτταρική σειρά [561, 562].

Παρόλα αυτά, προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν στην δράση της οδού της ET-1 ή/και στις πιθανές αλληλεπιδράσεις της με την οδό ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος στο ΠΜ δεν υπάρχουν. Δεδομένου ότι η ανθεκτικότητα στο BTZ συνιστά ένα σημαντικό κλινικά πρόβλημα, η ακριβής μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών και των παραγόντων σε κυτταρικό επίπεδο που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας αποτελεί προϋπόθεση για την εξέλιξη και βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης και της ποιότητας ζωής των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα.

Στα πλαίσια λοιπόν αυτά, σκοπός της παρούσας ερευνητικής πρότασης είναι για πρώτη φορά, η διερεύνηση του ρόλου του άξονα ET-1/ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R και των πιθανών συσχετίσεων/αλληλεπιδράσεων του με το UPS μονοπάτι ως έναν πιθανό μηχανισμό ανθεκτικότητας στο bortezomib, με απώτερο στόχο το σχεδιασμό νέων δυναμικά συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών με υποτροπιάζον και επιδεινούμενο πολλαπλό μυέλωμα.

Για τις *in vitro* μελέτες επιλέχτηκαν 2 ανθρώπινες ΠΜ καρκινικές κυτταρικές σειρές (Human Multiple Myeloma Cell Lines, HMCLs) που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο bortezomib- μία ευαίσθητη (NCI-H929) και μία ανθεκτική (RPMI-8226).

Αναλυτικά οι επιμέρους στόχοι της παρούσας έρευνας ήταν:

- η ανίχνευση σε αρχικό επίπεδο των βασικών παραγόντων του άξονα της ET-1- του προσδέτη ET-1, των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R και του σχετιζόμενου με τον άξονα ενζύμου CD10 (NEP/νευροπεπτιδάση)- στις ΠΜ κυτταρικές σειρές.
- η επιβεβαίωση των διαφορικών επιπέδων ευαισθησίας των ανωτέρω ΠΜ κυτταρικών σειρών στο BTZ με πειράματα αναστολής του πολλαπλασιασμού.
- η μελέτη του ρόλου της ET-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συσχέτιση με την μεσολαβούμενη από το BTZ αναστολή του.
- η ανίχνευση του μοριακού μηχανισμού διαφυγής από το BTZ, μέσω διερεύνησης των συσχετίσεων/αλληλεπιδράσεων της οδού της ET-1 με την οδό UPS.
- η μελέτη των ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης μέσω των οποίων ο άξονας της ET-1 συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ.
- η διερεύνηση του ρόλου των ET-1 υποδοχέων στην χημειοευαισθησία στο BTZ, μέσω παρεμπόδισης του άξονα ET-1/ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R είτε με τη χορήγηση των κατάλληλων ανταγωνιστικών πεπτιδίων είτε μέσω αποσιώπησης των γονιδίων που εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς.

### 2.2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η αντίσταση στην αναστολή του πρωτεασώματος από το bortezomib εμπλέκει μηχανισμούς νευροπεπτιδίων (κυρίως της ET-1). Συγκεκριμένα:

1) Οι υποδοχείς της ET-1, ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R εκφράζονται στα μυελωματικά κύτταρα.

2) Τα αυξημένα επίπεδα της ET-1 έχουν θετική συσχέτιση με την αύξηση της λειτουργίας του πρωτεασώματος στα μυελωματικά κύτταρα.

3) Η επαγόμενη από την ET-1 αύξηση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας συμβάλλει στην εμφάνιση αντίστασης στο bortezomib στο πολλαπλό μύελωμα.

4) Αναμένεται ότι η παρεμπόδιση του άξονα ET-1/ ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R με τη χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων αυξάνει την ευσθησία στο bortezomib.

### 2.3. ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Τα συμπεράσματα από την έρευνα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος σχεδιάζεται να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω έρευνα *in vivo* με απώτερο στόχο την κλινική τους εφαρμογή. Η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ET-1/ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R μεσολαβούμενη χημειοαντοχή στο BTZ μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό περαιτέρω κλινικών μελέτων για την ενίσχυση της κλινικής αποτελεσματικότητας, τη μείωση της τοξικότητας και την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στο BTZ σε κλινικά υποτροπιάζοντες ΠΜ ασθενείς.



# 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 3.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος (Human Multiple Myeloma Cell Lines, HMCLs) **RPMI-8226** και **NCI-H929**, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιεργειών (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Health Protection Agency, Salisbury, UK). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 10% ορό βόειας προέλευσης (Foetal, Bovine Serum; FBS), 2 mM L-Glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin (Gibco, UK), ενώ για την περίπτωση των NCI-H929 κυττάρων και με 50 uM 2-Mercaptoethanol. Η επώασή τους πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, με ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> / 95% αέρα και υγρασία 100%. Τα πειράματα έγιναν κατά προτίμηση σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Τα θρεπτικά υλικά των καλλιεργειών ανανεώνονταν ανά 48 ώρες και τα πειράματα πραγματοποιούνταν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην λογαριθμική αύξηση και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επιστροφή σε κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο αιματοκυτταρομετρίας με Trypan Blue. Όλα ή μέρος των κυττάρων στην κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετούνταν σε νέες φλάσκες για ανακαλλιέργεια ή στα κατάλληλα υποστρώματα για την εκτέλεση συγκεκριμένων πειραμάτων. Τα κύτταρα καταψύχονταν, σε τακτά χρονικά διαστήματα, στους -160°C έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5x10<sup>6</sup> κυττάρων τοποθετείται σε σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης, και προστίθεται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση σε αναλογία 1:1 το κατάλληλο για κατάψυξη υλικό. Ενώ η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιούνταν σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους, η απόψυξη τους ήταν γρήγορη κι άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάρια με τα κύτταρα, θερμαίνονταν στους 37°C και άμεσα διαλύονταν σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ίδιας θερμοκρασίας. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 900 rpm για 5 λεπτά και επανακαλλιέργεια όπως παραπάνω. Τα αντιδραστήρια και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιέργεια των κυττάρων φαίνονται στον **πίνακα 3.1**.

**Πίνακας 3.1:** Αντιδραστήρια και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιέργεια των κυττάρων

Αντιδραστήριο	Όνομα Προϊόντος	Προέλευση
Θρεπτικό	RPMI-1640	Gibco, UK
Βόειος Ορός	Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, UK
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	Penicillin/Streptomycin	Gibco, UK
L-Γλουταμίνη	L-Glutamine	Gibco, UK
B-Μερκαπτοαιθανόλη	b-Mercaptoethanol (31350010)	Gibco, UK
Χρωστική Trypan blue	Trypan Blue	Sigma-Aldrich
Υλικό κατάψυξης	Cell-Freezing Medium-DMSO	Sigma-Aldrich
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή	Neubauer	
Μικροσκόπιο ορατού φωτός		Zeiss, Axiovert 40C
Επωαστικός κλίβανος		Bioair, Safeflow 1.2

### 3.2. Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης ενδοθηλίνης-1 (ET-1 ELISA)

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 0.5% FBS και ακολούθως συλλέχτηκαν τα υπερκείμενα θρεπτικά καλλιεργητικά υλικά και τα 0.5% CHAPS ((3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane sulfonate) κυτταρικά λύματα. Η μέτρηση των επιπέδων της ET-1 πραγματοποιήθηκε με μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο που βασίζεται στην τεχνική double-sandwich (IBL International) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Πριν από αυτό, τα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά υπέστησαν λυοφιλίωση σε Speed Vac συμπυκνωτή και τα λυοφιλιωμένα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 100ul buffer του ELISA κιτ. Η ειδικότητα της μεθόδου για την ανίχνευση ενδοθηλίνης 1 είναι 100%, με διασταυρούμενες αντιδράσεις ως εξής: 0.1% για την ενδοθηλίνη 3, και <0.1% για την ενδοθηλίνη 1 (1-31), την ενδοθηλίνη 2 (1-31) και την μεγάλη ανθρώπινη ενδοθηλίνη 1 (big-endothelin-1). Το χρωμογόνο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της αντίδρασης ήταν διάλυμα TMB (υπόστρωμα υπεροξειδάσης [HRP] για ELISA). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm σύμφωνα με τις προδιαγραφές του πακέτου με τη χρήση microplate reader (BIO-TEK Instruments). Η συγκέντρωση της ET-1 στο υπερκείμενο θρεπτικό υλικό της

καλλιέργειας κυττάρων υπολογίσθηκε σε pg/ml με βάση υπολογισμένη πρότυπη καμπύλη απορρόφησης.

#### 3.3. Προσδιορισμός ενζυματικής δραστηριότητας NEP

Πραγματοποιήθηκε χρωματομετρικός προσδιορισμός δραστηριότητας NEP στα 0.5% CHAPS ολικά πρωτεϊνικά κυτταρικά λύματα, με χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος Suc-Ala-Ala-Phe-pNa όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως [555]. Η λύση με 0.5% CHAPS δεν επηρεάζει την ενζυματική δραστηριότητα της NEP. Συνοπτικά, για την μέτρηση της ενζυματικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα Suc-Ala-Ala-Phe-PNA (Bachem Biosciences, Germany). Ενωρήματα εκχυλίσματος κυτταρικών μεμβρανών (30ul) που παράχθηκαν με λύση με διάλυμα CHAPS προστέθηκαν σε ένα μίγμα με την παρακάτω σύνθεση: 200ul 100mM Tris-HCl, pH 7.6, 10ul 20mM υποστρώματος (διαλυμένο σε δι-μεθυλ-σουλφοξείδιο) και 10ul διαλύματος αμινοπεπτιδάσης M(N). Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για 10 λεπτά. Η αντίδραση διεκόπη με την προσθήκη διαλύματος 10% τριγλωροοξικού οξέος και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2500 rpm για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, 250ul από το υπερκείμενο συλλέχθηκαν για ανάλυση μετά από προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε τριβλία 96 θέσεων. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540nm χρησιμοποιώντας μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac. Μίγμα χωρίς προσθήκη εκχυλισμάτων κυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση της τιμής του μάρτυρα. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου σε βασική κατάσταση (baseline) μετρήθηκε σε pg του μετατρέποντος υποστρώματος ανά ug πρωτεΐνης ανά λεπτό. Οι τιμές συγκρίθηκαν με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης που δημιουργήθηκε για το συγκεκριμένο υπόστρωμα και με μια καμπύλη ενζυματικής δραστηριότητας της thNEP, που δημιουργήθηκε για υπολογισμό των  $K_m$  και  $V_{max}$ . Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη νευροπεπτιδάση (thNEP) ήταν ευγενική χορηγία του Dr. David Nanus, Weill Cornell Medical College, New York, USA. Διαφορές στην ενζυματική δραστηριότητα NEP μετά από διαφορετικές επώσεις υπολογίστηκαν ως εκατοστιαίο ποσοστό αύξησης ή μείωσης από τα βασικά επίπεδα ενζυματικής δραστηριότητας.

### 3.4. Δοκιμασία μεθύλ-τριαζολύλ-τετραζολίου (MTT Assay)

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εκτιμήθηκε με την χρωματομετρική δοκιμασία 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) (Applichem, Germany, GmbH). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι δεϋδρογονάσες που εκφράζονται από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα μετατρέπουν το MTT σε ένα αδιάλυτο ενδοκυττάριο προϊόν φορμαζάνης μωβ χρώματος. Η ποσότητα του προϊόντος φορμαζάνης, όπως μετράται από την οπτική πυκνότητα στα 540nm είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Αναλυτικά, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.2**.

Περίπου  $15 \times 10^3$  κύτταρα επιστρώθηκαν σε 100ul θρεπτικού που περιέχει 0.5% FBS σε πιάτα 96 θέσεων επίπεδης επιφάνειας και επώαστηκαν αρχικά με 0.1uM ETRs ανταγωνιστές για 30min, μετά με 100nM ET-1 για 24h και κατόπιν με 2nM BTZ (ή 5nM επιλεκτικά για ορισμένα πειράματα στα RPMI-8226 κύτταρα) για επιπλέον 24h (**Πίνακας 3.3**). Ακολούθως, το MTT (5mg/ml σε PBS) προστέθηκε σε τελική συγκέντρωση 0.5mg/ml ανά well και τα κύτταρα επώαστηκαν για 4h στους 37°C. Μετά το πέρας των 4h, το πιάτο φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm για 20 min και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Το προϊόν φορμαζάνης διαλύθηκε σε 150ul DMSO και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540nm σε έναν microplate reader (BIO-TEK Instruments). Το ποσοστό επιβίωσης υπολογίστηκε από τον εξής τύπο:  $(OD_{\text{treated cells}} - OD_{\text{Blank}}) / (OD_{\text{untreated cells}} - OD_{\text{Blank}})$ . Οι αντίστοιχες IC50 τιμές υπολογίστηκαν από μία καμπύλη δόσης-απόκρισης.

**Πίνακας 3.2:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

Αντιδραστήριο	Cat. Nr.	Προέλευση
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Biochemica BC	A2231	Applichem, Germany, GmbH
Bortezomib		Janssen-Cilag Pharmaceuticals, Greece
Endothelin-1 (ET-1)	023-01	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Germany
Endothelin B Receptor Antagonist (BQ-788)	023-38	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Germany
Endothelin A Receptor Antagonist (BQ-123)	023-34	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Germany

**Πίνακας 3.3:** Πειραματικές συνθήκες επώασης των ΠΜ κυτταρικών σειρών με τους αγωνιστές/ανταγωνιστές στο MIT assay

Σειρά Προσθήκης των Αντιδραστηρίων	Συγκέντρωση	Χρόνος Επώασης
1. ETRs Antagonists (BQ788 ή BQ123)	0.1 $\mu$ M	30 min
2. ET-1	100 nM	24 h
3. BTZ	2 nM	24 h

#### 3.5. Πρωτεασωματική Δραστηριότητα

$5 \times 10^5$  κύτταρα επώαστηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό με 0.5% FBS με 0.1  $\mu$ M ETRs ανταγωνιστές για 30min και κατόπιν με 100nM ET-1 για 2h και ακολούθως με 2nM BTZ για 30min (Πίνακες 3.2 & 3.4). Μετά το πέρας των επώασεων, εκτιμήθηκε η χυμοθρυψική δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος σε 0.5% CHAPS ολικά πρωτεϊνικά κυτταρικά λύματα με τη χρήση μιας εμπορικά διαθέσιμης φθοριομετρικής μεθόδου που βασίζεται στο φθορίζον υπόστρωμα 7-

Amino-4- methylcoumarin (AMC) (Chemicon International, USA). Συνοπτικά, η δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστηριότητας εκτελέστηκε σε τριβλίο 96 θέσεων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Σε κάθε θέση δείγματος προς ανάλυση τοποθετήθηκαν 10ul συμπυκνωμένου (10x) ρυθμιστικού διαλύματος, 10ul του πρωτεασωμικού υποστρώματος LLVY-AMC (Λευκίνη-λευκίνη-βαλίνη-τυροσίνη-7-αμινο-4-μεθύλ-κουμαρίνη), 30ul του προς ανάλυση δείγματος και 50ul αποσταγμένου ύδατος. Ο συνολικός όγκος ήταν 100 ul. Στις θέσεις-μάρτυρες με υπόστρωμα αντί για δείγμα τοποθετήθηκαν 20 ul επιπλέον αποσταγμένου ύδατος ώστε να συμπληρώνεται και πάλι ο συνολικός όγκος των 100 ul ενώ στις θέσεις-μάρτυρες χωρίς υπόστρωμα τέθηκαν 90ul αποσταγμένου ύδατος αντί για δείγμα και υπόστρωμα ώστε να συμπληρώνεται ο συνολικός όγκος των 100 ul. Τα τριβλία επώασθηκαν για μία ώρα στους 37°C. Οι μετρήσεις έγιναν σε μετρητή πολλαπλών ενδείξεων Victor Wallac<sup>TM</sup> με μήκος κύματος διέγερσης 380nm και μήκος κύματος εκπομπής 490nm. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση των τιμών των μαρτύρων με και χωρίς υπόστρωμα. Η φθοριομετρική καταγραφή της ενζυματικής δραστηριότητας σταθερής κατάστασης (baseline) εκφράσθηκε σε RFU/μg της συνολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές συγκρίθηκαν έναντι μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε για το φθορίζον υπόστρωμα (LLVY-AMC) και μιας καμπύλης δραστηριότητας κεκαθαρμένου πρωτεοσώματος 20S που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι αλλαγές στην πρωτεασωμική δραστηριότητα μετά τις διάφορες επώσεις εκφράσθηκαν ως ποσοστιαία αύξηση ή μείωση σε σχέση με τη δραστηριότητα σταθερής κατάστασης κάθε κυτταρικής σειράς.

**Πίνακας 3.4:** Πειραματικές συνθήκες επώασης των ΠΜ κυτταρικών σειρών με τους αγωνιστές/ανταγωνιστές στα πειράματα πρωτεασωμικής δραστηριότητας και ανοσοαποτύπωσης

Σειρά Προσθήκης των Αντιδραστηρίων	Συγκέντρωση	Χρόνος Επώασης
1. ETRs Antagonists (BQ788 ή BQ123)	0.1 $\mu$ M	30 min
2. ET-1	100 nM	2 h
3. BTZ	2 nM	30 min

### 3.6. Ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Η τεχνική Western blot είναι μία ευρέως αποδεκτή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών στο εκάστοτε δείγμα του ομογενοποιημένου ιστού ή του εκχυλίσματος. Χρησιμοποιεί ηλεκτροφόρηση πηκτής προς διαχωρισμό των φυσικών πρωτεϊνών από την τρισδιάστατη δομή τους ή των μετουσιωμένων πρωτεϊνών από το μήκος του πολυπεπτιδίου. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF), όπου χρωματίζονται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο.

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των σταδίων και της πειραματικής πορείας της τεχνικής ενώ οι λεπτομέρειες των αντιδραστηρίων και των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των σχετικών πειραμάτων παρουσιάζονται στους **Πίνακες 3.5** και **3.6**. Για την ανίχνευση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης τα κύτταρα επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας (10% FBS), ενώ για τη μελέτη των ET-1-εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών εφαρμόστηκαν οι πειραματικές συνθήκες της πρωτεασωμικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επώαστηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό με 0.5% FBS με 0.1 $\mu$ M ETRs ανταγωνιστές για 30min και κατόπιν με 100nM ET-1 για 2h και ακολούθως με 2nM BTZ για 30min (**Πίνακες 3.2 & 3.4**). Μετά το πέρας των επώασεων, τα κύτταρα συλλέχτηκαν, και ακολούθησε λύση τους, απομόνωση των κυτταρικών πρωτεϊνών και ανάλυση των τελεστών μορίων των μονοπατιών MAPK και PI3K/Akt/mTOR, p44/42, p-p44/42, Akt, p-Akt, p70S6K, p-p70S6K με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.



### 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

**Πίνακας 3.5:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πρωτεϊνική ανάλυση των δειγμάτων

Αντιδραστήριο	Όνομα Προϊόντος	Αρ. καταλόγου	Προέλευση
Αναστολείς Πρωτεασών	100x pl cocktail	5872S	Cell Signalling Technology
Αναστολείς Φωσφατασών	100x phosphatase inhibitors	5870S	Cell Signalling Technology
Bradford χρωστική	1xQuickstart Bradford dye	500-0205	Biorad
Προκατασκευασμένα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου	NuPAGE, 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mmx10 well	NP0321BOX	Invitrogen, Life Technologies
Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	NuPAGE, MES SDS Running Buffer, 20X	NP0002	Invitrogen, Life Technologies
Ρυθμιστικό διάλυμα LDS	LDS sample buffer 4x	NP0007	Invitrogen, Life Technologies
Αποδιατακτικός παράγοντας	NuPAGE, Sample reducing agent, 10X	NP0004	Invitrogen, Life Technologies
Διάλυμα Transfer	NuPAGE, Transfer Buffer, 20X	NP0006	Invitrogen, Life Technologies
Prestained marker	Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa)	P7712S	NEB, UK
Μεμβράνες PVDF	PVDF ImmunoBlot Membrane, for Protein blotting (0,2μM)	162-0177	Biorad
Μεθανόλη	Methanol	34860	Sigma-Aldrich
Χρωστική Ponceau	Ponceau S		Sigma-Aldrich
ECL Chemiluminescence reagent	Western blotting Luminol reagent	sc-2048	Santa Cruz Biotechnology

**Πίνακας 3.6:** Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση

Αντιδραστήριο	Αραίωση	Προέλευση
ET <sub>A</sub> R rabbit pAb	1:1,500	Abcam, Cambridge, UK (ab84673)
ET <sub>B</sub> R rabbit mAb	1:1000	Abcam, Cambridge, UK (EPR7013/ab129102)
CD10 mouse mAb (clone 56C6)	1:1000	Novocastra (Clone 56C6)
Actin mouse mAb (clone AC-40)	1:10,000	Sigma-Aldrich, UK (Clone AC-40)
phospho-Akt (Ser473) rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Total Akt rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p44/42 MAPK (Erk 1/2) rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
phospho-p70 S6 kinase (Thr389) rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p70 S6 kinase rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

#### 3.6.1. Απομόνωση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών, τα κυτταρικά ιζήματα ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS 1x και διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης με σύσταση 10mM Tris-HCL pH 7.5, 150mM NaCl, 10% γλυκερίνη, 1% Triton X-100 και 50 mM EDTA, το οποίο περιείχε ένα μίγμα από αναστολείς πρωτεασών (PMSF, Aprotinin,

Leupeptin) και φωσφατασών ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaF). Ακολούθησε ισχυρή ανακίνηση 3 φορές για 30 sec (vortex), πέρασμα των δειγμάτων από needle 25G και παραμονή τους στον πάγο για 15min. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000rpm για 10min, απομακρύνθηκαν οι μη διασπασμένες πρωτεΐνες και συλλέχθηκε το υπερκείμενο.

Η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του ομογενοποιημένου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας το πακέτο Bradford 1x Quickstart (Biorad), με τη βοήθεια σπεκτροφωτομέτρου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης. Μικροποσότητα του δείγματος (10  $\mu\text{l}$ ) αναμίχθηκε με το ειδικό διάλυμα αντιδραστηρίου Bradford και ακολούθησε μέτρηση στο σπεκτροφωτόμετρο (das Digital and Analog Systems, Italy) και ποσοτικοποίηση του δείγματος με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).

#### 3.6.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να μετακινούνται όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο και σε τιμές pH διαφορετικές από το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ταχύτητα μετατόπισης εξαρτάται από το λόγο του φορτίου που φέρουν προς τη μάζα τους. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών μορίων επιτυγχάνεται μέσω των πόρων που σχηματίζονται μέσα στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από την απόλυτη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου στα διαλύματα του πηκτώματος. Η έναρξη του πολυμερισμού καθορίζεται από την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και επιταχύνεται παρουσία N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλο-διαμίνης (TEMED). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS,  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη). Το SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) είναι ένα ανιονικό

απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών.

### 3.6.2.1. Πειραματική διαδικασία

Για την Western blot ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Invitrogen (the XCell Sure Lock MiniCell manual, IM-9003 and the XCell II Blot module manual IM-9051). Όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την Invitrogen. Περιληπτικά, η διαδικασία είχε ως εξής: 20-40ug πρωτεΐνης διαλύθηκαν σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος LDS, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 min για την επίτευξη της πλήρους αποδιάταξής τους και οι πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν σε πάγο ώσπου να ηλεκτροφορηθούν. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το NuPAGE MES SDS Running Buffer 20 X (50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3) αραιωμένο κατά 20 φορές (50 ml running buffer+950 ml H<sub>2</sub>O). Το παραπάνω διάλυμα προστέθηκε στον ανώτερο θάλαμο της ηλεκτροφορητικής συσκευής (κάθοδος) ενώ στον κατώτερο θάλαμο (άνοδος) προστέθηκε τα υπόλοιπα 800 ml του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν είτε στα εμπορικά διαθέσιμα προκατασκευασμένα NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris είτε στα 10% SDS-PAGE πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, με τη χρήση ενός προεχρωσμένου δείκτη πρότυπων μοριακών βαρών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 200V και 120mA με το σύστημα XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen). Ακολουθεί η προετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τον οδηγό της κατασκευάστριας εταιρείας, Invitrogen (**Εικόνα 3.1**).

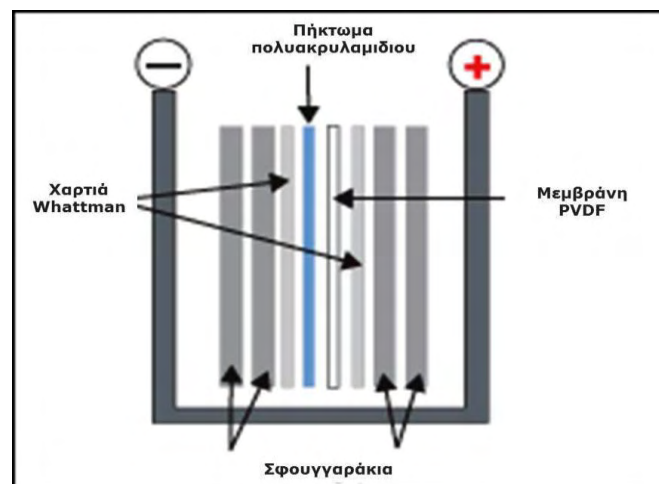


**Εικόνα 3.1:** Απεικόνιση του τρόπου προετοιμασίας της συσκευής για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων [[http://www.lifetechnologies.com/1/1/14473-xcell-surelock-mini-cell-xcell-ii-blot module.html](http://www.lifetechnologies.com/1/1/14473-xcell-surelock-mini-cell-xcell-ii-blot-module.html)].

#### 3.6.3. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Σε αυτό το στάδιο οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF όπου και αποτυπώθηκαν όπως ακριβώς διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση. Για την ανοσοαποτύπωση τα χαρτιά Whattman και τα σφουγγαράκια (filter pads) εμποτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που περιείχε 50 ml NuPAGE, Transfer Buffer, 20X, 100 ml μεθανόλης και 849 ml H<sub>2</sub>O. Η μεμβράνη εμποτίστηκε σε 100% μεθανόλη για ~20 sec και ακολούθησε εμβάπτιση της στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για τουλάχιστον 5 min. Στη συνέχεια, το πήκτωμα και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή υγρής μεταφοράς XCell II™ Blot Module με την εξής σειρά: από την κάθοδο προς την άνοδο: filter pads- Whattman- πήκτωμα- μεμβράνη PVDF- Whattman- filter pads (Εικόνα 3.2). Η επίστρωση έγινε με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες σε κανένα σημείο του sandwich και η συσκευή υγρής μεταφοράς τοποθετήθηκε στο σύστημα XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System. Η μεταφορά διήρκεσε 90 min σε σταθερή τάση (35V), ενώ το ρεύμα έφτασε τα 210 mA. Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς ακολούθησε χρώση της μεμβράνης με Ponceau S προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη και η ισοφόρτωση ή μη των πρωτεϊνών. Έπειτα η μεμβράνη αποχρωματίστηκε με 2 πλύσεις με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και με διάλυμα πλύσης TBST buffer (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl and 0.1% Tween-20). Ακολούθησε μπλοκάρισμα της μεμβράνης σε blocking διάλυμα (5% FBS σε TBST) για μιάμιση ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση (Shaker VXR Vibrax, IKA-Janke and Kunhel, Germany). Μετά,

η μεμβράνη επώαστηκε overnight στους 4°C με τα αντίστοιχα αντισώματα (Πίνακας 3.6) αραιωμένα σε blocking buffer. Μετά από 3 ξεπλύματα της μεμβράνης με το διάλυμα πλύσης, ακολούθησε επώασή της για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με τα αντίστοιχα 2<sup>ο</sup> αντισώματα HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology), αραιωμένα 1:4000 σε blocking buffer υπό ήπια ανάδευση. Τέλος, μετά από 3 ξεπλύματα με το διάλυμα πλύσης, ακολούθησε η ανίχνευση του σήματος με χημειοφωτάγεια (ECL kit) με τη χρήση του λογισμικού UVIAAlliance.



**Εικόνα 3.2:** Διάταξη μεμβράνης-πηκτώματος κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών

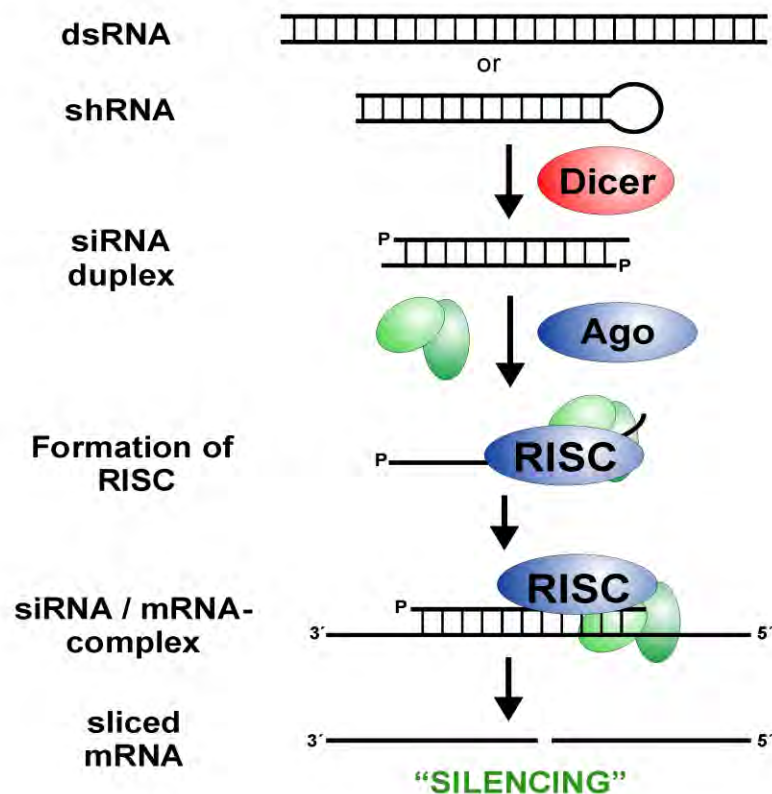
### 3.7. Αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R με siRNA

#### 3.7.1. Αρχή της μεθόδου

Η παρεμβολή του RNA ή RNAi (RNA interference) όπως αποκαλείται, αναφέρεται στην μετα-μεταγραφική σίγηση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρομοριακού παρεμβατικού RNA (small interfering RNA - siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου-στόχου. Το φαινόμενο της σίγησης ενός γονιδίου μέσω του RNAi ανακαλύφθηκε αρχικά στον νηματοειδή σκόληκα *Caenorhabditis elegans* από τους Fire και Melo το 1998 και αποτελεί έναν φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλωνα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας.

Πιθανόν είναι αποτέλεσμα εξελικτικών μηχανισμών για την καταπολέμηση ιϊκών λοιμώξεων και μεμονωμένων γενετικών στοιχείων τα οποία εξαπλώνονται χρησιμοποιώντας ως γενετικό υλικό δίκλωνο RNA (dsRNA). Ο μηχανισμός αυτός απαντάται σε όλα τα μέλη του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Στα κύτταρα των θηλαστικών ωστόσο, έχει αντικατασταθεί από άλλους πιο εξελιγμένους αμυντικούς μηχανισμούς.

Η γονιδιακή σίγηση μέσω της οδού του RNAi ενεργοποιείται από την ύπαρξη ενός δίκλωνου μορίου RNA. Το ένζυμο Dicer το οποίο ανήκει στην οικογένεια των RNAσών III κόβει το δίκλωνο RNA σε τμήματα μήκους 22 περίπου νουκλεοτιδίων, τα αποκαλούμενα μικρά παρεμβατικά RNAs (siRNAs). Τα siRNAs ξετυλίγονται και η μία από τις δύο έλικες ενσωματώνεται σε ένα σύμπλεγμα μορίων που συνιστούν τη νουκλεάση RISC (RNA-induced silencing complex - RNA-σύμπλοκο που επάγει τη γονιδιακή σίγηση). Η έλικα του δίκλωνου RNA που ενσωματώνεται στο RISC υβριδίζεται με το συμπληρωματικό RNA-στόχο ενεργοποιώντας τη νουκλεάση μέσα στο σύμπλοκο RISC η οποία κατακερματίζει τον στόχο (**Εικόνα 3.3**). Το RISC έχει τη δυνατότητα να ανακυκλωθεί και να αποικοδομήσει πολλά mRNA-στόχους. Συνεπώς, από μια αλληλουχία που έχει εισαχθεί σε ένα κύτταρο σε περιορισμένη ποσότητα, καθίσταται δυνατή η σίγηση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού μορίων mRNA.



**Εικόνα 3.3:** Ο μηχανισμός της παρεμβολής των RNA. Τα δίκλινα μόρια του RNA (dsRNAs) μετατρέπονται από το ένζυμο DICER σε μικρά, παρεμβατικά RNAs (si-RNAs) 21-23 νουκλεοτιδίων σε μήκος με δυο νουκλεοτιδία να υπερεκτείνονται σε κάθε άκρο. Το ξεδίπλωμα του RNA από μια ελίκωση οδηγεί στην ένωση των ενός κλώνου του RNA (του antisense) με το ανεργό σύμπλοκο RISC. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται το RISC και αποικοδομεί το mRNA που φέρει την ομόλογη αλληλουχία [<http://www.gene-quantification.de/si-rna.html>].

### 3.7.2. Πειραματική διαδικασία

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R, έγινε διαμόλυνση των RPMI-8226 κυττάρων με το αντίστοιχο ριβονουκλεοτίδιο, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο δημιουργίας λιποσωμάτων με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen) και ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Ως αρνητικό δείγμα siRNA χρησιμοποιήθηκε το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών. Αναλυτικά τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.7**. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο «αντίστροφης διαμόλυνσης» (reverse



transfection) το οποίο ενδείκνυται για την αποτελεσματικότερη διαμόλυνση κυττάρων σε αιώρημα όπως τα RPMI-8226.

Αρχικά έγινε προετοιμασία των λιποσωμάτων. Τα siRNA και το αντιδραστήριο Lipofectamine 2000 RNAiMAX, αραιώθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας που περιείχαν θρεπτικό μέσο χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Τα τρυβλία ανακινήθηκαν καλά και επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να δημιουργηθούν τα λιποσώματα που περιέχουν το siRNA έναντι του ET<sub>B</sub>R. Στη συνέχεια τα κύτταρα αραιώθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 2,5% ορό χωρίς αντιβιοτικά, προστέθηκαν στα τρυβλία όπου είχαν ήδη σχηματιστεί τα λιποσώματα και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης, 24 h μετά την διαμόλυνση (post-transfection), τα κύτταρα συλλέχτηκαν και ακολούθησε η λύση τους και η ανάλυσή τους με western blot. Εναλλακτικά, για τα πειράματα MTT και πρωτεασωμικής δραστηριότητας, 24 h μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν χωρίς (control) ή με BTZ (2nM) ακολουθώντας κανονικά τις συνθήκες που περιγράφονται αναλυτικά στους **πίνακες 3.3 & 3.4** αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.7:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αποσιώπηση

Αντιδραστήριο	Προέλευση
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen (Life Technologies, Ltd, UK)
Hs-EDNRB-8(5'-CAGAATGATCCCAATAGATGT-3') HP validated siRNA	Qiagen
AllStars siRNA	Qiagen

#### 3.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS για τα Windows (IBM SPSS Statistics version 23). Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι +/- τυπική απόκλιση (SD). Τα αποτελέσματα

υπεβλήθησαν στην στατιστική δοκιμασία One-Way-analysis of Variance (ANOVA) με τη διόρθωση Bonferroni post hoc test. Στην περίπτωση που δεν πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις για το μοντέλο διασποράς (ANOVA), εφαρμόστηκαν και οι μη παραμετρικοί έλεγχοι Kruskal-Wallis και Mann Whitney tests. Το στατιστικά σημαντικό όριο τέθηκε στο  $p < 0.005$ .

# 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### 4.1. Ο άξονας της ET-1 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία του ΠΜ

#### 4.1.1. Οι υποδοχείς ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R εκφράζονται στα ΠΜ κύτταρα

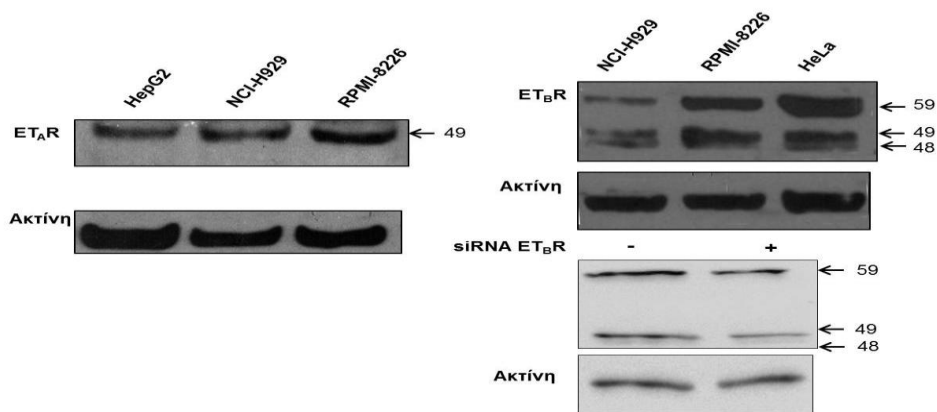
Δεδομένου ότι προς το παρόν δεν υπάρχουν προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τον άξονα της ET-1 στο ΠΜ, τα πειράματα σε αρχικό επίπεδο εστιάστηκαν στην ανίχνευση των βασικών παραγόντων του- του προσδέτη ET-1, των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R και του σχετιζόμενου με τον άξονα ενζύμου CD10 (NEP/νευροπεπτιδάση).

Αρχικά, σκριναρίστηκαν οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές, RPMI-8226 και NCI-H929 για την έκφραση των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε σταθερή κατάσταση (basal culture conditions) με τη μέθοδο της western blot. Για την προτύπωση των συνθηκών της χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ολικά κυτταρικά λύματα προερχόμενα από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HepG2 και HeLa και δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες αραιώσεων του αντισώματος και της πρωτεΐνης. Η ανάλυση με western blot αποκάλυψε ότι και οι 2 υποδοχείς ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R εκφράζονται και στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε μία ζώνη με μοριακό μέγεθος 49 kd για τον ET<sub>A</sub>R, η οποία ήταν παρόμοιου μεγέθους με το αντίστοιχο που έχει περιγραφεί από την κατασκευάστρια εταιρεία του αντι-ETA αντισώματος (Abcam, Cambridge, UK) (**Εικόνα 4.1a**). Αναλόγως, το αντι-ETB αντίσωμα αναγνώρισε 3 ζώνες με μοριακά μεγέθη περίπου 48, 49 και 59 kd αντίστοιχα. Σε αυτή την περίπτωση, για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των ανιχνευόμενων ζωνών πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R, μέσω διαμόλυνσης των RPMI-8226 κυττάρων με το αντίστοιχο siRNA (**βλ. Υλικά & Μέθοδοι παρ. 3.7, εικόνα 4.1a**). Η ανάλυση με Western blot αποκάλυψε αποτελεσματική σίγηση του ET<sub>B</sub>R γονιδίου στα διαμολυσμένα με το αντίστοιχο ριβονουκλεοτίδιο κύτταρα συγκριτικά με τα control (κύτταρα διαμολυσμένα με scramble siRNA) σε ποσοστό ~ 40% και για αυτό το σήμα που λήφθηκε στα συγκεκριμένα μοριακά μεγέθη αποδόθηκε σε εξειδικευμένη δέσμευση του αντισώματος (**Εικόνα 4.1a, 4.1b**).

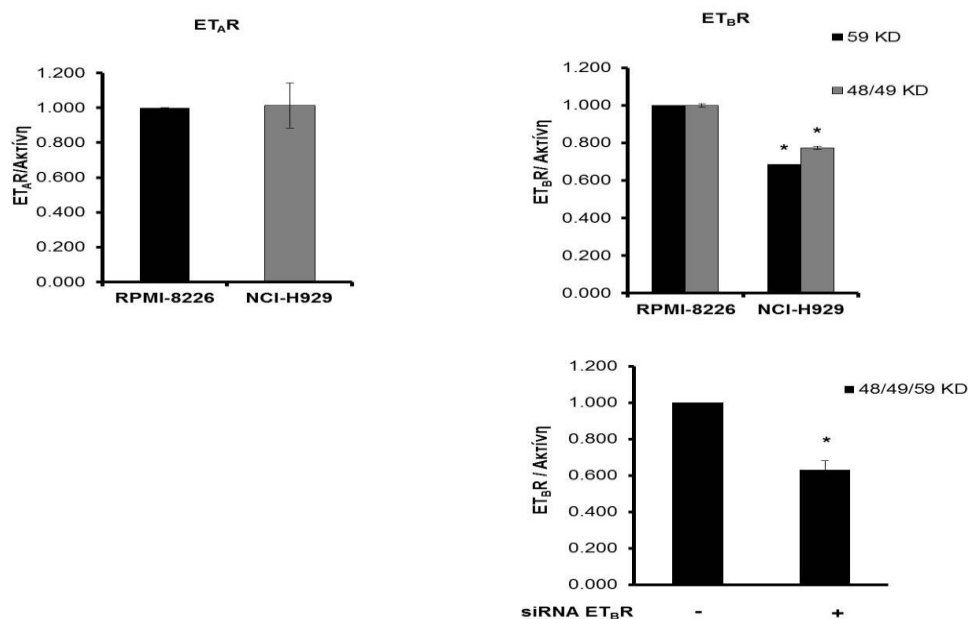
Κατόπιν, ακολούθησε ποσοτικοποίηση των ληφθέντων ζωνών με το πρόγραμμα UVIAI Alliance και βρέθηκε ότι η έκφραση του ET<sub>A</sub>R είναι η ίδια και στις 2

ΠΜ κυτταρικές σειρές, ενώ του  $ET_B R$  υψηλότερη κατά ~30% στην RPMI-8226 κυτταρική σειρά σε σχέση με την NCI-H929 (Εικόνα 4.1b).

(a)



(b)

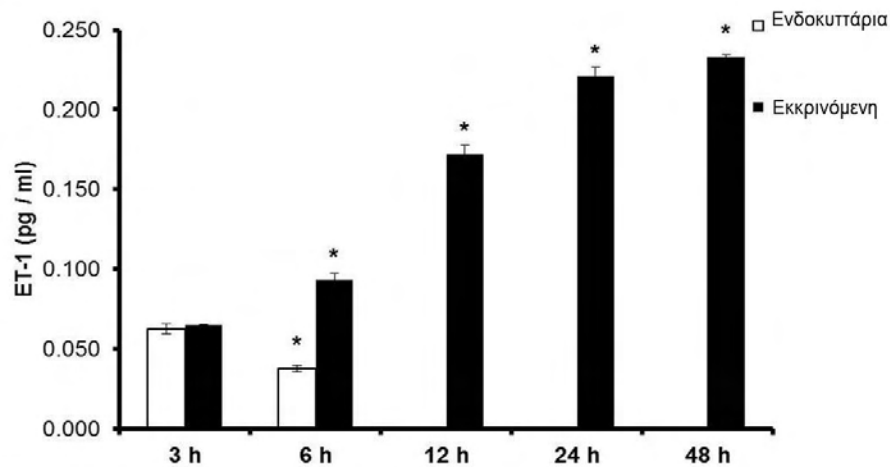


**Εικόνα 4.1:** Έκφραση των  $ET_A R$  και  $ET_B R$  υποδοχέων στα ΠΜ κύτταρα.

(a) Ανίχνευση των  $ET_A R$  (αριστερά) και  $ET_B R$  (επάνω δεξιά) με ανοσοαποτύπωση σε ολικά κυτταρικά λύματα, χρησιμοποιώντας 4-12% Bis-Tris ηλεκτρόφωρα. Φαίνονται τα μοριακά βάρη για τον  $ET_A R$  στα 49kD και για τον  $ET_B R$  στα 48, 49 και 59 kD. Western blot ανάλυση ολικών κυτταρικών λυμάτων προερχόμενων από RPMI-8226 κύτταρα διαμολυσμένα είτε με scrambled siRNA είτε με  $ET_B R$  siRNA (10 nM), χρησιμοποιώντας 10% SDS-PAGE ηλεκτρόφωρα πολυακρυλαμίδιου (κάτω δεξιά). Η b-actin χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου φόρτωσης και τα HepG2 και HeLa κυτταρικά λύματα ως θετικοί μάρτυρες. (b) Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το UVAlliance Image Analysis Software και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD μετά από κανονικοποίηση με την ακτίνη ( $n=4$ ).  $P<0.05$ ; \*vs RPMI-8226 ή scrambled siRNA.

### 4.1.2. Η ET-1 παράγεται/εκκρίνεται από τα ΠΜ κύτταρα

Παράλληλα, για να διαπιστωθεί εάν τα ΠΜ κύτταρα διαθέτουν τον μηχανισμό για την παραγωγή της ET-1, μετρήθηκαν τα επίπεδα της και στα υπερκείμενα και στα κυτταρικά λύματα με τη μέθοδο ELISA σε συνθήκες 0.5% FBS, τις χαμηλότερες συνθήκες ορού στις οποίες επιλέχτηκε να πραγματοποιηθούν όλα τα πειράματα μας. Το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως background από το οποίο απουσιάζει η ET-1. Τα επίπεδα της ET-1 παρατηρήθηκαν στο υπερκείμενο των control κυττάρων RPMI-8226 αρκετά νωρίς, ήδη από τις πρώτες 3h μετά την έναρξη των καλλιεργείων και αυξήθηκαν με έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο που κυμαινόταν από  $0.065 \pm 0.008$  pg/ml στις 3h στα  $0.221 \pm 0.007$  pg/ml στις 24h, όπου παρέμειναν σε αυτά τα επίπεδα μέχρι τις 48h (το τελευταίο χρονικό σημείο που αναλύθηκε). Επίσης, τα ενδοκυττάρια επίπεδα της ET-1 παρατηρήθηκαν ήδη από τις 3h στα ολικά κυτταρικά λύματα και βρέθηκαν ίσα με  $0.063 \pm 0.004$  pg/ml ενώ μία σημαντική μείωση σημειώθηκε στις 6h, προσεγγίζοντας μη ανίχνευσιμα επίπεδα μετά από 12h (**Εικόνα 4.2**). Αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε καμία έκκριση και παραγωγή της ET-1 από τα NCI-H929. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η PC3 προστατική καρκινική κυτταρική σειρά, καθώς σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας δείχτηκε να εκκρίνει στα υπερκείμενα καλλιεργητικά υλικά 4.95 pg/ml ET-1 [556], τιμή ανάλογη με αυτή που λήφθηκε στην παρούσα έρευνα (4.031 pg/ml).



**Εικόνα 4.2:** Χρονοεξαρτώμενη παραγωγή/έκκριση της ET-1 στην RPMI-8226 κυτταρική σειρά.

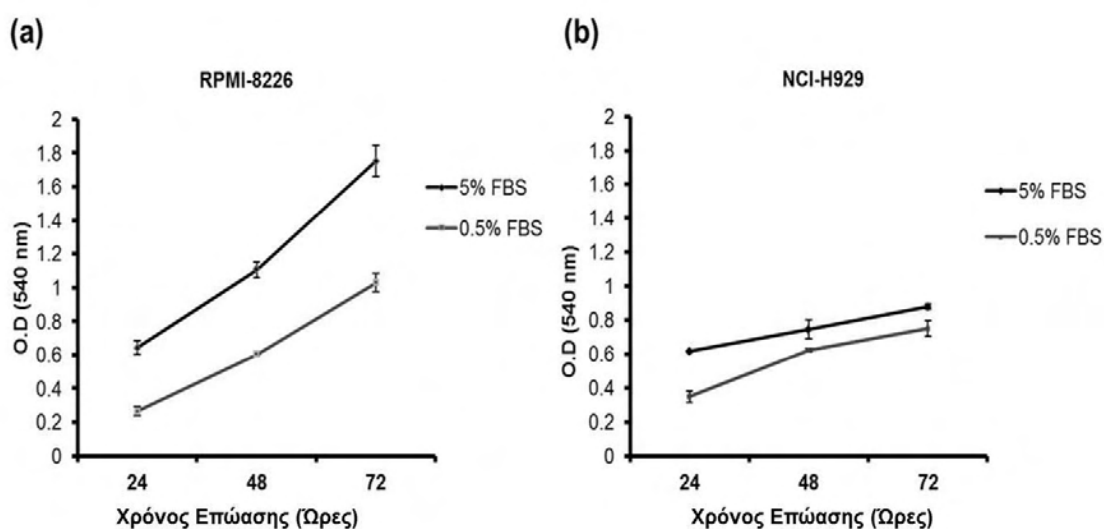
Τα υπερκείμενα καλλιεργητικά μέσα και τα 0.5% CHAPS κυτταρικά λύματα συλλέχτηκαν στις 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα της εκκρινόμενης και ενδοκυττάριας ET-1 με double-sandwich ELISA, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν  $P < 0.05$ ; \*vs 3, 6 ή 12 h.

#### 4.1.3. Η ET-1 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των ΠΜ κυττάρων

Ακολουθώντας, δεδομένου ότι ο ρόλος των  $ET_A$ R/ $ET_B$ R στα ΠΜ κύτταρα δεν έχει προς το παρόν μελετηθεί, η έρευνα εστιάστηκε στις πιθανές βιολογικές αυτοκρινείς/παρακρινείς δράσεις τους. Με βάση προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν ότι η δράση της ET-1 είναι μιτογόνος, ρυθμίζοντας είτε αυτοκρινώς είτε παρακρινώς την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυτταρικών τύπων [557-560, 522], μελετήσαμε την επίδρασή της στον πολλαπλασιασμό των HMCLs.

Με βάση προηγούμενες μελέτες στις οποίες διερευνήθηκε η δράση της ET-1 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μελανώματος, ωοθηκών και παχέος εντέρου, όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε συνθήκες 0.5% FBS ώστε να περιοριστούν οι επιδράσεις των αυξητικών παραγόντων (π.χ. IGF-1) που συνυπάρχουν στον ορό [558, 635, 514]. Παράλληλα, προκειμένου να αποκλειστεί η

πιθανότητα τα χαμηλά επίπεδα του ορού να επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, τα RPMI-8226 και NCI-H929 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 0.5% και 5% FBS αντίστοιχα για 24, 48 και 72 h και μετρήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη με MTT πειράματα. Από τις αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης προέκυψε ότι η ποσότητα του ορού επηρεάζει ελάχιστα τον χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων, αλλά όμως όχι την βιωσιμότητά τους (**Εικόνα 4.3**).



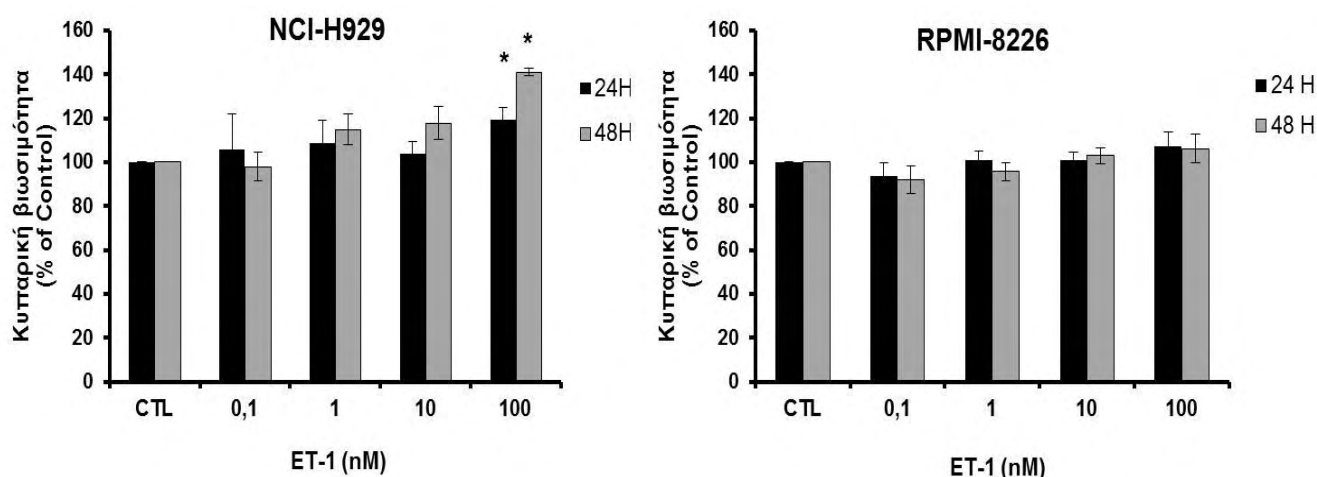
**Εικόνα 4.3:** Ανάπτυξη των ΠΙΜ κυτταρικών σειρών σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 0.5% και 5% FBS. Καμπύλες ανάπτυξης για τα RPMI-8226 (a) και τα NCI-H929 (b) κύτταρα σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 0.5% και 5% FBS αντίστοιχα. Η κυτταρική ανάπτυξη μετρήθηκε με MTT assay μετά από 24, 48 και 72 h επώασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της ET-1 στην απόκριση των κυττάρων στο BTZ, πραγματοποιήθηκαν αρχικά χρονο-(24 και 48h) και δοσο-εξαρτώμενα (0,1, 1, 10 και 100 nM) πειράματα με το ET-1 πεπτίδιο και οι καλύτερες συγκεντρώσεις και χρόνοι επώασης βρέθηκαν να είναι ίσα με 100 nM και 48 h αντίστοιχα (**Εικόνα 4.4**). Αυτή η συγκέντρωση ήταν σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες, όπου μελετήθηκαν οι επιδράσεις της ET-1 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη και ωοθηκών [561-563, 485, 498]. Όπως φαίνεται από την **εικόνα 4.5**, η κυτταρική βιωσιμότητα της NCI-H929 αυξήθηκε μετά από διέγερση με την ET-1 κατά ~30% σε



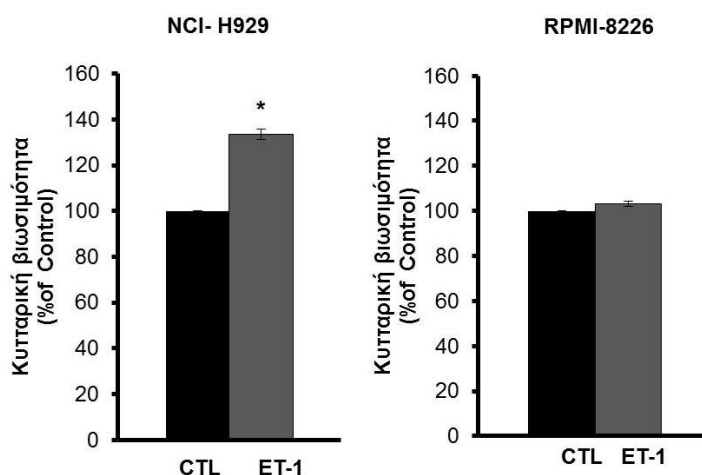
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

σύγκριση με τα control κύτταρα, ενώ στην περίπτωση των RPMI-8226 δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των control κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με το πεπτίδιο. Η μη απόκριση των RPMI-8226 κυττάρων στην εξωγενώς χορηγούμενη ET-1, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το μονοπάτι είναι ήδη ενεργοποιημένο στα συγκεκριμένα κύτταρα εξαιτίας της ενδογενούς παραγωγής και έκκρισης της ET-1 από τα RPMI-8226, συγκριτικά με τα NCI-H929 και για αυτό η οποιαδήποτε προσθήκη της ET-1 δεν φαίνεται να έχει καμία επιπλέον δράση. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι η ενδογενής ET-1 μπορεί να δράσει ως ένας αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας, διεγείροντας και συντηρώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα RPMI-8226 κύτταρα.



**Εικόνα 4.4:** Χρονο- και δόσο-εξαρτώμενη επίδραση της ET-1 στον πολλαπλασιασμό των ΗΜ κυττάρων.

Οι NCI-H929 (αριστερά) και RPMI-8226 (δεξιά) κυτταρικές σειρές επώαστηκαν απουσία (CTL) και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ET-1 (0,1, 1, 10 και 100 nM) για 24 και 48 h αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επώασης, ο πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με MTT assay. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν  $P < 0.05$ ; \*vs CTL.

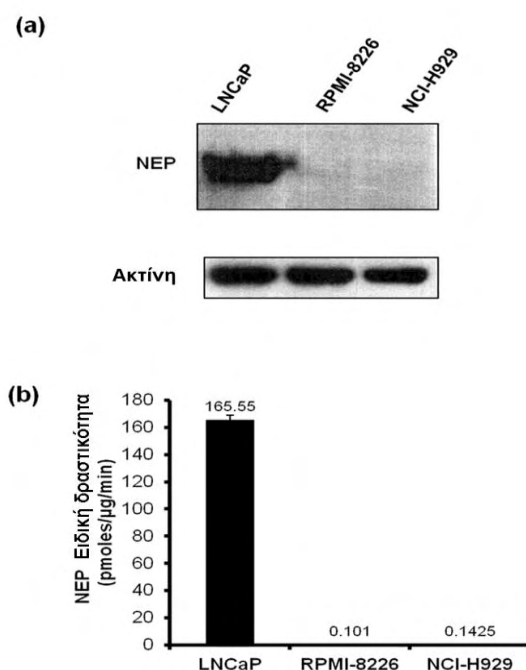


**Εικόνα 4.5:** Επίδραση της ET-1 στον πολλαπλασιασμό των ΠΜ κυττάρων.

Οι NCI-H929 (αριστερά) και RPMI-8226 (δεξιά) κυτταρικές σειρές επώαστηκαν απουσία (CTL) και παρουσία της ET-1 (100nM) για 48 h. Μετά το πέρας της επώασης, ο πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με MTT assay. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν  $P < 0.05$ ; \*vs CTL.

#### 4.1.4. Η NEP/CD10 δεν εκφράζεται στα ΠΜ κύτταρα

Σε επόμενο στάδιο, δεδομένου ότι η νευροπεπτιδάση (NEP/CD10) συνιστά έναν παράγοντα κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ET-1, εξετάστηκε εάν στα παρατηρούμενα ET-1 διαφορεικά επίπεδα στις 2 μυελωματικές κυτταρικές σειρές εμπλέκεται κάποια πιθανή διαταραχή της έκφρασής της, επηρεάζοντας ταυτόχρονα τη συγκέντρωση του πεπτιδίου στην κυτταρική επιφάνεια. Βάσει αυτού, μετρήθηκαν και στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές σε σταθερή κατάσταση η έκφραση της NEP με western blot ανάλυση καθώς και η ενζυματική της δραστηριότητα με ενζυμικό χρωματομετρικό assay. Και στις δύο περιπτώσεις ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά λύματα προερχόμενα από την ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη LNCaP. Οι δύο ΠΜ κυτταρικές σειρές βρέθηκαν να είναι αρνητικές ως προς την έκφραση της NEP, όπως έδειξε η ανάλυση με Western blot και όπως ήταν αναμενόμενο παρουσίασαν μηδαμινή ενζυμική δραστηριότητα (**Εικόνα 4.6**).



**Εικόνα 4.6:** Έκφραση και ενζυματική δραστηριότητα της νευροπετιδάσης NEP/CD10 στις ΠΜ κυτταρικές σειρές.

(a) Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση της έκφρασης της NEP/CD10 στις RPMI-8226 (αριστερά) και NCI-H929 (δεξιά) κυτταρικές σειρές. Η b-actin χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου φόρτωσης. (b) Ενζυματική δραστηριότητα της NEP (pmoles/ug/min) στις RPMI-8226 (αριστερά) και NCI-H929 (δεξιά) κυτταρικές σειρές. Τα LNCaP κυτταρικά λύματα χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

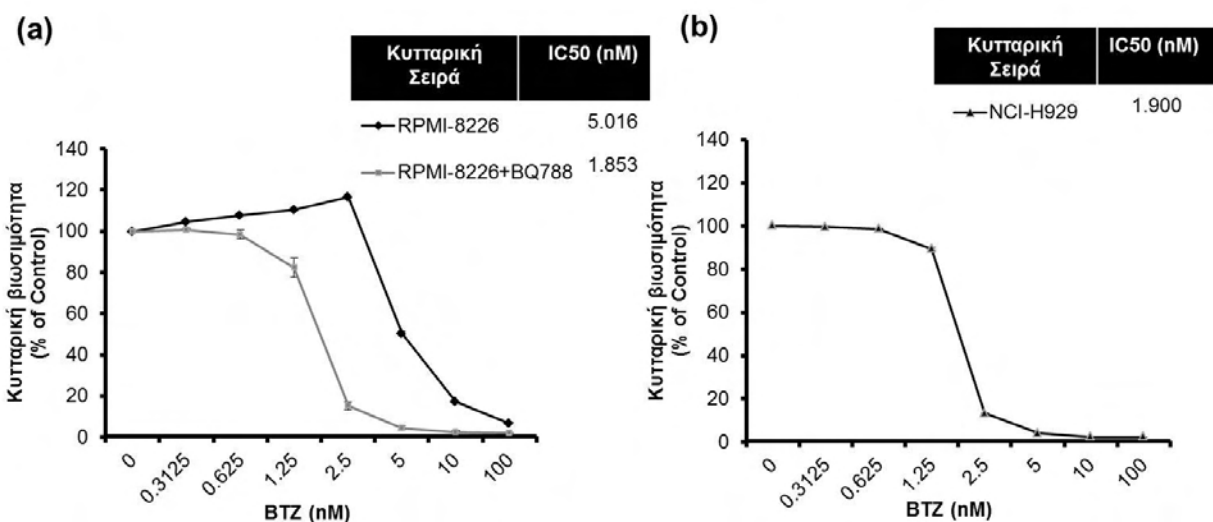
## 4.2. Η ET-1 εμπλέκεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα

### 4.2.1. Οι ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ

Προκειμένου να μελετηθούν οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα στο BTZ στο ΠΜ, επιλέχθηκαν 2 ανθρώπινες ΠΜ κυτταρικές σειρές (HMCLs)-NCI-H929 και RPMI-8226- οι οποίες είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα NCI-H929 κύτταρα παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία (>40% των αποπτωτικών κυττάρων), συγκριτικά με τα RPMI-8226 (<25% των αποπτωτικών κυττάρων), κατηγοριοποιώντας την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά ως ανθεκτική

[564, 565]. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και από άλλους ερευνητές όπου οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων  $IC_{50}$  τιμών, με την NCI-H929 να είναι η πιο ευαίσθητη και την RPMI-8226 να είναι η πιο ανθεκτική [566, 567].

Για να επιβεβαιώσουμε επίσης στα δικά μας χέρια, τα διαφορικά επίπεδα ευαισθησίας των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών στο BTZ, πραγματοποιήθηκαν MTT πειράματα αναστολής του πολλαπλασιασμού δοκιμάζοντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις του BTZ (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 100 nM) με χρόνο επώασης τις 24h. Η τελική συγκέντρωση του DMSO που χρησιμοποιήθηκε για την διάλυση του BTZ, δεν ξεπέρασε τα 0.1% και σε αυτά τα επίπεδα δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των υπό εξέταση κυττάρων (αρνητικός μάρτυρας). Όπως φαίνεται στις εικόνες 4.5a και 4.5b, το BTZ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο μετά από 24h επώασης. Τα αποτελέσματά μας ήταν σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και η συγκέντρωση που παρατηρήθηκε το 50% της κυτταρικής ανάπτυξης ( $IC_{50}$ ) βρέθηκε να είναι 2.5 φορές υψηλότερη στα RPMI-8226 (περίπου 5nM) συγκρινόμενη με τα NCI-H929 (περίπου 2nM).



**Εικόνα 4.5:** Ευαισθησία των ΠΜ κυττάρων στο BTZ.

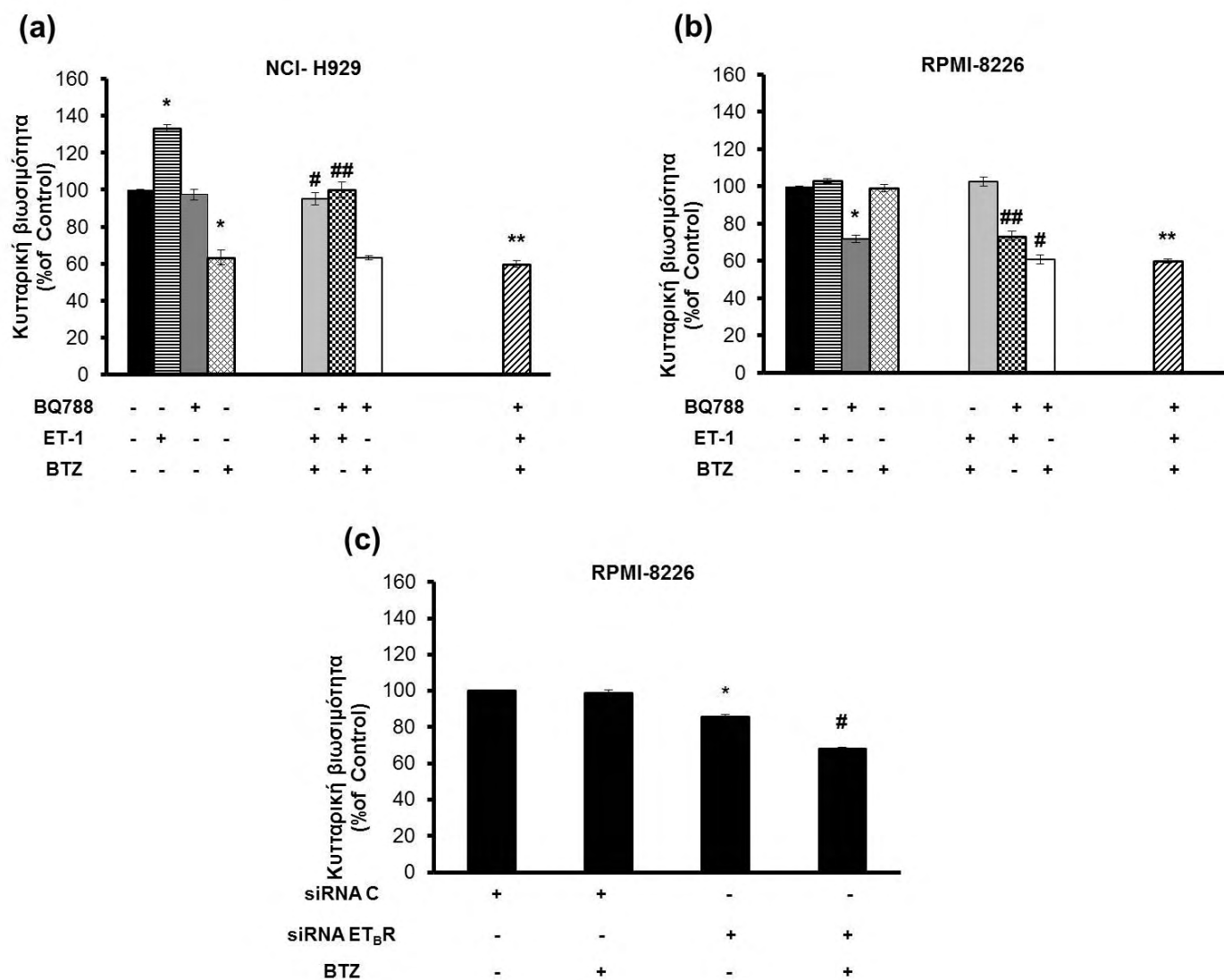
Καμπύλες ανάπτυξης για τα RPMI-8226 (a) και τα NCI-H929 (b) κύτταρα που επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του BTZ (0.3125 – 100 nM) για 24h παρουσία ή απουσία του BQ788 (μόνο για τα RPMI-8226 προεπώαση με 0.1μM BQ788 για 30 min). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει μέσο όρο±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν ( $p < 0.05$ ). Οι τυπικές αποκλίσεις ήταν γενικά <10%.

### 4.2.2. Η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού

Επίσης, για να ανιχνευτεί εάν η ET-1 και η ενεργοποίηση των ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R συμβάλλει στην ανθεκτικότητα στο BTZ, επώαστηκαν και η ανθεκτική και η ευαίσθητη κυτταρική σειρά με BTZ με ή χωρίς ET-1. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 4.6a**, η προσθήκη εξωγενώς της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ET-1 στα NCI-H929 ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων κυττάρων και προστάτευσε τα NCI-H929 κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, αυξάνοντας τα επίπεδα της από τα  $63.449 \pm 4.112$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με το φάρμακο στα  $95.039 \pm 3.404$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με ET-1+BTZ αντίστοιχα (**Εικόνα 4.6a**).

Όταν τα RPMI-8226 κύτταρα επώαστηκαν παρομοίως με BTZ, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική απόκριση στο φάρμακο απουσία της ET-1, συγκριτικά με τα NCI-H929, όπως αναμενόταν. Επιπροσθέτως, δεν βρέθηκε καμία διαφορά στην κυτταρική βιωσιμότητα μεταξύ των ανθεκτικών κυττάρων που εκτέθηκαν στο BTZ και εκείνων που εκτέθηκαν στην ET-1 και στον συνδυασμό ET-1+BTZ αντίστοιχα (**Εικόνα 4.6b**), δείχνοντας ότι η παρουσία της εξωγενούς ET-1 δεν έχει κάποια περαιτέρω δράση στα RPMI-8226 κύτταρα.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 4.6:** Η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Καταστολή του μονοπατιού ET-1/ET<sub>B</sub>R μέσω παρεμπόδισης ή αποσιώπησης του υποδοχέα ET<sub>B</sub>R ενισχύει τις ανασταλτικές δράσεις του BTZ, επανευαισθητοποιώντας τα ΠΜ κύτταρα στο φάρμακο.

Οι NCI-H929 (a) και RPMI-8226 (b) κυτταρικές σειρές επωάστηκαν απουσία ή παρουσία των ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστών (BQ788, 0.1μM για 30min), ET-1 (100nM για 48 h), και BTZ (2nM για 24 h) και ο κυτταρικός πολ/σμός μετρήθηκε με MTT assay. (c) Η RPMI-8226 κυτταρική σειρά διαμολύνθηκε με scrambled siRNA ή με ET<sub>B</sub>R siRNA απουσία (control) ή παρουσία του BTZ (2nM για 24 h) και ο κυτταρικός πολ/σμός μετρήθηκε με MTT assay. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. P<0.05; \*vs CTL, #vs BTZ or BQ788, \*\*vs ET-1+BTZ, ##vs ET-1.

### 4.3. Καταστολή του ET-1/ET<sub>B</sub>R μονοπατιού ενισχύει τις ανασταλτικές δράσεις του BTZ, επανευαισθητοποιώντας τα ΠΜ κύτταρα στο φάρμακο

#### 4.3.1. Καταστολή του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα με χημικούς πεπτιδικούς ανταγωνιστές

Σε ένα επόμενο στάδιο, προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω οι δράσεις του άξονα της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα, μελετήθηκε μέσω ποιου ET-1 υποδοχέα μεσολαβούνται οι δράσεις της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε ο πολλαπλασιασμός που επάγεται στα ΠΜ κύτταρα μετά από προσθήκη εξωγενούς ET-1, παρουσία είτε του ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστή BQ123 [568] ή του ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστή BQ788 [569]. Στην συγκέντρωση των 0.1 $\mu$ M, αυτά τα τροποποιημένα πεπτίδια παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση για τους αντίστοιχους υποδοχείς τους και μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των ET<sub>A</sub>R- και ET<sub>B</sub>R- επαγόμενων δράσεων. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 4.6a**, χορήγηση του BQ788 μόνο του δεν είχε καμία δράση στα NCI-H929. Παρόλα αυτά, όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν με την ET-1, η χορήγηση του ανταγωνιστή ET<sub>B</sub>R ανέστειλε την ET-1-επαγόμενη ανθεκτικότητα, μειώνοντας την βιωσιμότητα από την τιμή 95.039 $\pm$ 3.404 στην τιμή 60.205% $\pm$ 1.676, επανευαισθητοποιώντας τα NCI-H929 κύτταρα στο φάρμακο.

Σε αντίθεση με τα NCI-H929, όταν τα RPMI-8226 επώαστηκαν με την ίδια συγκέντρωση ET-1 δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στον πολλαπλασιασμό, εξαιτίας πιθανόν της παραγωγής του πεπτιδίου από τα ίδια τα κύτταρα. Επίσης, το BTZ ήταν ανενεργό όταν προστέθηκε στα κύτταρα στην ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τα NCI-H929, γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας όπου υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου απαιτούνται για να προκαλέσουν αναστολή του κυτταρικού πολ/σμού. Από την άλλη μεριά, όταν τα RPMI-8226 επώαστηκαν με BQ788 μόνο του, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση στην βιωσιμότητα (71.259 $\pm$ 1.500), η οποία ενισχύθηκε μετά από την συνδυασμένη προσθήκη και του BTZ (60.893 $\pm$ 1.773), πιθανώς εξαιτίας της μεγαλύτερης εξάρτησης των ανθεκτικών κυττάρων από το ET-1/ET<sub>B</sub>R μονοπάτι για τον πολλαπλασιασμό (**Εικόνα 4.6b**).

### 4.3.2. Αποσιώπηση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα με siRNA

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του ET<sub>B</sub>R στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ακόλουθησε αποσιώπηση του αντίστοιχου γονιδίου του υποδοχέα με siRNA και παρομοίως βρέθηκε ότι στα ET<sub>B</sub>R-αποσιωποημένα RPMI-8226 κύτταρα η βιωσιμότητα μειώθηκε συγκριτικά με τα αντίστοιχα διαμολυσμένα με το αρνητικό δείγμα siRNA (scrambled siRNA), τα οποία χρησίμευσαν ως control (85.6±2.54). Επώαση των ET<sub>B</sub>R-αποσιωποημένων RPMI-8226 κύτταρων με BTZ ενίσχυσε την ευαισθησία στην χημειοθεραπεία σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν από τον συνδυασμό του ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστή BQ788 με το BTZ (68.1±1.96) (Εικόνα 4.6c).

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω εάν η παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R ευαισθητοποιεί τα RPMI-8226 κύτταρα στην BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού, τα κύτταρα μετά από προεπώαση με τον BQ788 ανταγωνιστή σε συγκέντρωση 0.1 uM εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τον BQ788 παρατηρήθηκε αυξημένη ευαισθησία των RPMI-8226 κυττάρων στο BTZ (τιμή IC<sub>50</sub> ίση με 2 nM, Εικόνα 4.5a).

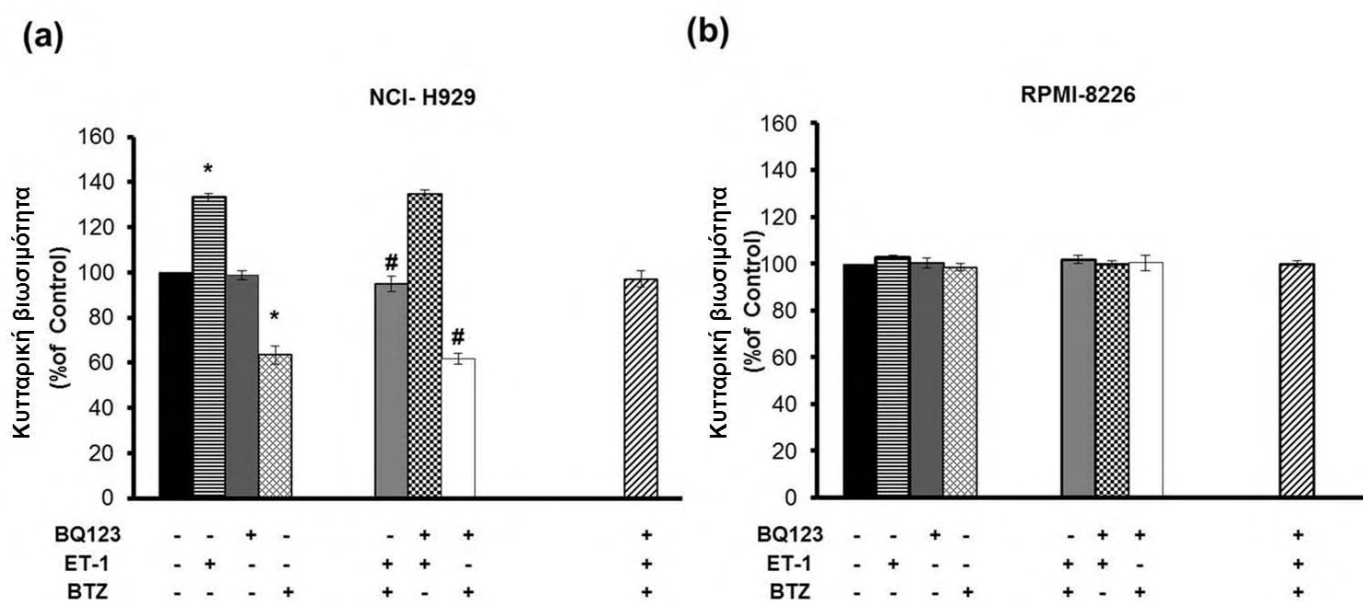
Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι παρεμπόδιση ή αποσιώπηση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα μπορεί να επαναφέρει τα επίπεδα ευαισθησίας στην BTZ-ανθεκτική κυτταρική σειρά, βελτιώνοντας την ανασταλτική δράση του φαρμάκου και μετατρέποντας έτσι την ανθεκτική κυτταρική σειρά σε ευαίσθητη.

### 4.3.3. Ο ET<sub>A</sub>R δεν εμπλέκεται στην μεσολάβηση των δράσεων της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρεμπόδιση του υποδοχέα ET<sub>A</sub>R με τον BQ123 ανταγωνιστή δεν είχε καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ΠΜ κυτταρικών σειρών σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες, προτείνοντας ότι ο ET<sub>A</sub>R ίσως να μην αποτελεί βασικό μεσολαβητή των δράσεων της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα (Εικόνα 4.7).



Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η ET-1 μπορεί να δράσει ως ένας αυτοκρινής/παρακρινής ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του ET<sub>B</sub>R, προτείνοντας ότι ο ET-1/ET<sub>B</sub>R άξονας μπορεί να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για την ενίσχυση της αντιμυελωματικής δραστηριότητας του BTZ.



**Εικόνα 4.7:** Ο υποδοχέας ET<sub>A</sub>R δεν εμπλέκεται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ.

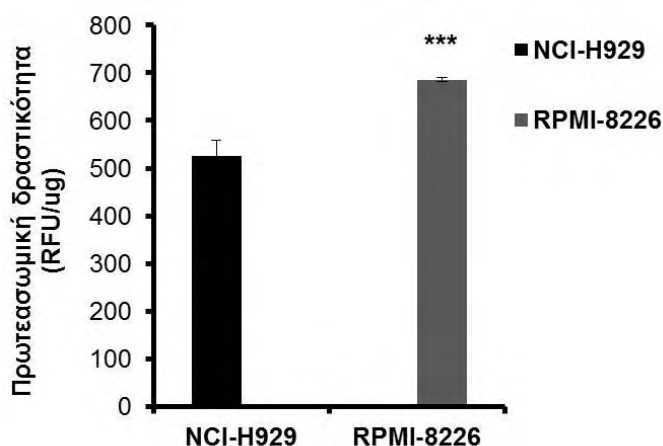
Οι NCI-H929 (a) και οι RPMI-8226 (b) κυτταρικές σειρές επωάστηκαν απουσία ή παρουσία των ET<sub>A</sub>R ανταγωνιστή (BQ123, 0.1  $\mu$ M, 30 min), ET-1 (100nM, 48h) και BTZ (2nM για 24h) και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετρήθηκε με MTT assay. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν P<0.05; \*vs CTL, #vs BTZ or BQ788, \*\*vs ET-1+BTZ, ##vs ET-1.

### 4.4. Η ET-1 επηρεάζει την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα

#### 4.4.1. Τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας στην σταθερή κατάσταση συμβαδίζουν με μειωμένη ευαισθησία στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα

Σε συνέχεια της διερεύνησης των πιθανών μοριακών μηχανισμών της διαφορικής απόκρισης στο BTZ, εξετάστηκε η πρωτεασωμική δραστηριότητα σε

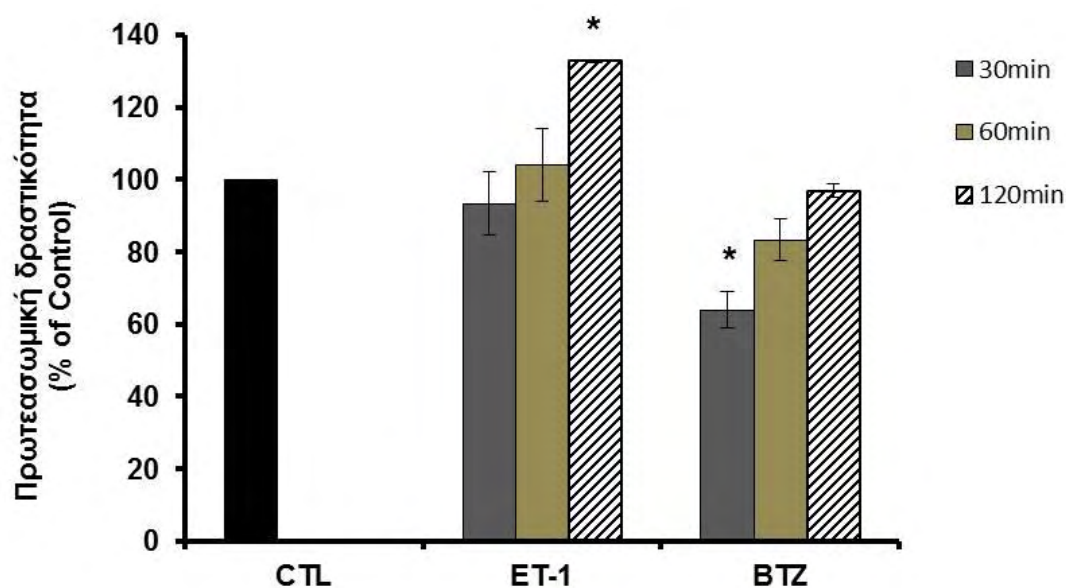
σταθερή κατάσταση στην κάθε ΠΜ κυτταρική σειρά. Πρωτεϊνικά λύματα ετοιμάστηκαν εφαρμόζοντας παρόμοιες συνθήκες καλλιέργειας με τις αντίστοιχες του MTT assay. Βάσει προηγούμενων μελέτων που διεξήχθησαν σε λεμφοειδή κύτταρα, η δράση χυμοτρυψίνης ευθύνεται για το 80%, ενώ η δράση κασπάσης μόνο για το 2% της συνολικής πρωτεασωμικής δραστηριότητας [570]. Για αυτό το λόγο, εκτιμήθηκε η δράση χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος (ChT-L) η οποία καταλύεται από την β5 υπομονάδα. Η πρωτεασωμική δραστηριότητα ήταν σταθερά 30% υψηλότερη στην ανθεκτική στο BTZ RPMI-8226 κυτταρική σειρά, συγκριτικά με την BTZ-ευαίσθητη NCI-H929 σειρά (**Εικόνα 4.8**).



**Εικόνα 4.8:** Πρωτεασωμική δραστηριότητα βασικής κατάστασης στα NCI-H929 (αριστερά) και στα RPMI-8226 (δεξιά). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει μέσο όρο $\pm$ SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.  $P < 0.05$ ; \*\*\* vs NCI-H929.

Κατόπιν, συγκρίθηκαν οι δράσεις του BTZ στην πρωτεασωμική δραστηριότητα στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές, εκθέτοντας τα κύτταρα στις ίδιες συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω για το MTT assay. Πριν από αυτό, για να μελετηθεί ο βέλτιστος χρόνος επώασης με το φάρμακο, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων, δοκιμάζοντας διαφορετικά χρονικά σημεία (30, 60 και 120 min) και ο βέλτιστος χρόνος επώασης βρέθηκε να είναι τα 30 min (**Εικόνα 4.9**). Στα 30 min επώασης με 2nM BTZ επιτεύχθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της πρωτεασωμικής δραστηριότητας στην ευαίσθητη NCI-H929 σειρά συγκριτικά με τα control κύτταρα

( $62.963 \pm 3.145$ , **εικόνα 4.10a**). Παρόλα αυτά, στα RPMI-8226 κύτταρα, τα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας παρέμειναν ανεπηρέαστα μετά από επώαση με το BTZ και παρόμοια με τα αντίστοιχα των control κυττάρων ( $98.657 \pm 9.032$ , **εικόνα 4.10b**), όπως αναμενόταν. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι επιδράσεις του BTZ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές στα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας σταθερής κατάστασης στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές, αποκαλύπτοντας ότι διαφορετικές μυελωματικές κυτταρικές σειρές ίσως είναι εφοδιασμένες με διαφορεικά επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας, προτείνοντας έτσι έναν πιθανό μοριακό μηχανισμό που συμβάλλει στην διαφορική ευαισθησία στο BTZ.

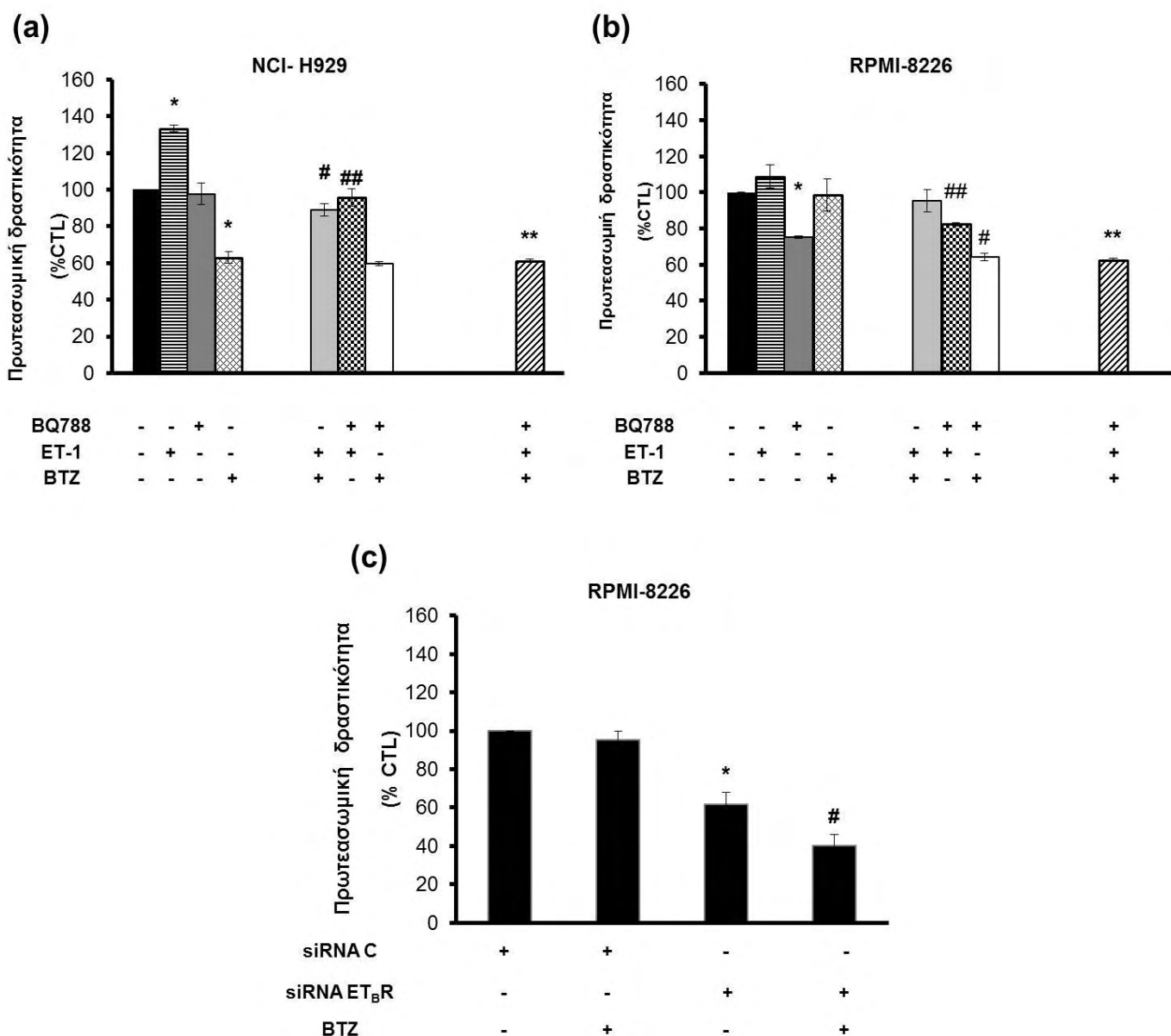


**Εικόνα 4.9:** Χρονο-εξαρτώμενη επίδραση της ET-1 ή του BTZ στην πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα. Τα NCI-H929 κύτταρα επώαστηκαν απουσία (CTL) ή παρουσία της ET-1 (100 nM) ή του BTZ (2 nM) για 30, 60 και 120 min αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει μέσο όρο  $\pm$  SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.  $P < 0.05$ ; \*vs CTL.

### 4.4.2. Η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αυξορύθμισης της 20S πρωτεασωμικής δραστηριότητας

Παράλληλα, προκειμένου να ερευνηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ET-1 μπορεί να προστατεύσει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μελετήθηκε η επίδραση της ET-1 στο UPS μονοπάτι. Για το σκοπό αυτό, επώαστηκε η ευαίσθητη NCI-H929 κυτταρική σειρά με το BTZ με ή χωρίς ET-1. Πριν από αυτό, παρομοίως με το BTZ, παραγματοποιήθηκαν πειράματα πρωτεασωμικής δραστηριότητας, δοκιμάζοντας διαφορετικούς χρόνους επώασης με την ET-1 (30, 60 και 120 min) (**Εικόνα 4.9**). Η επώαση των NCI-H929 κυττάρων με 100nM ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ET-1 για 2h απουσία του BTZ προκάλεσε επαγωγή της πρωτεασωμικής δραστηριότητας κατά ~30% πάνω συγκριτικά με τα control κύτταρα ( $133.223 \pm 5.771$ , **εικόνα 4.10a**), επιτυγχάνοντας έτσι παρόμοια επίπεδα με τα αντίστοιχα της ανθεκτικής σειράς. Επίσης, παρουσία του BTZ η ET-1 παρεμπόδιζε την δράση του φαρμάκου. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 4.10a**, το BTZ μείωσε τα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα  $62.963 \pm 3.145$  και η διέγερση με την ET-1 μπλόκαρε την δράση του φαρμάκου επάγοντας μία στατιστικά σημαντική αύξηση στην πρωτεασωμική δραστηριότητα στα  $89.076 \pm 4.742$ .

Πάλι, όπως αναμενόταν έκθεση των RPMI-8226 κυττάρων με 100nM ET-1 για 2h δεν είχε κανένα πρόσθετο αποτέλεσμα ( $108.794 \pm 6.543$ ) στα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας (**Εικόνα 4.10b**).



**Εικόνα 4.10:** Η ET-1 μειώνει την BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή της 20S πρωτεασωμικής δραστηριότητας. Παρεμπόδιση ή αποσιώπηση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα επαναφέρει την ευαισθησία στο BTZ.

Επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας στα NCI-H929 (a) και RPMI-8226 (b) απουσία ή παρουσία των ETRs ανταγωνιστών (BQ788, 0.1uM για 30min), ET-1 (100nM για 2h) και BTZ (2nM για 30min). (c) Επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας των RPMI-8226 που έχουν διαμολυνθεί με CTL siRNA ή με ET<sub>B</sub>R siRNA απουσία (control) ή παρουσία του BTZ (2nM για 30 min). Η 20S ενζυματική δραστηριότητα εκφράζεται ως RFU/ug ολικής πρωτεΐνης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε σχέση με τα control κύτταρα. Η κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο±SD από τουλάχιστον 4 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. P<0.05; \*vs CTL, #vs BTZ, \*\*vs ET-1+BTZ, ## vs ET-1.

### 4.5. Παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R επαναφέρει την δράση του BTZ στο UPS μονοπάτι

#### 4.5.1. Παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα με χημικούς πεπτιδικούς ανταγωνιστές

Αφού προηγουμένως δείχτηκε ότι η δράση της ET-1 ίσως επηρεάζει την απόκριση των NCI-H929 κυττάρων στο BTZ, σε ένα επόμενο στάδιο μελετήθηκε η συμμετοχή του ET<sub>B</sub>R στην ευαισθητοποίηση αυτών των κυττάρων στο φάρμακο. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα MTT αποτελέσματα, το BQ788 μόνο του δεν επηρέασε την ChT-L δραστικότητα του πρωτεασώματος ( $97.631 \pm 5.771$ , **εικόνα 4.10a**). Παρόλα αυτά, όταν η ET-1 προστέθηκε στα κύτταρα εξωγενώς, επώαση με τον BQ788 επανέφερε την ευαισθησία στην BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή της πρωτεασωμικής δραστικότητας ( $61.181 \pm 0.953$  vs  $89.076 \pm 4.742$  **εικόνα 4.10a**).

Σε αντίθεση με τα NCI-H929 και σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα που παρατηρήθηκαν στον πολλαπλασιασμό για τα RPMI-8226, επώαση με  $0.1 \mu\text{M}$  του ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστή BQ788 μόνο του για 30 min είχε ως αποτέλεσμα μία μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστικότητας ( $75.162 \pm 3.528$ ), πιθανόν εξαιτίας της μεγαλύτερης εξάρτησης των ανθεκτικών κυττάρων από την ET-1/ET<sub>B</sub>R σηματοδότηση, η οποία όπως έχει παρατηρηθεί φαίνεται να είναι ήδη ενεργοποιημένη στα συγκεκριμένα κύτταρα. Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός του BQ788 και του BTZ βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματικός, αυξάνοντας στατιστικώς σημαντικά τον βαθμό της πρωτεασωμικής αναστολής ( $65.817 \pm 2.689$ ), προσεγγίζοντας έτσι τα επίπεδα ευαισθησίας της NCI-H929 κυτταρικής σειράς ( $64.233 \pm 2.012$ ) (**Εικόνα 4.10b**).

#### 4.5.2. Αποσιώπηση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα με siRNA

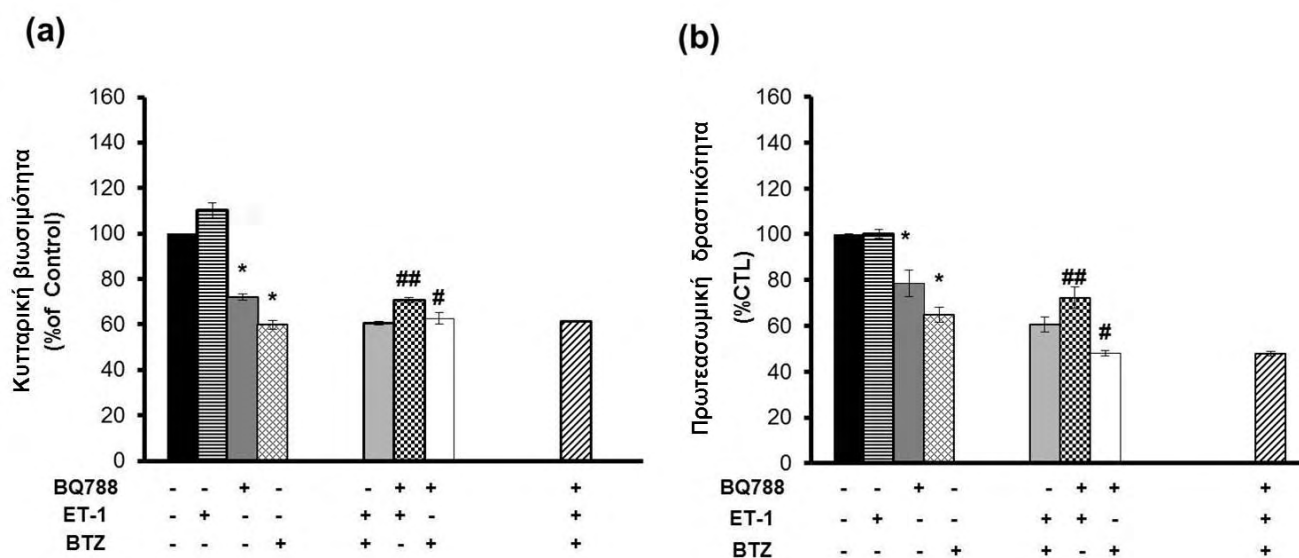
Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποσιώπηση του ET<sub>B</sub>R μείωσε τα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστικότητας σε έναν βαθμό μεγαλύτερο σε σχέση με αυτά που παρατηρήθηκαν με τον BQ788 ανταγωνιστή μόνο του ( $61.6 \pm 6.2$ ). Επίσης, αξιοσημείωτο ήταν ότι μετά από συνεπώαση των ET<sub>B</sub>R-αποσιωποποιημένων RPMI-8226 κυττάρων με το BTZ, η μείωση στα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστικότητας

ήταν πιο έντονη συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε μετά από προεπάση με τον ανταγωνιστή BQ788 ( $40.257 \pm 5.6$  vs  $65.817 \pm 2.689$ , **Εικόνα 4.10c**).

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η ιδιόσυστατη ενεργοποίηση του μονοπατιού ET-1/ET<sub>B</sub>R ίσως σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας στη σταθερή κατάσταση και με χαμηλότερα επίπεδα αποπτωτικής ευαισθησίας στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα.

### **4.5.3. Παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα διευκολύνει την BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή στον πολλαπλασιασμό και την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα**

Παράλληλα, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποια από τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των ΠΜ κυτταρικών σειρών να οφείλονται στα νεκρά κύτταρα και σε αυτά που πεθαίνουν, διεξήχθησαν επιπλέον πειράματα πολλαπλασιασμού και πρωτεασωμικής δραστηριότητας για τα RPMI-8226, χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη IC<sub>50</sub> τιμή τους (π.χ. 5 nM). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 4.11**, επάση των RPMI-8226 με τον ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστή διευκόλυε την δράση του φαρμάκου στην βιωσιμότητα και την πρωτεασωμική δραστηριότητα, προτείνοντας ότι παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R ίσως δρα αποτελεσματικά επαναφέροντας την ευαισθησία στο BTZ.



**Εικόνα 4.11:** Παρεμπόδιση του  $ET_B$ R υποδοχέα διευκολύνει την BTZ-μεσολαβούμενη αναστολή στον πολλαπλασιασμό και την πρωτεασωμική δραστηριότητα στα ΠΜ κύτταρα.

Τα RPMI-8226 κύτταρα επώαστηκαν με απουσία (Control) ή παρουσία των 0.1  $\mu$ M BQ788, 100 nM ET-1 και 5 nM BTZ ( $IC_{50}$  των RPMI-8226 κυττάρων), όπως περιγράφηκε στα Υλικά & Μέθοδοι. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (a) και η πρωτεασωμική δραστηριότητα (b) εκτιμήθηκαν με MTT assay και με proteasomal activity assay αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον εις διπλούν.  $P < 0.05$ ; \*vs CTL, #vs BTZ or BQ788, \*\*vs ET-1+BTZ, ##vs ET-1.

#### 4.6. Το μονοπάτι των MAP κινασών (MAPK) εμπλέκεται στην ET-1/ $ET_B$ R-επαγόμενη BTZ ανθεκτικότητα στα ΠΜ κύτταρα

##### 4.6.1. Η ET-1 επάγει ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού μέσω του $ET_B$ R υποδοχέα στα ΠΜ κύτταρα

Σε επόμενο στάδιο, προκειμένου να ανιχνευτούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η ET-1 και η ενεργοποίηση του  $ET_B$ R συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα στο BTZ, μελετήθηκε η ενεργοποίηση μορίων-τελεστών downstream των ET-1 υποδοχέων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν μία σχέση μεταξύ των ET-1-επαγόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν την επιβίωση και ενεργοποίησης των Akt και MAPK μονοπατιών [484, 502, 571, 572]. Και τα δύο αυτά τα σηματοδοτικά μόρια έχει δειχτεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των ΠΜ κυττάρων [573, 574]. Η παρούσα έρευνα εστιάστηκε στα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt/mTORC και MAPK.



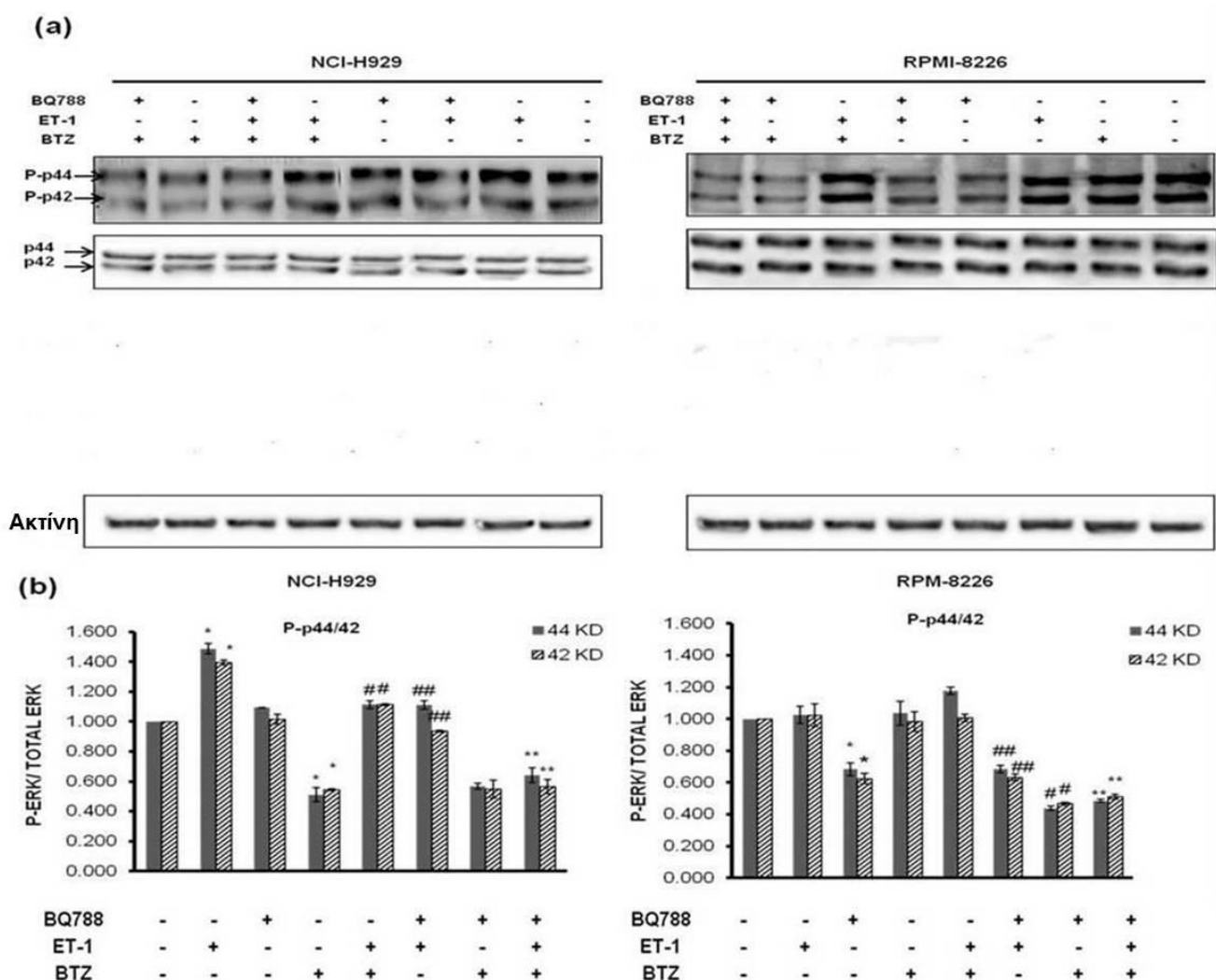
Βασιζόμενοι στα προηγούμενα αποτελέσματα που έδειξαν ότι η ET-1 επάγει μέσω του UPS μονοπατιού ανθεκτικότητα στο φάρμακο στα ΠΜ κύτταρα, μελετήθηκαν τα ET-1/ET<sub>B</sub>R –επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπατιά τα οποία εμπλέκονται στην UPS-μεσολαβούμενη BTZ ανθεκτικότητα, χρησιμοποιώντας αρχικά το *in vitro* μοντέλο ευαισθησίας, τα NCI-H929 κύτταρα.

Όπως φαίνεται στις **εικόνες 4.12a** και **4.12b**, όσον αφορά το MAPK μονοπάτι, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με 100nM ET-1, ανιχνεύσαμε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των p44/p42 κινασών (Erk1/2) συγκριτικά με τα control κύτταρα ( $1.488 \pm 0.034$  και  $1.395 \pm 0.016$  για τις p44 και p42 κινάσες αντίστοιχα). Παρουσία του BTZ, βρήκαμε ότι η ET-1 μπορεί να προστατεύσει τα ΠΜ κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη μείωση των Erk1/2 επιπέδων φωσφορυλίωσης με μία αύξηση από  $0.510 \pm 0.048$  (p44) και  $0.544 \pm 0.007$  (p42) στα ΠΜ κύτταρα που επώαστηκαν με BTZ στα  $1.111 \pm 0.029$  (p44) και  $0.937 \pm 0.005$  (p42) στα κύτταρα που επώαστηκαν με τον συνδυασμό ET-1+BTZ αντίστοιχα. Πάλι, παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R επανέφερε τα επίπεδα ευαισθησίας στο φάρμακο, μπλοκάροντας την ET-1 μεσολαβούμενη BTZ-ανθεκτικότητα ( $0.640 \pm 0.050$  και  $0.565 \pm 0.049$  για τις p44 και p42 κινάσες αντίστοιχα).

Σε αντίθεση με τα NCI-H929, προ-επώαση της ανθεκτικής RPMI-8226 κυτταρικής σειράς με το BQ788 πεπτίδιο προκάλεσε μία στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του Erk1/2 συγκριτικά με τα control κύτταρα ( $0.684 \pm 0.041$  και  $0.624 \pm 0.034$  για τις p44 και p42 κινάσες αντίστοιχα). Μία μεγαλύτερη στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε παρουσία του BTZ ( $0.438 \pm 0.015$  και  $0.467 \pm 0.010$  για τις p44 και p42 κινάσες αντίστοιχα), προτείνοντας ότι παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R μπορεί να ενισχύσει αποτελεσματικά την δράση του BTZ (**Εικόνα 4.12a**, **Εικόνα 4.12b**).

Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι ίσως συνιστά το πιο σημαντικό μονοπάτι downstream του ET<sub>B</sub>R που επάγει προστατευτικά και αντιαποπτωτικά σήματα στα ΠΜ κύτταρα, αντικατοπτρίζοντας έτσι έναν πιθανό σύνδεσμο μεταξύ των ET-1/ET<sub>B</sub>R, MAPK και UPS μονοπατιών.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



### Εικόνα 4.12: Η ET-1 επάγει ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού μέσω του ET<sub>B</sub>R.

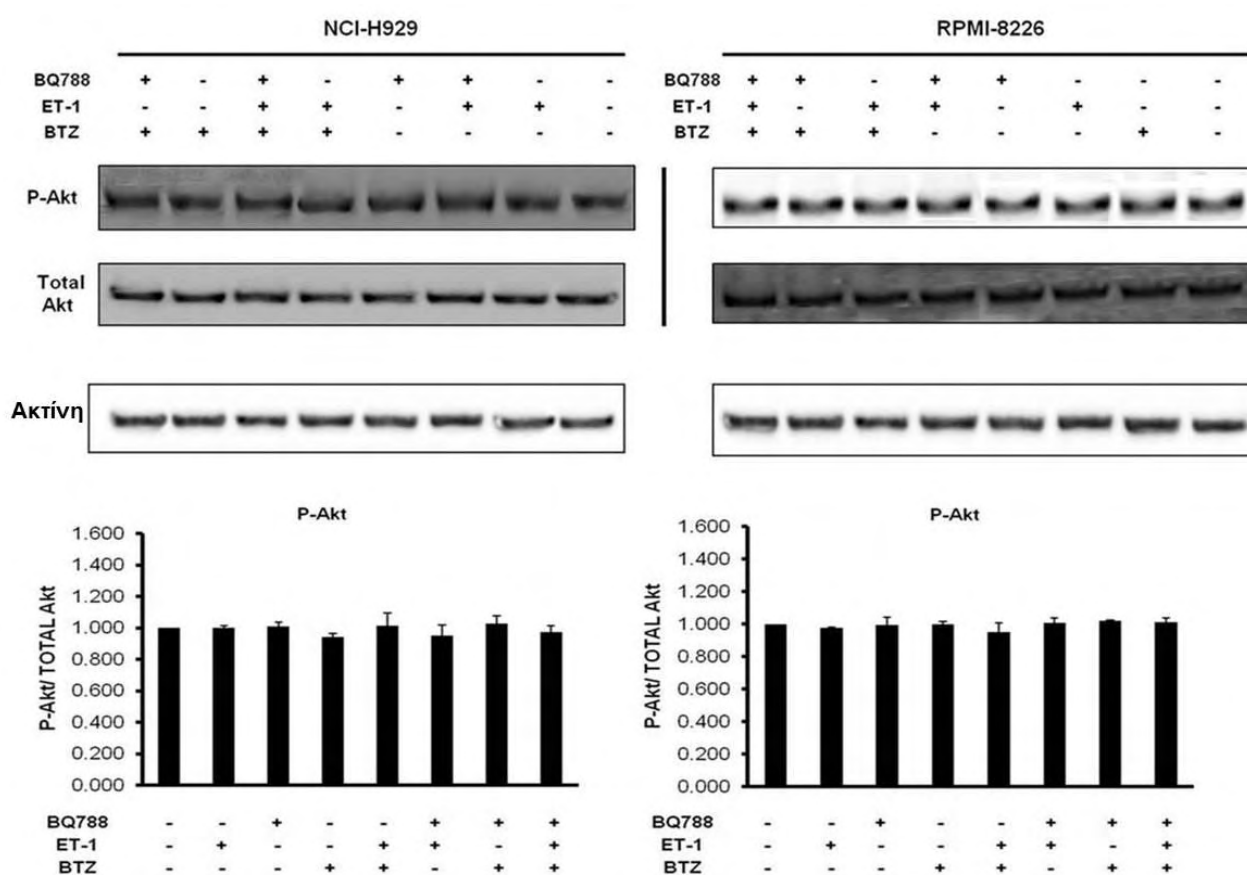
Τα NCI-H929 (αριστερά) και τα RPMI-8226 (δεξιά) κύτταρα προεπώαστηκαν με 0.1μM BQ788 για 30 min και ακολούθησε επώαση με 100nM ET-1 για 2h και κατόπιν με 2nM BTZ για 30 min. **(a)** Ίση ποσότητα κυτταρικών λυμάτων (μg πρωτεΐνης) διαχωρίστηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με τα anti-phospho p44/42 αντισώματα. Ως πρωτεΐνη ελέγχου φορτώσης χρησιμοποιήθηκε η b-ακτίνη. **(b)** Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τον πυκνομετρικό λόγο των phospho-p44/42 σε σχέση με τα αντίστοιχα total p44/42. Και οι phospho- και οι ολικές πρωτεΐνες κανονικοποιήθηκαν ως προς την b-ακτίνη. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το UVAlliance Image Analysis Software. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα εκφρασμένα ως προς το control. P<0.05\* vs CTL, \*\* vs ET-1+BTZ, #vs BTZ or BQ788, ## vs ET-1.

### 4.6.2. Η ET-1 δεν επηρεάζει το PI3K/Akt/mTOR μονοπάτι στα ΠΜ κύτταρα

Επιπροσθέτως, σχετικά με το PI3K/Akt/mTOR μονοπάτι, εξετάστηκε η φωσφορυλίωση του παράγοντα Akt που εντοπίζεται downstream του PI3K. Το PIP3K

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παράγει το φωσφατιδυλ-inositol-3,4,5-τριφωσφορικό, έναν δεύτερο τελεστή σημαντικό για την μετατόπιση του Akt στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την φωσφοινοσιτιδο-εξαρτώμενη κινάση-1 και πιθανώς από άλλες κινάσες [575]. Η western blot ανάλυση αποκάλυψε ότι τα βασικά ιδιοσύστατα επίπεδα φωσφορυλίωσης του Akt δεν τροποποιήθηκαν και παρέμειναν σταθερά συγκριτικά με τα control και στις 2 εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές που εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες, όπως αναφέρθηκαν ανωτέρω (Εικόνα 4.13a, 4.13b).

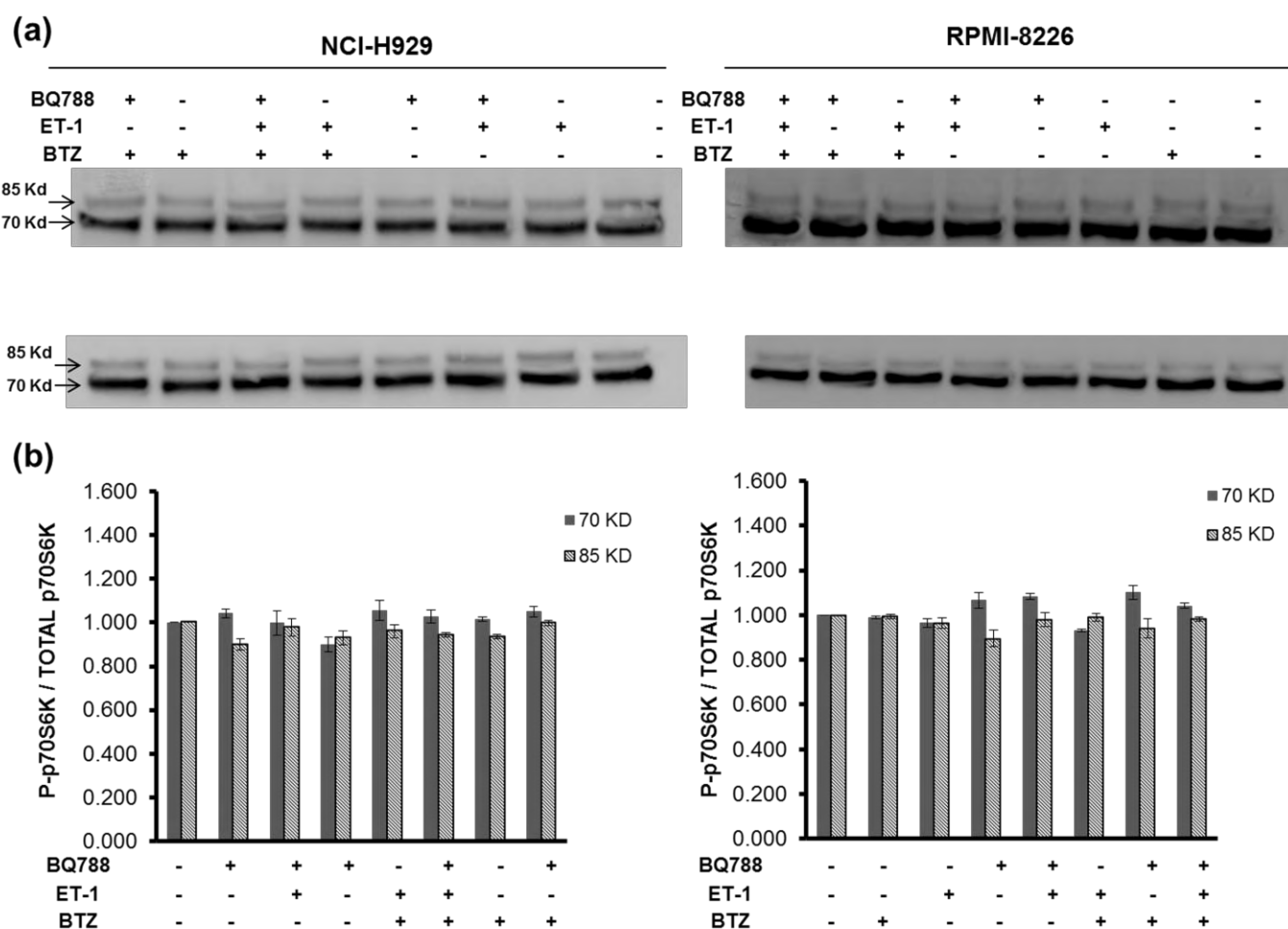


**Εικόνα 4.13:** Η ET-1 δεν επηρεάζει το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR.

Τα NCI-H929 (αριστερά) και τα RPMI-8226 (δεξιά) κύτταρα προεπώσθησαν με 0.1μM BQ788 για 30 min και ακολούθησε επώαση με 100nM ET-1 για 2h και κατόπιν με 2nM BTZ για 30 min. (a) Ίση ποσότητα κυτταρικών λυμάτων (μg πρωτεΐνης) διαχωρίστηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με τα anti-phospho Akt αντισώματα. Ως πρωτεΐνη ελέγχου φορτώσης χρησιμοποιήθηκε η b-ακτίνη. (b) Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τον πυκνομετρικό λόγο των phospho-Akt σε σχέση με τα αντίστοιχα total Akt. Και οι phospho- και οι ολικές πρωτεΐνες κανονικοποιήθηκαν ως προς την b-ακτίνη. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το UVIAAlliance Image Analysis Software. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα εκφρασμένα ως προς το control. P<0.05\* vs CTL, \*\* vs ET-1+BTZ, #vs BTZ or BQ788, ## vs ET-1.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παράλληλα, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν πειράματα western blot, ώστε να αναλυθεί η κατάσταση φωσφορυλίωσης του p70S6K, βασικού δείκτη της δραστικότητας του mTORC, ο οποίος συνιστά έναν γνωστό downstream τελεστή του PI3K/Akt/mTOR μονοπατιού [576, 577]. Όπως αναμενόταν, και σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα που λήφθηκαν για το Akt, η ιδιοσύστατη κατάσταση φωσφορυλίωσης του p70S6K παρέμεινε σταθερή συγκριτικά με τα control κύτταρα. (Εικόνα 4.14a, 4.14b)



**Εικόνα 4.14: Η ET-1 δεν επηρεάζει την δραστικότητα του mTORC.**

Τα NCI-H929 (αριστερά) και τα RPMI-8226 (δεξιά) κύτταρα προεπελάστηκαν με 0.1μM BQ788 για 30 min και ακολούθησε επώαση με 100nM ET-1 για 2h και κατόπιν με 2nM BTZ για 30 min. **(a)** Ίση ποσότητα κυτταρικών λυμάτων (μg πρωτεΐνης) διαχωρίστηκε με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το anti-phospho p70S6K αντισώμα. Ως πρωτεΐνη ελέγχου φορτώσης χρησιμοποιήθηκε η b-ακτίνη. **(b)** Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τον πυκνομετρικό λόγο του phospho-p70S6K σε σχέση με το αντίστοιχο total p70S6K. Και οι phospho- και οι ολικές πρωτεΐνες κανονικοποιήθηκαν ως προς την b-ακτίνη. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το UVAlliance Image Analysis Software. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ±SD από 2 ανεξάρτητα πειράματα εκφρασμένα ως προς το control. P<0.05\* vs CTL, \*\* vs ET-1+BTZ, #vs BTZ or BQ788, ## vs ET-1.

# 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η εισαγωγή του πρωτεασωμικού αναστολέα bortezomib (BTZ) στην κλινική πράξη βελτίωσε σημαντικά τη θεραπεία του ΠΜ. Παρόλα αυτά, η ανθεκτικότητα στον συγκεκριμένο αναστολέα, de novo ή αποκτούμενη, εξαιτίας κυρίως των μεταλλάξεων/υπερέκφρασης της β5-πρωτεασωμικής υπομονάδας [237] και/ή της ενεργοποίησης downstream σηματοδοτικών μονοπατιών [578], συνιστά ένα σημαντικό εμπόδιο στην επίτευξη καλών κλινικών αποτελεσμάτων. Με βάση τα ανωτέρω, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός νέων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών, με σκοπό την ενίσχυση της ευαισθησίας των ΠΜ ασθενών στο BTZ.

Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), ένας μέλος της οικογένειας των ισοπεπτιδίων μεγέθους 21-αα (ET-1, ET-2, ET-3), που αρχικά ταυτοποιήθηκε ως αγγειοσυσπαστικός παράγοντας που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων [449], επάγει τις βιολογικές της δράσεις μέσω 2 βασικών υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs (G-Protein Coupled Receptors), των ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R [458]. Ο άξονας της ET-1 έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και πρόοδο διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του προστάτη, των ωοθηκών, του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του ήπατος και του λάρυγγα [579-584, 497]. Και τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και τα σχετιζόμενα-με τον καρκίνο κύτταρα έχει δείχτει να υπερεκφράζουν την ET-1 και τους υποδοχείς της [497, 585, 493], συμμετέχοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [586], την αγγειογένεση [588], την ανθεκτικότητα στην απόπτωση [587], την μετανάστευση, την επιθετικότητα [499], την χημειοανθεκτικότητα [589, 521], την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και την χημειοταξία των μακροφάγων [588].

Παρόλο που ο άξονας της ET-1 έχει μελετηθεί με ιδιαίτερη λεπτομέρεια στους συμπαγείς όγκους, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον ρόλο του στις αιματολογικές κακοήθειες. Σε μία μόνο πρόσφατη μελέτη, οι *Maffei et al., 2014* [590] έδειξαν τον ρόλο της ET-1 μέσω του ET<sub>A</sub>R στην παθοφυσιολογία της χρόνιας B λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Chronic Lymphocytic Leukemia B cells, CLL), προάγοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την χημειο-ανθεκτικότητα, προτείνοντας έτσι ότι ο άξονας ET-1/ET<sub>A</sub>R ίσως συνιστά έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο στην CLL. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του ΠΜ, τα δεδομένα που προέρχονται από 2 από τις 7 μοριακές υποομάδες του ΠΜ προτείνουν μία

πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ET-1 σηματοδότησης, της παραγωγής του DKK1 και των οστικών ασθενειών [553, 591]. Παρόλα αυτά, προς το παρόν δεν υπάρχουν διαθέσιμα προκλινικά και κλινικά δεδομένα σχετικά με τον ρόλο του άξονα της ET-1 στο ΠΜ. Για αυτό, κύριο αντικείμενο της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του ρόλου του άξονα της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα και η πιθανή συμμετοχή αυτού του νευροπεπτιδίου στην επαγωγή ανθεκτικότητας σε ένα από τα κυριότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του ΠΜ, στον αναστολέα του UPS μονοπατιού, το bortezomib.

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήσαμε *in vitro* κλινικά μοντέλα με διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ-μία ευαίσθητη (NCI-H929) και μία ανθεκτική (RPMI-8226) στο BTZ κυτταρική σειρά. Η διαφορετική απόκριση στον πρωτεασωμικό αναστολέα βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες [564-567] και επιβεβαιώθηκε επιπλέον και στα δικά μας χέρια. Αρχικά, επειδή δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τον άξονα της ET-1 στο ΠΜ, δείξαμε την έκφραση των υποδοχέων ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R σε πρωτεϊνικό επίπεδο και στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήσαμε ζώνες στα αναμενόμενα μοριακά βάρη των 49 kD και των 48, 49 και 59 kD, χρησιμοποιώντας αντισώματα αντι-ETA και αντι-ETB αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα μοριακά μεγέθη κυμαίνονται σε ένα εύρος που φαίνεται να συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες για τους ET<sub>A</sub>R και ET<sub>B</sub>R υποδοχείς (32-70kD) [592-598]. Οι παρατηρούμενες διαφορές στα αναφερόμενα μοριακά μεγέθη μπορεί να οφείλονται στην προέλευση του αντισώματος, σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, να είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής *in vivo* πρωτεολυτικής επεξεργασίας ή τελικά να είναι το αποτέλεσμα της μη ακριβούς εκτίμησης του μοριακού μεγέθους των μεμβρανικών πρωτεϊνών από την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση [559]. Συγκεκριμένα, η παρατηρούμενη ζώνη στο μοριακό μέγεθος των 49kD για τον υποδοχέα ET<sub>A</sub>R φαίνεται να αντιστοιχεί στην ισομορφή 1, ενώ οι ζώνες με μοριακά μεγέθη 48, 49 και 59 kD για τον ET<sub>B</sub>R στις αντίστοιχες ισομορφές A, B και C, οι οποίες οφείλονται σε εναλλακτικό μάτισμα και παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς [599-604].

Ημιοσοτικός προσδιορισμός των ληφθέντων ζωνών αποκάλυψε ότι παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης του ET<sub>A</sub>R είναι τα ίδια και στις 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές, η BTZ-ανθεκτική κυτταρική σειρά RPMI-8226 παρουσιάζει ~30% υψηλότερα επίπεδα

έκφρασης για τον ET<sub>B</sub>R υποδοχέα. Επίσης, στις πειραματικές συνθήκες που διεξήχθη η παρούσα έρευνα, οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές βρέθηκε να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ενδοκυττάριας/έκκρινόμενης ET-1, με την RPMI-8226 να παράγει/εκκρίνει υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με την NCI-H929, στην οποία πρακτικά παρατηρήθηκαν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του πεπτιδίου. Το τελευταίο είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει μη ανιχνεύσιμα επίπεδα της ET-1 στα μη διεγερμένα Β και Τ λεμφοκύτταρα ή ουδετερόφιλα και σε κυτταρικές σειρές αιματολογικών κακοηθειών [605-607, 579].

Σε μία προηγούμενη μελέτη, δείξαμε ότι η αυξημένη σηματοδότηση των νευροπεπτιδίων ως αποτέλεσμα της απώλειας της νευροπεπτιδάσης (NEP) και η υπερενεργοποιημένη NF-κΒ σηματοδότηση, ως αποτέλεσμα της αυξημένης πρωτεασωμικής δραστηριότητας αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά της εξέλιξης του ανδρογονο-εξαρτώμενου στον ανδρονο-ανεξάρτητο φαινότυπο στον καρκίνο του προστάτη [556]. Έτσι μελετήσαμε εάν πιθανή διαταραχή στα επίπεδα έκφρασης της NEP μπορεί να σχετίζονται με τις παρατηρούμενες διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της ET-1 στα ΠΜ κύτταρα και με ταυτόχρονη ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο BTZ. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι οι ΠΜ κυτταρικές σειρές RPMI-8226 και NCI-H929 ήταν αρνητικές ως προς την έκφραση της NEP, το οποίο ήταν σύμφωνο με αυτά που αναφέρθηκαν από τους *Gooding et al. 1999* [617], πιθανώς προτείνοντας ότι η έκφραση της νευροπεπτιδάσης ίσως να μην παίζει κάποιο κρίσιμο ρόλο στο ΠΜ.

Αφού βρέθηκε ότι οι κυριότεροι παράγοντες του άξονα της ET-1 εκφράζονται στα ΠΜ κύτταρα και ότι οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης και παραγωγής/έκκρισης του ET<sub>B</sub>R και της ET-1 αντίστοιχα, διερωτηθήκαμε σε ένα μετέπειτα στάδιο εάν ο άξονας της ET-1 μπορεί να σχετίζεται με τον BTZ-ανθεκτικό φαινότυπο, καθώς ταυτόχρονα οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσίαζαν και διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ET-1 απευθείας επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διεγείροντας την ανάπτυξη σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro*, περιλαμβάνοντας κύτταρα από καρκίνους του μαστού, του ήπατος, του παγκρέατος, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας, του λάρυγγα και του θυρεοειδούς [611-615, 580, 493, 440, 472], ενώ έχει βρεθεί να δρα



συνεργικά και με άλλους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι έχουν εμπλακεί στην πρόοδο του καρκίνου [616]. Για το σκοπό αυτό, οι 2 ΠΜ κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν στο BTZ παρουσία ή απουσία της ET-1 και εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κάτω από τις εξεταζόμενες συνθήκες της παρούσας έρευνας, βρέθηκε ότι η προσθήκη της ET-1 στην BTZ-ευαίσθητη NCI-H929 κυτταρική σειρά ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό είτε μόνη της είτε κυρίως παρουσία του BTZ επάγοντας έναν ανθεκτικό στον BTZ φαινότυπο στην κατά τ'άλλα ευαίσθητη NCI-H929 κυτταρική σειρά, προτείνοντας ότι η προσθήκη εξωγενώς της ET-1 μπορεί να προστατεύσει τα ευαίσθητα κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε αντίθεση με τα NCI-H929, η ET-1 δεν είχε καμία επίδραση στα ανθεκτικά RPMI-8226 κύτταρα. Ο πιθανός αυτοκρινής ρόλος της ET-1 στην RPMI-8226 κυτταρική σειρά εξαιτίας της παραγωγής/έκκρισης της ενδογενούς ET-1 από τα ίδια τα κύτταρα ίσως δικαιολογεί τα προηγούμενα ληφθέντα αποτελέσματα.

Έχοντας δείξει ότι η ET-1 ίσως επάγει ανθεκτικότητα στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα, ο επόμενος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου η ET-1 προστατεύει τα ΠΜ κύτταρα από τον πρωτεασωμικό αναστολέα. Η επώαση των κυττάρων με τους χημικούς ανταγωνιστές των  $ET_A$ R και  $ET_B$ R υποδοχέων στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έδειξε ότι η δράση της ET-1 στην απόκτηση του ανθεκτικού φαινότυπου ίσως μεσολαβείται μέσω του  $ET_B$ R υποδοχέα. Πράγματι, όταν η NCI-H929 κυτταρική σειρά προεπώαστηκε με τον BQ788 μόνο του δεν επηρεάστηκε η κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ παρουσία της ET-1 περιορίστηκαν οι προστατευτικές δράσεις του νευροπεπτιδίου, επανευαισθητοποιώντας τα μυελωματικά κύτταρα στο φάρμακο, σε αντίθεση με τον BQ123 (επιλεκτικό ανταγωνιστή του  $ET_A$ R), ο οποίος βρέθηκε να μην έχει καμία δράση. Επιπροσθέτως, όταν τα BTZ-ανθεκτικά RPMI-8226 κύτταρα προεπώαστηκαν με τον BQ788 μόνο του, παρατηρήθηκε μία μείωση στη βιωσιμότητα, η οποία έφτασε σε υψηλότερα επίπεδα παρουσία του BTZ, ενισχύοντας έτσι τις ανασταλτικές του δράσεις. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα που λήφθηκαν για τα RPMI-8226 επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα  $ET_B$ R, χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο siRNA ριβονουκλεοτίδιο. Τα ευρήματά μας προτείνουν ότι η παρεμπόδιση του  $ET_B$ R υποδοχέα με τον εξειδικευμένο

ανταγωνιστή BQ788 μπορεί να επαναφέρει τα επίπεδα ευαισθησίας στο BTZ, γεγονός που δείχνει ότι ίσως η ET-1 επάγει προστατευτικά σήματα στα ΠΜ κύτταρα μέσω του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση δειγμάτων μελανώματος ταυτοποίησαν τον ET<sub>B</sub>R υποδοχέα ως έναν βασικό δείκτη της προόδου του μελανώματος, ο οποίος σχετίζεται με έναν επιθετικό φαινότυπο [620, 621]. Παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R με τον ETB ανταγωνιστή BQ788 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης και τον θάνατο των κυττάρων του μελανώματος *in vivo* και *in vitro*, αντιπροσωπεύοντας έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου [465, 527, 622].

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας στη σταθερή κατάσταση έχουν σχετιστεί με ανθεκτικότητα σε πρωτεασωμικούς αναστολείς στις καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα και μαστού [623, 624]. Επίσης οι *Bianchi et al., 2009* [394], έδειξαν ότι οι PI-ευαίσθητες ΠΜ κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας χυμοτρυψίνης και φέρουν χαμηλότερα επίπεδα ανοσοκαταλυτικών υπομονάδων, γεγονός που ευθύνεται για την μειωμένη πρωτεασωμική δραστηριότητα. Σε συμφωνία με αυτά τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ~30% υψηλότερα επίπεδα πρωτεασωμικής δραστηριότητας στην σταθερή κατάσταση στην BTZ-ανθεκτική RPMI-8226 κυτταρική σειρά συγκριτικά με την ευαίσθητη NCI-H929.

Κατόπιν, προκειμένου να διερευνήσουμε τους πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς του προστατευτικού ρόλου της ET-1 ενάντια στις BTZ-μεσολαβούμενες αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις, εξετάσαμε την ύπαρξη πιθανής σχέσης μεταξύ του ET-1/ET<sub>B</sub>R άξονα και του UPS μονοπατιού στο ΠΜ, εκτιμώντας την 20S δράση χυμοτρυψίνης μετά από επώαση της ανθεκτικής και ευαίσθητης κυτταρικής σειράς με BTZ με ή χωρίς ET-1. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ET-1 μπορεί να αυξορρυθμίσει κατά ~30% την 20S πρωτεασωμική δραστηριότητα στην ευαίσθητη NCI-H929 κυτταρική σειρά, προσεγγίζοντας έτσι τα επίπεδα ανθεκτικότητας της RPMI-8226 κυτταρικής σειράς και αυτή η ενεργοποίηση φάνηκε να ευθύνεται για την παρατηρούμενη μείωση των BTZ-μεσολαβούμενων ανασταλτικών δράσεων στο ΠΜ. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα που λήφθηκαν στον

πολλαπλασιασμό, όταν τα RPMI-8226 κύτταρα επώαστηκαν με τον BQ788 μόνο του ή διαμολύνθηκαν με το εξειδικευμένο ET<sub>B</sub>R siRNA, παρατηρήθηκε μία αναστολή στα επίπεδα της πρωτεασωμικής δραστηριότητας, η οποία ήταν πιο έντονη παρουσία του BTZ.

Αυτά τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, στις οποίες δείχτηκε ότι η ET-1 αλληλεπιδρά με το UPS μονοπάτι, οδηγώντας σε σταδιακή αύξηση της ενεργότητας του 20S πρωτεασώματος στην PC3 προστατική καρκινική κυτταρική σειρά [561, 562]. Ο συνδυασμός με τον ET<sub>B</sub>R ανταγωνιστή ανέστειλε τις προστατευτικές δράσεις της ET-1, επανευαισθητοποιώντας τα μυελωματικά κύτταρα στο φάρμακο, προτείνοντας ότι ο άξονας της ET-1 σχετίζεται με το UPS μονοπάτι μέσω του ET<sub>B</sub>R υποδοχέα.

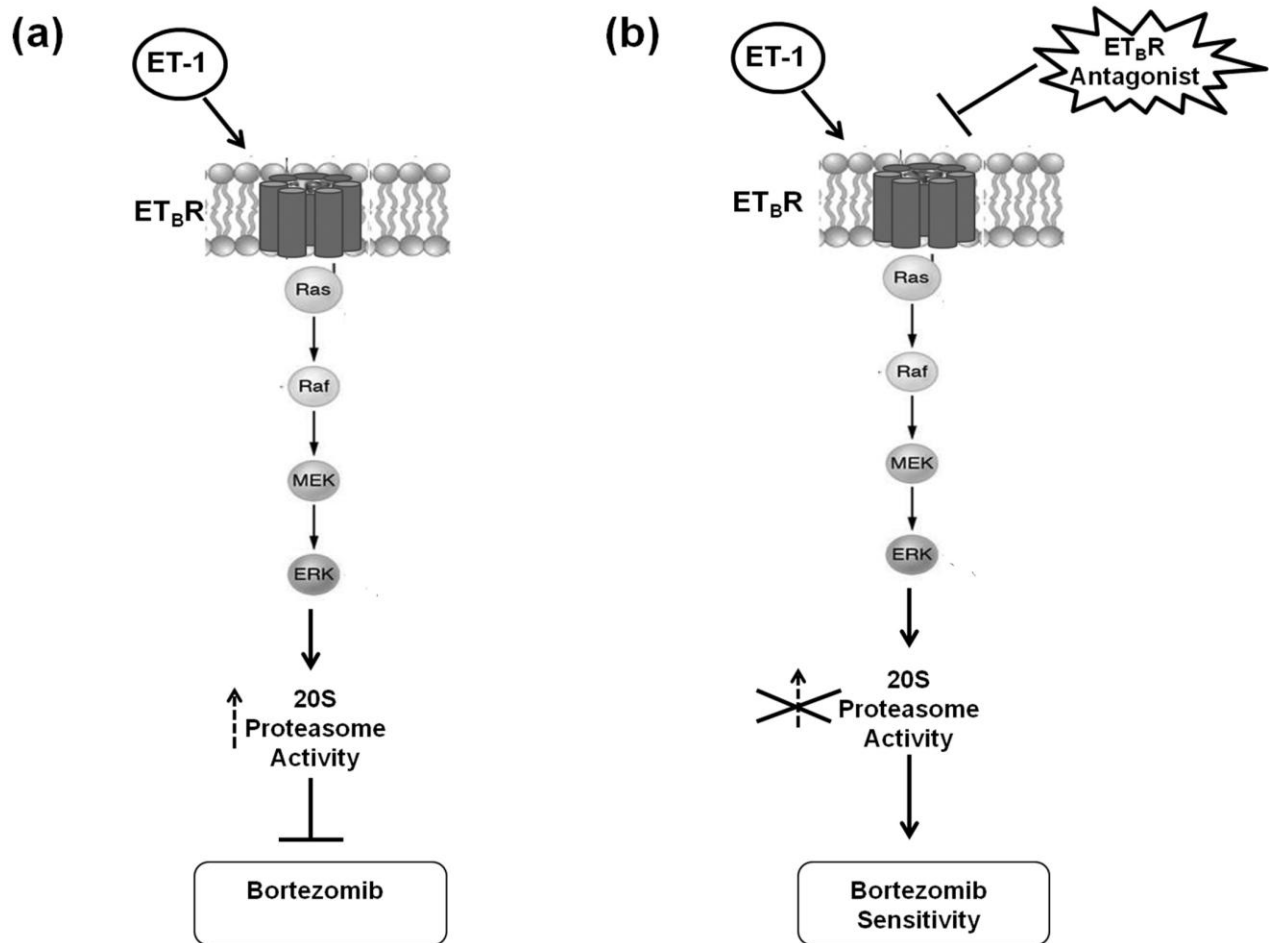
Προηγούμενα δεδομένα έδειξαν ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια Akt και MAPK παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των ΠΜ κυττάρων [627, 574]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το MAPK μονοπάτι είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής στη ρύθμιση της έκφρασης και δραστηριότητας του ET<sub>B</sub>R [628]. Η κινάση Erk1/2 (Extracellular-signal regulated kinase, p44/42) ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα Tyr185 και Thr183 από μία διπλής εξειδίκευσης κινάση MEK, η οποία ενεργοποιείται από την Raf-1, που με τη σειρά της επάγεται από την GTP-δεσμευμένη ενεργοποιημένη μορφή του Ras. Υπό αυτό το πρίσμα, στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε τα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων η ενεργοποίηση του ET-1/ET<sub>B</sub>R συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε την ενεργοποίηση των τελεστών μορίων p-Erk1/2, p-Akt και p-p70S6K που εντοπίζονται downstream των ET-1 υποδοχέων.

Στις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης, παρατηρήσαμε πάλι ότι επώαση με την ET-1 μπορεί να διασώσει τα NCI-H929 κύτταρα από την BTZ-επαγόμενη μείωση των Erk1/2 επιπέδων φωσφορυλίωσης. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, συνδυασμένη χορήγηση του BQ788 ανταγωνιστή ανέστειλε τις προστατευτικές δράσεις της ET-1, επανευαισθητοποιώντας τα NCI-H929 κύτταρα στο BTZ. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με τα ανθεκτικά κύτταρα RPMI-8226 στα οποία έκθεση με τον BQ788 μόνο του έδειξε μία μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του Erk1/2, συγκριτικά με τα control. Συνδυασμένη χορήγηση του BQ788 και του BTZ προκάλεσε ισχυρότερη αναστολή

των επιπέδων φωσφορυλίωσης του Erk1/2, παρόμοια με αυτή που επιτεύχθηκε με το BTZ μόνο του στην ευαίσθητη NCI-H929 κυτταρική σειρά.

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, μεταξύ των διαφόρων επώσεων. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το Raf/MEK/Erk1/2 μονοπάτι είναι ένας πιθανός σύνδεσμος μεταξύ του άξονα της ET-1 και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο BTZ στο ΠΜ. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας αναφέρουν μία σχέση μεταξύ των UPS και MAPK μονοπατιών, δείχνοντας ότι ο πρωτεασωμικός αναστολέας BTZ μπορεί να δράσει μέσω μειορύθμισης του p44/42 MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη καθώς και σε αιματολογικούς καρκίνους, όπως λευχαιμίες και πολλαπλό μυέλωμα [624, 629-633, 321].

Συμπερασματικά, το ΠΜ χαρακτηρίζεται κλινικά από καλή αρχική απόκριση στην θεραπεία, αλλά ακόμη και οι ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση μετά από standard ή υψηλών δόσεων θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν το BTZ, αναπτύσσουν σταδιακά χημειοανθεκτικότητα [634]. Επιπρόσθετα με τον ρόλο της ET-1 στους διάφορους συμπαγείς όγκους, τα ευρήματα της παρούσας έρευνας τονίζουν για πρώτη φορά την σημασία του άξονα ET-1/ET<sub>B</sub>R στο ΠΜ και παρέχουν έναν μηχανισμό μέσω του οποίου τα ΠΜ κύτταρα διαφεύγουν από τις BTZ-μεσολαβούμενες ανασταλτικές δράσεις. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ένα μοντέλο στο οποίο οι αλληλεπιδράσεις/συσχετίσεις μεταξύ του άξονα ET-1/ET<sub>B</sub>R και του UPS μονοπατιού μέσω του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού πιθανόν κατέχουν έναν ρόλο- κλειδί στη ρύθμιση της ευαισθησίας των ΠΜ κυττάρων στο BTZ (**Εικόνα 5.1**). Μελλοντικές μελέτες σε κλινικά δείγματα των ΠΜ διαγνωσθέντων ασθενών θα επιβεβαιώσουν τον ρόλο του ET-1/ET<sub>B</sub>R άξονα στην BTZ μεσολαβούμενη ανθεκτικότητα. Η ικανότητα του ET<sub>B</sub>R εξειδικευμένου ανταγωνιστή να παρεμβαίνει σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια προστατευτικά σήματα των ΠΜ κυττάρων ίσως αντιπροσωπεύει μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση του ΠΜ, παρέχοντας τη βάση για περαιτέρω κλινικές μελέτες με απώτερο στόχο την ενίσχυση της κλινικής αποτελεσματικότητας, τη μείωση της κυτταροτοξικότητας και την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στο BTZ σε ασθενείς με επιδεινούμενο και υποτροπιάζον ΠΜ.



**Εικόνα 5.1:** Προτεινόμενο μοντέλο για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των ET-1/ET<sub>B</sub>R και UPS μονοπατιών που συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ στα ΠΜ κύτταρα. (a) Δέσμευση της ET-1 στον ET<sub>B</sub>R επάγει την ενεργοποίηση του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού, που συμβάλλει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στο BTZ, μέσω αυξορύθμισης της 20S πρωτεασωματικής δραστηριότητας. (b) Παρεμπόδιση του ET<sub>B</sub>R επαναφέρει την ευαισθησία στο φάρμακο.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

---

1. Durie B.G. The biology of multiple myeloma. *Hematol Oncol*, 6:77-81, 1988.
2. Gahrton G. Bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Ann Oncol*, 8:-219-221, 1997.
3. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I et al. Multiple myeloma. *Lancet*, 374:324-339, 2009.
4. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*, 2(3):175-187, 2002.
5. Abildgaard N., Bendix HK., Krinstensen JE., et al. Bone marrow fibrosis and disease activity in multiple myeloma monitored by the aminoterminal propeptide of procollagen III in serum. *Br J Haematol*, 99:641-8, 1997.
6. Dammaco F., Miggiotta A., Tribalto M., et al. The expanding spectrum of clinical and laboratory features of IgE myeloma. *La Ricerca Clin Lab*, 10:583-90, 1980.
7. Eckert F., Schmid L., Kradolfer D., et al. Bone marrow plasmacytosis. An immunohistological study. *Blood*, 53:11-9, 1986.
8. Alexanian R., Wiernik PH., Canellos GP., Kyle RA. et al. Diagnosis and management of multiple myeloma in neoplastic diseases of the blood. New York. Churchill Livingstone, 453-66, 1991.
9. Gould J., Alexanian K., Goodacre A., et al. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood*, 71:453-6, 1988.
10. Chevaert C., Fournier M., Bernardi F., et al. Non-secretory multiple myeloma with multinucleated giant plasma cells. *Leuk Lymphoma*, 27:185-9, 1997.
11. Epstein J., Xiao H., He XY. et al. Markers of multiple hematopoietic cell lineages in multiple myeloma. *New Engl J Med*, 322:664-8, 1990.
12. Gordon V., Bezwoda W., Derman D., et al. Quantitation of the monoclonal plasma cell component in bone marrow from patients with serum paraproteinemia and nondiagnostic marrow morphology. *Am J Hematol*, 23:81-7, 1986.
13. Hirano T., Yasukawa K., Harada H., et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that includes B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324:73-7, 1986.
14. Malpas JS, Bergsagel DE., Kyle R., Anderson K. Multiple myeloma: Biology and Management. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2004.
15. Ludwig H., Bolejack V., Crowley J., et al. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 28:1599-1605, 2010.
16. Landgren O., Gridley G., Turesson I., et al. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood*, 107:904-06, 2006.
17. National Cancer Institute. Surveillance epidemiology and end results program. SEER stat fact sheets on multiple myeloma. 2013. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html> (accessed April 24, 2013).
18. Landgren O., Weiss BM. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*, 23:1691-1697, 2009.
19. Mahindra A., Laubach J., Raje N., Munshi N., Richardson PG., Anderson K. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(3):135-143, 2012.
20. Abbas AK., L.A. Cellular and Molecular Immunology, 5<sup>th</sup> edition: Saunders, 2003.
21. Shapiro-Shelef M. and Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol*, 16:226-234, 2004.
22. McHeyzer-Williams L.J. and McHeyzer-Williams M.G. Antigen-specific memory B cell development. *Annu rev Immunol*, 23:487-513, 2005.
23. McHeyzer-Williams M.G. B cells effectors. *Curr Opin Immunol*, 15:354-361, 2003.
24. Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J. and MacLennan I.C.. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*, 342:929-931, 1989.
25. Martinez-Valdez H., Malisan F., de Bouteiller O., Guret C., Banchereau J., Liu Y.J. Molecular evidence that in vivo isotype switching occurs within the germinal centers. *Ann N Y Acad Sci*, 764:151-154, 1995.
26. O' Connor BP., Gleeson MW., Noelle RJ. et al. The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease. *Immunol Rev*, 194:61-76, 2003.
27. Gorgun GT., Whitehill G., Anderson JL., et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*, 121:2975-87, 2013.
28. Kuehl WM., Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*, 2:175-187, 2002.
29. Brioli A., Melchor L., Walker BA., Davies FE., Morgan GJ. Biology and treatment of myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 14(S3):S65-70, 2014.

30. Dispenzieri A., et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet*, 375(9727):1721-1728, 2010.
31. Kyle RA., et al. prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354(13):1362-1369, 2006.
32. Zingone A., Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. *Semin Hematol*, 48(1):4-12, 2011.
33. Rajkumar SV., Gupta V., Fonseca R., et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*, 27:1738-1744, 2013.
34. Neben K., Jauch A., Hielscher T., et al. progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *J Clin Oncol*, 31:4325-4332, 2013.
35. Morgan GJ., Walker BA., Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12:335-48, 2012.
36. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, 121:749-57, 2003.
37. Walker BA., Wardell CP., Melchor L., et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*, 28:384-90, 2014.
38. Rollig C., Knop S., Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet*, 385(9983):2197-208, 2015.
39. Keats JJ., Chesi M., Egan JB., et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120:1067-76, 2012.
40. Magrangeas F., Aver-Loiseau H., Gouraud W., et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*, 27:473-81, 2013.
41. Dimopoulos M.A., Terpos E. Multiple myeloma. *Annals of Oncology*, 21(supplement 7): vii143-vii150, 2010.
42. Bergsagel PL., Kuehl WM., Zhan F., Sawyer J., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106:296-303, 2005.
43. Walker BA., Wardell CP., Johnson DC., et al. Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur in pregerminal center B cells. *Blood*, 121:3413-9, 2013.
44. Broderick P., Chubb D., Johnson D., et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*, 44:58-61, 2012.
45. Fonseca R. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23(12):2210-2221, 2009.
46. Hurt EM., et al. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*, 5(2):191-199, 2004.
47. Bergsagel PL., Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23(26):6333-6338, 2005.
48. Kuehl WM., Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10):3456-3463, 2012.
49. Marango J., et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood*, 111(6):3145-3154, 2008.
50. Martinez-Garcia E., et al. The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, 117(1):211-220, 2011.
51. Zingone A., et al. Ectopic expression of wild-type FGFR3 cooperates with MYC to accelerate development of B-cell lineage neoplasms. *Leukemia*, 24(6):1171-1178, 2010.
52. Qing J., et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *J Clin Invest*, 119(5):1216-1229, 2009.
53. Trudel S. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood*, 105(7):2941-2948, 2005.
54. Chesi M., Bergsagel PL. Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011:344-53, 2011.
55. Chapman MA., Lawrence MS., Keats JJ., et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471:467-72, 2011.
56. Chng WJ., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T., et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 22:2280-4, 2008.



57. Chesi M., Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*, 97:313-23, 2013.
58. Steinbrunn T., Stuhmer T., Gattenlohner S., et al. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood*, 117:1998-2004, 2011.
59. Melchor L., Brioli A., Wardell CP., et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*, 28(8):1705-15, 2014.
60. Holien T., Vatsveen TK., Hella H., Waage A., Sundan A. Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood*, 120:2450-3, 2012.
61. Gabrea A., Marreli ML., Qi Y., et al. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 47:573-90, 2008.
62. Walker BA., Leone PE., Chiecchio L., et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 116:e56-65, 2010.
63. Avet-Loiseau H., Gerson F., Magrangeras F., et al. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 98:3082-6, 2001.
64. Chng WJ., Huang GF., Chung TH., et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*, 25:1026-35, 2011.
65. Walker B., Wardell C., Brioli A., et al. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J*, 2014:4.
66. Annunziata CM., Davis RE., Dmchenko Y., et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12:115-30, 2007.
67. Keats JJ., Fonseca R., Chesi M., et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12:131-44, 2007.
68. Elgueta R., de Vries VC., Noelle RJ. The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev*, 236:139-50, 2010.
69. Lode L., et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*, 95(11):1973-1976, 2010.
70. Pichiorri F., et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*, 18(4):367-381, 2010.
71. Boyd KD., et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res*, 17(24):7776-7784, 2011.
72. Dib A., et al. Paradoxical expression of INK4c in proliferative multiple myeloma tumors: bi-allelic deletion vs increased expression. *Cell Div*, 1:23, 2006.
73. Chiecchio L., et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, 94(12):1708-1713, 2009.
74. Kawano Y., Moschetta M., Manier S., Glavey S., Gorgun G.T., Roccaro A.M., Anderson K.C., Ghobrial I.M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological Reviews*, 263:160-172, 2015.
75. Gabrilovich DI., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9:162-174, 2009.
76. Brimnes MK., et al. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR(-)/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol*, 72:540-547, 2010.
77. Gorgun GT., et al. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*, 121:2975-2987, 2013.
78. Ramachandran IR., et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol*, 190:3815-3823, 2013.
79. Favaloro J., et al. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 55(12):2893-900, 2014.
80. Serafini P., et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*, 203:2691-2702, 2006.
81. Serafini P., Mgebhoff S., Noonan K., Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance

- in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res*, 68:5439–5449, 2008.
82. Meyer C, et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanomamodel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:17111–17116, 2011.
83. MuthuRaja KR, Rihova L, Zahradova L, Klincova M, Penka M, Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS ONE*, 7:e47077, 2012.
84. Giannopoulos K, Kaminska W, Hus I, Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer*, 106:546–552, 2012.
85. Beyer M, et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*, 107:3940–3949, 2006.
86. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+) 25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 105:2862–2868, 2005.
87. Ghiringhelli F, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34:336–344, 2004.
88. Chauhan D, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell*, 16:309–323, 2009.
89. Famularo G, et al. Natural killer cell frequency and function in patients with monoclonal gammopathies. *J Clin Lab Immunol*, 37:99–109, 1992.
90. Sawanobori M, Suzuki K, Nakagawa Y, Inoue Y, Utsuyama M, Hirokawa K. Natural killer cell frequency and serum cytokine levels in monoclonal gammopathies: correlation of bone marrow granular lymphocytes to prognosis. *Acta Haematol* 98:150–154, 1997.
91. Jinushi M, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1285–1290, 2008.
92. Benson DM, Jr, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*, 116:2286–2294, 2010.
93. Zheng Y, et al. PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. *Leukemia*, 27:702–710, 2013.
94. Berardi S, et al. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *J Oncol* 2013:183602, 2013.
95. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 104:607–618, 2004.
96. Markovina S, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF-kappaB activity in myeloma cells. *Mol Cancer* 2010;9:176.
97. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*, 3:756–767, 2003.
98. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*, 103:3503–3510, 2004.
99. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron*, 4:325–337, 2011.
100. Tanno T, et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood*, 123:725–733, 2014.
101. Chou T. Multiple Myeloma: recent progress in diagnosis and treatment. *J Clin Exp Hematopathol*, 52(3):149–159, 2012.
102. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res*, 63:912–916, 2003.
103. Tian E, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*, 349:2483–2494, 2003.
104. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* 2009;23:435–441.
105. Ehrlich LA, Roodman GD. The role of immune cells and inflammatory cytokines in Paget's disease and multiple myeloma. *Immunol Rev*, 208:252–266, 2005.
106. Body JJ, et al. A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12:1221–1228, 2006.

107. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle R, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc*, 81:1575–1578, 2006.
108. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines. *Mayo Clin Proc*, 84:1095–1110, 2009.
109. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia* 23:1941–1956, 2009.
110. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23: 3–9, 2009.
111. Regelink JC, Minnema MC, Terpos E, et al. Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: A systematic review. *Br J Haematol*, 162:50–61, 2013.
112. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL, et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia*, 23:1545–1556, 2009.
113. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al, and the International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*, 23: 215–24, 2009.
114. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al, and the International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20: 1467–73, 2006.
115. Rajkumar S.V. Multiple Myeloma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 89(10):998-1009, 2014.
116. Kyle RA, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 24(6):1121–1127, 2010.
117. Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle R, Anderson K. *Multiple Myeloma: Biology and Management*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2004.
118. Bochtler T, et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood*, 111(9):4700–4705, 2008.
119. Russell SJ, Rajkumar SV. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol*, 12:617–619, 2011.
120. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36:842–854, 1975.
121. Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23:3412–3420, 2005.
122. Hari PN, Zhang MJ, Roy V, et al. Is the international staging system superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*, 23:1528–1534, 2009.
123. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: Spotlight review. *Leukemia*, 23:2210–2221, 2009.
124. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: Impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, 119:2100–2105, 2012.
125. Kyle RA, Rajkumar SV: Treatment of multiple myeloma: a comprehensive review. *Clin Lymphoma Myeloma*, 9:278-288, 2009.
126. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*, 8:479–491, 2011.
127. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma [see comments]. *N Engl J Med*, 341:1565–1571, 1999.
128. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 352:2487–2498, 2005.
129. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 106:4050–4053, 2005.
130. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, et al. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 108:3458–3464, 2006.
131. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: An open-

- label randomized controlled trial. *Lancet Oncol*, 11:29–37, 2010.
132. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: A randomised phase 3 study. *Lancet*, 376:2075–2085, 2010.
133. Barlogie B, Anaissie E, van Rhee F, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *Br J Haematol* 138:176–185, 2007.
134. van Rhee F, Szymonifka J, Anaissie E, et al. Total therapy 3 for multiple myeloma: Prognostic implications of cumulative dosing and premature discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood*, 116:1220–1227.
135. Nair B, van Rhee F, Shaughnessy JD Jr, et al. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood*, 115:4168–4173, 2010.
136. Mateos MV, Oriol A, Martinez-Lopez J. Bortezomib/melphalan/prednisone (VMP) versus Bortezomib/Thalidomide/Prednisone (VTP) as induction therapy followed by maintenance treatment with Bortezomib/Thalidomide (VT) versus Bortezomib/Prednisone (VP): A randomized trial in elderly untreated patients with multiple myeloma older than 65 years. *Lancet Oncol*, 11:934–941, 2010.
137. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: A randomized controlled trial. *J Clin Oncol*, 28:5101–5109, 2010.
138. Jakubowiak AJ, Dytfield D, Griffith KA, et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood*, 120:1801–1809, 2012.
139. Zingone A, Kwok ML, Manasanch EE, et al. Phase II clinical and correlative study of carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone followed by lenalidomide extended dosing (CRDR) induces high rates of MRD negativity in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients. *Blood*, 122:538, 2013.
140. Gulbrandsen N, Waage A, Gimsing P et al. A randomised placebo controlled study with melphalan/prednisone vs. melphalan/prednisone/thalidomide: quality of life and toxicity. *Haematologica*, 93 abstract 0209, 2008.
141. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomized controlled trial. *Lancet*, 367: 825–831, 2006.
142. Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM et al. Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized controlled trial. *Blood*, 112: 3107–3114, 2008.
143. Facon T, Mary JY, Hulin C et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*, 370: 1209–1218, 2007.
144. Hulin C, Facon T, Rodon P et al. Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly-diagnosed multiple myeloma: IFM01/01 trial. *J Clin Oncol*, 27: 3664–3670, 2009.
145. Wijermans P, Schaafsma M, van Norden Y et al. Melphalan + prednisone versus melphalan + prednisone + thalidomide in induction therapy for multiple myeloma in elderly patients: final analysis of the Dutch cooperative group HOVON 49 study. *Blood*, 112: abstract 649, 2008.
146. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*, 359:906–917, 2008.
147. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, et al. Overall survival benefit for bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide (VMPTVT) versus bortezomib-melphalan-prednisone (VMP) in newly diagnosed multiple myeloma patients. *ASH Annu Meet Abstr*, 120:200, 2012.
148. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*, 111:2962–2972, 2008.
149. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood*, 110: 3557–3560, 2007.
150. Orłowski RZ, Nagler A, Sonneveld P et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol*, 25: 3892–3901, 2007.
151. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or

- refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 357:2123–2132, 2007
152. Weber DM, Chen C, Niesvizky R et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med*, 357:2133–2142, 2007.
153. Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A et al. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia*, 23: 2147–2152, 2009.
154. Siegel DS, Martin T, Wang M, et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 120: 2817–25, 2012.
155. Vij R, Siegel DS, Jagannath S, et al. An open-label, single-arm, phase 2 study of single-agent carfilzomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma who have been previously treated with bortezomib. *Br J Haematol*, 158: 739–48, 2012.
156. Bringhen S, Petrucci MT, Larocca A, et al. Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: A multicenter, phase 2 study, 124:63–69, 2014.
157. Jakubowiak AJ. Evolution of carfilzomib dose and schedule in patients with multiple myeloma: A historical overview. *Cancer Treat Rev*, 40:781–790, 2014.
158. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 14: 1055–66, 2013.
159. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol*, 28: 2077–84, 2010.
160. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al, and the IFM Investigators. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012; 366: 1782–91.
161. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, *et al.*: Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 366:1782-1791, 2012
162. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, *et al.*: Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 366:1770-1781, 2012
163. Falco P, Cavallo F, Larocca A, Rossi D, Guglielmelli T, *et al.*: Lenalidomide-prednisone induction followed by lenalidomide-melphalan-prednisone consolidation and lenalidomide-prednisone maintenance in newly diagnosed elderly unfit myeloma patients. *Leukemia* 2012 [doi:10.1038/leu.2012.271]
164. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, *et al.*: Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma : a randomised phase 3 study. *Lancet*, 376:2075-2085, 2010.
165. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, *et al.*: Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma :Results of the randomized phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*, 30:2946-2955, 2012.
166. Ostrowska H. The ubiquitin-proteasome system: a novel target for anticancer and anti-inflammatory drug research. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 13:353-365, 2008.
167. Cao B., Mao X. The ubiquitin-proteasomal system is critical for multiple myeloma: implications in drug discovery. *Am J Blood Res*, 1(1):46-56, 2011.
168. Chauhan D., Hideshima T., Mitsiades C., et al. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*, 4:686-692, 2005.
169. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBOJ*, 17:7151-7160, 1998.
170. Colland F. The therapeutic potential of deubiquitinating enzyme inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 38:137-143, 2010.
171. Schulman BA, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:319-331, 2009.
172. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 78:399-434, 2009.
173. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*, 14:10-21, 2008.
174. Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:755-764, 2009.

175. Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell*. 1998;1(2):193–202.
176. Polo S, Sigismund S, Faretta M, et al. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. 2002;416(6879):451–455.
177. Zhou W, Zhu P, Wang J, et al. Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell*. 2008;29(1):69–80.
178. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*. 2005;17(3):331–339.
179. Huang TT, D'Andrea AD. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):323–334.
180. Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, et al. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol*. 2006;8(4):339–347.
181. Grigoreva T.A, Tribulovich V.G., Garabadzchiu A.V., Melino G, Barlev N.A. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. *Oncotarget*, Epub ahead of print, 2015.
182. Adams J. The proteasome: a suitable anti-neoplastic target. *Nature reviews Cancer*, 4:349–360, 2004.
183. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82:373–428, 2002.
184. Moiseeva TN, Bottrill A, Melino G, Barlev NA. DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity. *Oncotarget*, 4:1338–1348, 2013.
185. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*, 68:1015–1068, 1999.
186. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *The Journal of biological chemistry*, 272:25200–25209, 1997.
187. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *The Journal of biological chemistry*, 278:35869–35877, 2003.
188. Groll M, Heinemeyer W, Jager S, Jäger S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:10975–10983, 1999.
189. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry Biokhimiia*, 74:1411–1442, 2009.
190. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94:615–623, 1998.
191. D'Arcy P, Linder S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44:1729–1738, 2012.
192. Pick E, Berman TS. Formation of alternative proteasomes: same lady, different cap?. *FEBS letters*, 587:389–393, 2013.
193. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. *Molecular cell*, 41:8–19, 2011.
194. Ramadan K. p97/VCP- and Lys48-linked polyubiquitination form a new signaling pathway in DNA damage response. *Cell cycle*, 11:1062–1069, 2012.
195. Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature*, 353(6342):357–360, 1991.
196. Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*, 353(6345):664–667, 1991.
197. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol.*, 156(7):2361–2364, 1996.
198. Parlati F, Lee SJ, Aujay M, et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*. 114(16):3439–3447, 2009.
199. Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D, Larson A, Williams CC, Li GW, Zhou S, King D, Shen PS, Weibezahn J, Dunn JG, Rouskin S, Inada T, Frost A, Weissman JS. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell*, 151:1042–1054, 2012.
200. Defenouillere Q, Yao Y, Mouaikel J, Namane A, Galopier A, Decourty L, Doyen A, Malabat C, Saveanu C, Jacquier A, Fromont-Racine M. Cdc48-associated com-

- plex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:5046–5051, 2013.
201. Ruschak A.M., Slassi M., Kay L.E., Schimmer A.D. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst*, 103(13):1007-17, 2011.
202. Kulichkova VA, Tsimokha AS, Fedorova OA, Moiseeva TN, Bottril A, Lezina L, Gauze LN, Konstantinova IM, Mittenberg AG, Barlev NA. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. *Cell cycle*, 9:840–849, 2010.
203. Fedorova OA, Moiseeva TN, Nikiforov AA, Tsimokha AS, Livinskaya VA, Hodson M, Bottrill A, Evtseva IN, Ermolayeva JB, Kuznetzova IM, Turoverov KK, Eperon I, Barlev NA. Proteomic analysis of the 20S proteasome (PSMA3)-interacting proteins reveals a functional link between the proteasome and mRNA metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 416:258–265, 2011.
204. Tsimokha AS, Kulichkova VA, Karpova EV, Zaykova JJ, Aksenov ND, Vasilishina AA, Kropotov AV, Antonov A, Barlev NA. DNA damage modulates interactions between microRNAs and the 26S proteasome. *Oncotarget*, 5:3555–3567, 2014.
205. Bhattacharyya S, Yu H, Mim C, Matouschek A. Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15:122–133, 2014.
206. Forster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Molecular cell biology*. 2005; 18:589–599.
207. Schwachheimer C. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochimica et biophysica acta*. 2004; 1695:45–54.
208. Barthelme D, Sauer RT. Identification of the Cdc48\*20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science*. 2012; 337:843–846.
209. Schwachheimer C. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochimica et biophysica acta*, 1695:45–54, 2004.
210. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. *Molecular cell*, 41:8–19, 2011.
211. Ramadan K. p97/VCP- and Lys48-linked polyubiquitination form a new signaling pathway in DNA damage response. *Cell cycle*, 11:1062–1069, 2012.
212. Forouzan D, Ammelburg M, Hobel CF, Stroth LJ, Sessler N, Martin J, Lupas AN. The archaeal proteasome is regulated by a network of AAA ATPases. *The Journal of biological chemistry*, 287:39254–39262, 2012.
213. Savulescu AF, Glickman MH. Proteasome activator 200: the heat is on... *Molecular & Cellular Proteomics*, 10. R110.006890, 2011.
214. Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka K, Murata S. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular cell*, 24:977–984, 2006.
215. Le Tallec B, Barrault MB, Courbeyrette R, Guerois R, Marsolier-Kergoat MC, Peyroche A. 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Molecular cell*, 27:660–674, 2007.
216. Chen Q, Thorpe J, Dohmen JR, Li F, Keller JN. Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: central role for the proteasome?. *Free radical biology & medicine*, 40:120–126, 2006.
217. Tomko RJ Jr, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry*, 82:415–445, 2013.
218. Lehmann A, Niewianda A, Jechow K, Janek K, Enekel C. Ecm29 fulfils quality control functions in proteasome assembly. *Molecular cell*, 38:879–888, 2010.
219. Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*, 5:191-199, 2004.
220. Mao X, Stewart AK, Hurren R, Datti A, Zhu X, Zhu Y, Shi C, Lee K, Tiedemann R, Eberhard Y, Trudel S, Liang S, Corey SJ, Gillis LC, Barber DL, Wrana JL, Ezzaf S, Schimmer AD. A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate c-maf expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin. *Blood*, 110:4047-4054, 2007.
221. Santra MK, Wajapeyee N, Green MR. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature*, 459:722-725, 2009.
222. Guo C, Degnin CR, Laederich MB, Lunstrum GP, Holden P, Bihlmaier J, Krakow D, Cho YJ, Horton WA. Sprouty 2 disturbs FGFR3 degradation in thanatophoric dysplasia type II: a severe form of human achondroplasia. *Cell Signal*, 20:1471-1477, 2008.
223. Xu GW, Ali M, Wood TE, Wong D, Maclean N, Wang X, Gronda M, Skrtic M, Li X, Hurren R, Mao X,

- Venkatesan M, Beheshti Zavareh R, Ketela T, Reed JC, Rose D, Moffat J, Batey RA, Dhe-Paganon S, Schimmer AD. The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 115:2251-2259, 2010.
224. Block K, Boyer TG, Yew PR. Phosphorylation of the human ubiquitin-conjugating enzyme, CDC34, by casein kinase 2. *J Biol Chem*, 276:41049-41058, 2001.
225. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, ShrinShringarpure R, Mitsiades C, Munshi N, Yew PR, Anderson KC. Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341. *Oncogene*, 23:3597-3602, 2004.
226. Iijima M, Momose I, Ikeda D. TP-110, a new proteasome inhibitor, down-regulates IAPs in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res*, 29:977-985, 2009.
227. Desplanques G, Giuliani N, Delsignore R, Rizzoli V, Bataille R, Barille-Nion S. Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica*, 94:87-93, 2009.
228. Chen Q, Xie W, Kuhn DJ, Voorhees PM, Lopez-Girona A, Mendy D, Corral LG, Krenitsky VP, Xu W, Moutouh-de Parseval L, Webb DR, Mercurio F, Nakayama KI, Nakayama K, Orłowski RZ. Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy. *Blood*, 111:4690-4699, 2008.
229. Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, Maecker H, O'Rourke K, Bazan F, Eastham-Anderson J, Yue P, Dornan D, Huang DC, Dixit VM. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463:103-107, 2010.
230. Harhaj EW, Dixit VM. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21:22-39, 2010.
231. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, Ross FM, Johnson DC, Gonzalez D, Chiecchio L, Dachs Cabanas E, Dagrada GP, Nightingale M, Protheroe RK, Stockley D, Else M, Dickens NJ, Cross NC, Davies FE, Morgan GJ. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood*, 110:3291-3300, 2007.
232. Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley W, Wright A, Zhang M, You J, Sun SC. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest*, 118:1858-1866, 2008.
233. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S, and Ichihara A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:7071-7075, 1990.
234. Izumikawa M, Hashimoto J, Hirokawa T, Sugimoto S, Kato T, Takagi M, Shin-Ya K. JBIR-22, an inhibitor for protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3. *Journal of natural products*, 73:628-631, 2010.
235. Butler LR, Densham RM, Jia J, Garvin AJ, Stone HR, Shah V, Weekes D, Festy F, Beesley J, Morris JR. The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *The EMBO journal*, 31:3918-3934, 2012.
236. Tirat A, Schilb A, Riou V, Leder L, Gerhartz B, Zimmermann J, Worpenberg S, Eidhoff U, Freuler F, Stettler T, Mayr L, Ottl J, Leuenberger B, Filipuzzi I. Synthesis and characterization of fluorescent ubiquitin derivatives as highly sensitive substrates for the deubiquitinating enzymes UCH-L3 and USP-2. *Analytical biochemistry*, 343:244-255, 2005.
237. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkens CR, Scheffer GL, Debipersad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden JW, Ylstra B, Peters GJ, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112:2489-2499, 2008.
238. D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknäs M, Lindsten K, De Cesare M, Perego P, Sadeghi B, Hassan M, Larsson R, Linder S. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nature Medicine*, 17:1636-1640, 2011.
239. Tian Z, D'Arcy P, Wang X, Ray A, Tai YT, Hu Y, Carrasco RD, Richardson P, Linder S, Chauhan D, Anderson KC. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood*, 123:706-716, 2014.
240. Liu N, Liu C, Li X, Liao S, Song W, Yang C, Zhao C, Huang H, Guan L, Zhang P, Liu S, Hua X, Chen X, et al. A novel proteasome inhibitor suppresses tumor growth via targeting both 19S proteasome deubiquitinases and 20S proteolytic peptidases. *Scientific Reports*, 4:5240, 2014.
241. Anchoori RK, Karanam B, Peng S, Wang JW, Jiang R, Tanno T, Orłowski RZ, Matsui W, Zhao M, Rudek MA, Hung CF, Chen X, Walters KJ, Roden RB. A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPNI3/ADRM1 as a therapy for cancer. *Cancer Cell*, 24:791-805, 2013.
242. Chou TF, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, Chase P, Porubsky PR, Stoltz BM, Schoenen FJ, Patricelli MP, Hodder P, Rosen H, Deshaies RJ.



- Reversible inhibitor of p97, DBEQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:4834–4839, 2011.
243. Chou TF, Li K, Frankowski KJ, Schoenen FJ, Deshaies RJ. Structure-activity relationship study reveals ML240 and ML241 as potent and selective inhibitors of p97 ATPase. *ChemMedChem*, 8:297–312, 2013.
244. Dou QP, Li B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat.*, 2(4):215–223, 1999.
245. Moreau P., Richardson P.G., Cavo M., Orlovski R.Z., San Miguel J.F., Palumbo A., Harousseau J-L. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, 120:947–959, 2012.
246. Kale A.J., Moore B.S. Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55:10317–10327, 2012.
247. Dou Q.P., Zonder J.A. Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: Perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr. Cancer Drug Targets*, 14(6):517–536.
248. Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P., Boise, L.H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107:4907–4916, 2006.
249. Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.*, 67:1783–1792, 2007.
250. Vincenz, L., Jäger, R., O'Dwyer, M., Samali, A. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: Targeting the achilles heel of multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.*, 12:831–843, 2013.
251. Fuchs, O. Targeting of nf-kappab signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 13:16–34, 2013.
252. Nencioni A., Grunebach F., Patrone F., Ballesterio A., Brossart P. proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*, 21:30–36, 2007.
253. Orlovski R. Z., Kuhl D. J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res.*, 14:1649–1657, 2008.
254. Rajkumar S.V., Richardson P.G., Hideshima T., Anderson K.C. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(3):630–639, 2005.
255. Teicher B.A., Tomaszewski J.E. Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 96:1–9, 2015.
256. Teicher B.A., Ara G., Herbst R., Palombella V.J., Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 5:2638–2645, 1999.
257. Sunwoo J.B., Chen Z., Dong G., Yeh N., Bancroft C.C., Sausville E., Adams J., Elliott P., Van Waes C. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kB, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7:1419–1428, 2001.
258. Varga C., Laubach J., Hideshima T., Chauhan D., Anderson K.C., Richardson P.G. Novel targeted agents in the treatment of multiple myeloma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 28:903–925, 2014.
259. Mitsiades N., Mitsiades C.S., Poulaki V., Chauhan D., Fanourakis G., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Treon S.P., Munshi N.C., Richardson P.G., Hideshima T., Anderson K.C. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:14374–14379, 2002.
260. Gupta S. (inventor), US Health (applicant). Formulation of boronic acid compounds, United States Patent USWO2002059130 (1 August 2002).
261. Lightcap E.S., McCormack T.A., Pien C.S., Chau V., Adams J., Elliott P.J. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin. Chem.* 46:673–683, 2000.
262. Orlovski R.Z., Stinchcombe T.E., Mitchell B.S., Shea T.C., Baldwin A.S., Stahl S., et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 20:4420–4427, 2002.
263. Aghajanian C., Soignet S., Dizon D.S., Pien C.S., Adams J., Elliott P.J., Sabbatini P., Miller V., Hensley M.L., Pezzulli S., Canales C., Daud A., Spriggs D.R. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS-341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8:2505–2511, 2002.
264. Blade J., Samson D., Reece D., Apperley J., Bjorkstrand B., Gahrton G., Gertz M., Giralt S., Jagannath S., Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant, *Br J Haematol.* 102(5):1115–23, 1998.
265. Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N. Engl. J. Med.* 348:2609–2617, 2003.

266. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky R, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Adams J, Kauffman M, Esseltine DL, Schenkein DP, Anderson KC. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br. J. Haematol.*, 127(2):165–172, 2004.
267. Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR, Siegel DS, Irwin D, Richardson PG, Niesvizky E, Alexanian R, Limentani SA, Alsina M, Esseltine DL, Anderson KC. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 143(4):537–540, 2008.
268. Richardson PG, Sonneveld MS, Irwin D, et al. Bortezomib demonstrates superior efficacy to high-dose dexamethasone in relapsed multiple myeloma: final report of the APEX Study. San Deigo (CA): American Society of Hematology; 2004. Abstract.
269. Kane R.C., Farrell A.T., Sridhara R., Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy, *Clin. Cancer Res.* 12:2955–2960, 2006.]
270. San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva N.K., Dimopoulos M.A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M.T., Palumbo A., Samoilova O.S., et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.*, 359: 906–917, 2008.
271. Hrusovsky I., Emmerich B., von Rohr A., Voegeli J., Taverna C., Olie R.A., Pliskat H., Frohn C., Hess G. Bortezomib retreatment in relapsed multiple myeloma—results from a retrospective multicentre survey in germany and Switzerland, *Oncology*, 79:247–254, 2010.
272. Mateos MV, Oriol A, Martinez-Lopez J, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol.*, 11(10):934–941, 2010.
273. Mateos MV, Oriol A, Teruel AI, et al. Maintenance therapy with bortezomib plus thalidomide (VT) or bortezomib plus prednisone (VP) in elderly myeloma patients included in the GEM2005MAS65 Spanish randomized trial [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2011;118(21):222. Abstract 477.
274. Bringhen S, Larocca A, Rossi D, et al. Efficacy and safety of once-weekly bortezomib in multiple myeloma patients. *Blood*, 116(23):4745–4753, 2010.
275. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomibthalidomide compared with bortezomibmelphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.*, 28(34):5101-5109, 2010.
276. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stemcell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III, *J Clin Oncol*, 28(30):4621-4629, 2010.
277. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation In newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study, *Lancet*, 376(9758):2075-2085, 2010.
278. Moreau P, Avet-Loiseau H, Facon T, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduceddose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 118(22):5752-5758, 2011.
279. Rosin~ ol L, Cibeira MT, Mateos MV, et al. Results of pre- and post-autologous stem cell transplantation (ASCT) with three induction regimens in multiple myeloma (MM): superiority of VTD (bortezomib/thalidomide/dexamethasone) over TD and VBMCP/VBAD plus bortezomib (VBMCP/ VBAD/V) [abstract]. *Haematologica*. 2011;96(s1):S69. Abstract P-138.
280. Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation, *Blood*, 117(23):6063-6073, 2011.
281. Orłowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression, *J Clin Oncol.*, 25(25):3892-3901, 2007.
282. Garderet L, Iacobelli S, Moreau P, et al. Bortezomib (VELCADE)-thalidomidedexamethasone (VTD) is superior to thalidomidedexamethasone (TD) in patients with multiple myeloma (MM) progressing or relapsing after autologous transplantation [abstract]. *Haematologica*. 2011;96(s2):420-421. Abstract 1008.
283. Dimopoulos MA, Jagannath S, Yoon S-S, et al. Vantage 088. Vorinostat in combination with bortezomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: results of a global, randomized phase 3 trial [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2011;118(21):368-369. Abstract 811.

284. Merin N.M., Kelly K.R. Clinical use of proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma, *Pharmaceuticals*, 8:1-20, 2015.
285. Leonard JP, Furman RR, Coleman M. Proteasome inhibition with bortezomib: a new therapeutic strategy for non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer*, 119(5):971-979, 2006.
286. Mato AR, Feldman T, Goy A. Proteasome inhibition and combination therapy for non-Hodgkin's lymphoma: from bench to bedside. *Oncologist*, 17(5):694-707, 2012.
287. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol*, 20(22):4420-4427, 2002.
288. O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, MacGregor-Cortelli B, Stubblefield M, Straus D, Portlock C, Hamlin P, Choi E, Dumetrescu O, Esseltine D, Trehu E, Adams J, Schenkein D, Zelentz AD. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol*, 23(4):676-684, 2005.
289. Fisher RIRI, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S, Stadtmauer EA, O'Connor OA, Shi H, Boral AL, Goy A. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol*, 24(30):4867-4874, 2006.
290. Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S, Nasta S, O'Connor OA, Shi H, Boral AL, Fisher RI. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Annals of Oncology*, 20(3):520-525, 2009.
291. Musto PM, Guariglia R, Pietrantonio G, Vilani O, Martorelli MC, D'Auria F, Zonno A, Zupa A, Bianchino G, Improta G, Grieco V, Digiovannantonio L, Feudale E, Lerosse R, Pinto A, Ferrara F. A pilot study with rituximab, bortezomib and hyper-fractionated cyclophosphamide (rbc regimen) for the treatment of advanced mantle cell lymphoma in elderly patients. *Haematologica*. 2008; 93(suppl 1) abstr 0273.
292. Friedberg JW, Vose JM, Kelly JL, Young F, Bernstein SH, Peterson D, Rich L, Blumel S, Proia NK, Liesveld J, Fisher RI, Armitage JO, Grant S, Leonard JP. The combination of bendamustine, bortezomib, and rituximab for patients with relapsed/refractory indolent and mantle cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 117(10):2807-2812, 2011.
293. Romaguera JE, Fayad LE, McLaughlin P, Pro B, Rodriguez A, Wang M, Weaver P, Hartig K, Kwak LW, Feldman T, Smith J, Ford P, Goldberg S, Pecora A, Goy A. Phase I trial of bortezomib in combination with rituximab-HyperCVAD alternating with rituximab, methotrexate and cytarabine for untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol*, 151(1):47-53, 2010.
294. Kahl B, Chang J, Eickhoff J, Gilbert L, Rogers E, Wernli J, Huie M, McFarland T, Volk M, Blank JH, Callander N, Longo W, Peterson C. VeR-CVAD Produces a High Complete Response Rate in Untreated Mantle Cell Lymphoma: A Phase II Study from the Wisconsin Oncology Network. *Blood*, 112 abstr 265, 2008.
295. Dimopoulos MA, Garcia-Sanz R, Gavriatopoulou M, Morel P, Kyrtsonis MC, Michalis E, Kartasis Z, Leleu X, Palladini G, Tedeschi A, Gika D, Merlini G, Kastritis E, Sonneveld P. Primary therapy of Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) with weekly bortezomib, low-dose dexamethasone and rituximab (BDR); long term results of a phase II study of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*, 122(19):3276-82, 2013.
296. Sarlo C, Buccisano F, Manrillo L, Cefalo M, Di Caprio L, Cicconi L, Ditto C, Ottaviani L, Di Veroli A, Del Principe MI, Grasso MA, Nasso D, De Santis G, Amadori S, Venditti A. Phase II study of bortezomib as a single agent in patients with previously untreated or relapsed/refractory acute myeloid leukemia ineligible for intensive therapy. *Leuk. Res. Treatment*. 2013:705-714, 2013.
297. Attar BC, Johnson JL, Amrein PC, Lozanski G, Wadleigh M, DeAngelo DJ, Kolitz JE, Powell BL, Voorhees P, Wang ES, Blum W, Stone RM, Marcucci G, Bloomfield CD, Moser B, Larson RA. Bortezomib added to daunorubicin and cytarabine during induction therapy and to intermediate-dose cytarabine for consolidation in patients with previously untreated acute myeloid leukemia age 60 to 75 years: CALGB (Alliance) study 10502. *J. Clin. Oncol*, 31(7):923-929, 2013.
298. Howard DS, Liesveld J, Phillips GL 2nd, Hayslip J, Weiss H, Jordan CT, Guzman ML. A phase I study using bortezomib with weekly idarubicin for treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 37(11):1502-8, 2013.
299. Ying M, Zhou X, Zhong L, Lin N, Jing H, Luo P, Yang X, Song H, Yang B, He Q. Bortezomib sensitizes human acute myeloid leukemia cells to all-trans-retinoic acid-induced differentiation by modifying the RAR $\alpha$ /STAT1 axis. *Mol. Cancer Ther*, 12(2):195-206, 2013.

300. Engel RH, Brown JA, Von Roenn JH, O'Regan RM, Bergan R, Badve S, Rademaker A, Gradishar WJ. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest.*, 25:733–737, 2007.
301. Yang CH, Gonzalez-Angulo AM, Reuben JM, Booser DJ, Puztai L, Krishnamurthy S, Esseltine D, Stec J, Broglio KR, Islam R, Hortobagyi GN, Cristofanilli M. Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Ann. Oncol.*, 77:813–817, 2006.
302. Irvin WJ, Orłowski RZ, Chiu WK, Carey LA, Collichio FA, Bernard PS, Stijleman IJ, Perou C, Ivanova A, Dees EC. Phase II study of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 10(6):465–470, 2011.
303. Hainsworth JD, Meluch AA, Spigel DR, Barton J Jr, Simons L, Meng C, Gould B, Greco FA. 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. Genitourinary Cancer*, 5(4):278–283, 2007.
304. Li TH, Ho L, Piperdi B, Elrafei T, Camacho FJ, Rigas JR, Perez-Soler R, Gucalp R. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade) in chemotherapy-naïve patients with advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 68(1):89–93, 2010.
305. Shah MA, Power DG, Kindler HL, Holen KD, Kemeny MM, Ilson DH, Tang L, Capanu M, Wright JJ, Kelsen DP. A multicenter, phase II study of Bortezomib (PS-341) in patients with unresectable or metastatic gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Investigational New Drugs*. 29(6):1475–1481, 2010.
306. Shah MH, Young D, Kindler HL, Webb I, Kleiber B, Wright J, Grever M. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res*, 10:6111–6118, 2004.
307. Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P, Mazumdar M, Motzer RJ. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol*, 22:3720–3725, 2004.
308. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, Herr I, Wirth T, Debatin KM. Inhibition of nuclear factor κB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood*, 91:4624–31, 1998.
309. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, et al. In vivo stimulation of IκB phosphorylation is not sufficient to activate NF-κB. *Mol Cell Biol*, 15:1294–301, 1995.
310. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-κB system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 3:17–26, 2004.
311. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277:16639-16647, 2002.
312. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-κB. *Blood*, 87:1104–12, 1996.
313. Feinman R, Koury J, Thames M, Barlogie B, Epstein J. Role of NF-κB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoids-induced apoptosis by Bcl-2. *Blood*, 93:3044–52, 1999.
314. Chauhan D, Anderson KC. Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): therapeutic implications. *Apoptosis*, 8:337–43, 2003.
315. Ma MH, Yang HH, Parker K, et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*, 9:1136–44, 2003.
316. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*, 277:16639-16647, 2002.
317. Gardner RC, Assinder SJ, Christie G, et al. Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochem J*, 346:447-454, 2000.
318. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: Therapeutic applications. *Oncogene*, 20:4519-4527, 2001.
319. Reddy N., Czuczman M.S. Enhancing activity and overcoming chemoresistance in hematologic malignancies with bortezomib:preclinical mechanistic studies. *Annals of Oncology*, 21:1756-1764, 2010.
320. Ma MH, Yang HH, Parker K et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*, 9: 1136–1144, 2003.
321. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 61: 3071–3076, 2001.
322. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple

- myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res*, 66: 184–191, 2006.
323. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114:1046–1052, 2009.
324. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:14374–9, 2002.
325. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, et al. Blockade of Hsp27 overcomes bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*, 63:6174–7, 2003.
326. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:14374–14379, 2002.
327. Chauhan D, Anderson KC. Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): therapeutic implications. *Apoptosis*, 8:337–43, 2003.
328. Chauhan D, Guilan L, Sattler M, et al. Superoxide-dependent and independent mitochondrial signaling during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Oncogene*, In Press 2003.
329. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 24:9695–704, 2004.
330. Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*, 278:33714–23, 2003.
331. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, 101:2377–80, 2003.
332. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 2:927–37, 2002.
333. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101:1530–4, 2003.
334. Gomez-Bougie P, Wuilleme-Toumi S, Menoret E et al. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res*, 67: 5418–5424, 2007.
335. Gu H, Chen X, Gao G et al. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Mol Cancer Ther*, 7: 2298–2307, 2008.
336. Yanamandra N, Colaco NM, Parquet NA et al. Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 12:591–599, 2006.
337. Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- $\kappa$ B inhibition. *Cancer Res*, 61:3535–40, 2001.
338. Yin D, Zhou H, Kumagai T, et al. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene*, 24:344–54, 2005.
339. An WG, Hwang SG, Trepel JB, Blagosklonny MV. Protease inhibitor induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21 WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*, 14:1276–83, 2000.
340. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101:1530–4, 2003.
341. Boccadoro M., Morgan G., Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell International*, 5:18, 2005.
342. Podar K., Shringarpure R., Tai YT., Simoncini M., Sattler M., Ishitsuka K., Richardson PG., Hideshima T., Chauhan D., Anderson KC. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res*, 64:7500-7506, 2004.
343. Pitcher D.S., Kate de Mattos-Shipley, Tzortzis K., Auner H.W., Karadimitris A., Kleijnen M.F. Bortezomib amplifies effect on intracellular proteasomes by changing proteasome structure. *EBioMedicine*, 2:642-648, 2015.
344. Strauss SJ, Higginbottom K, Juliger S et al. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res*, 67:2783–2790, 2007.
345. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC et al. Inhibition of constitutive NF-kappaB activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*, 171: 88–95, 2003.

346. Kabore AF, Sun J, Hu X et al. The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis*, 11: 1175–1193, 2006.
347. Orłowski RZ. Novel agents for multiple myeloma to overcome resistance in phase III clinical trials. *Semin Oncol*, 40(5):634–51, 2013.
348. Cortes J, Thomas D, Koller C, et al. Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin Cancer Res*. 10(10):3371–3376, 2004.
349. Dispenzieri A, Jacobus S, Vesole DH, Callandar N, Fonseca R, Greipp PR. Primary therapy with single agent bortezomib as induction, maintenance and re-induction in patients with high-risk myeloma: results of the ECOG E2A02 trial. *Leukemia*, 24(8):1406–1411, 2010.
350. Lü, S., Yang, J., Song, X., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., Song, N., Bao, X., Chen, P.; Wang, J. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326:423–431, 2008.
351. Ruud, O.; Niels, E.F.; Yehuda, G.A.; Jacqueline, C.; Ina van, Z.; Celia, R.B.; George, L.S.; Kabir, D.; Katharina, V.; Clara, L.; et al. Molecular basis of bortezomib resistance: Proteasome subunit beta5 (psmb5) gene mutation and overexpression of psmb5 protein. *Blood*, 112:2489–2499, 2008.
352. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debipersad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden JW, Ylstra B, Peters GJ, Kaspers GL, Dijkmans BAC, Scheper RJ, Jansen G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit  $\beta 5$  (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112:2489–2499, 2008.
353. Lu SQ, Yang JM, Song XM, Gong SL, Zhou H, Guo LP, Song NX, Bao XC, Chen PP, Wang JM. Point mutation of the proteasome  $\beta 5$  subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J Pharmacol Exp Ther.*, 326:423–431, 2008.
354. Lu SQ, Yang JM, Chen ZL, Gong SL, Zhou H, Xu XQ, Wang JM. Different mutants of PSMB5 confer varying bortezomib resistance in T lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from the Jurkat cell line. *Exp Hematol*, 37:831–837, 2009.
355. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112(6):2489–2499, 2008.
356. Dolloff N.G. Emerging therapeutic strategies for overcoming proteasome inhibitor resistance. *Advances in Cancer Research*, 127:191–226, 2015.
357. Lichter, D. I., Danaee, H., Pickard, M. D., Tayber, O., Sintchak, M., Shi, H., et al. Sequence analysis of  $\beta$ -subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. *Blood*, 120:4513–4516, 2012.
358. Politou, M., Karadimitris, A., Terpos, E., Kotsianidis, I., Apperley, J. F., & Rahemtulla, A. No evidence of mutations of the PSMB5 (beta-5 subunit of proteasome) in a case of myeloma with clinical resistance to Bortezomib. *Leukemia Research*, 30:240–24, 2006.
359. Ri, M., Iida, S., Nakashima, T., Miyazaki, H., Mori, F., Ito, A., et al. Bortezomib-resistant myeloma cell lines: A role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress. *Leukemia*, 24:1506–1512, 2010.
360. Balsas, P., Gala'n-Malo, P., Marzo, I., & Naval, J. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM $\beta$ 5 overexpression and polyploidy. *Leukemia Research*, 36:212–218, 2012.
361. Ruckrich, T., Kraus, M., Gogel, J., Beck, A., Ova, H., Verdoes, M., et al. Characterization of the ubiquitin-proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia*, 23:1098–1105, 2009.
362. Lu, S., Chen, Z., Yang, J., Chen, L., Gong, S., Zhou, H., et al. Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line. *Experimental Hematology*, 36:1278–1284, 2008.
363. Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, van Meerloo J, Vojtekova K, van Zantwijk CH, Zweegman S, Chan ET, Kirk CJ, Geerke DP, Schimmer AD, Kaspers GJL, Jansen G, Cloos J. Impaired bortezomib binding to mutant  $\beta 5$  subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia*, 26:757–768, 2011.
364. de Wilt LHAM, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Cloos J, Schimmer AD, Chan ET, Kirk CJ, Peters GJ, Kruyt FAE. Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol.*, 83:207–217, 2012.
365. Shringarpure R, Catley L, Bhole D, Burger R, Podar K, Tai YT, Kessler B, Galardy P, Ploegh H, Tassone P, Hideshima T, Mitsiades C, Munshi NC, Chauhan D, Anderson KC: Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br J Haematol*, 134:145–156, 2006.
366. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, Anderson KC: Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-

- 341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*, 63:6174–6177, 2003.
367. McConkey DJ, Zhu K: Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*, 11:164–179, 2008.
368. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ et al. Antimyeloma activity of heat-shock protein-90 inhibition. *Blood*, 107: 1092–1100, 2006.
369. Zhou L, Hou J, Fu W, Wang D, Yuan Z, Jiang H. Arsenic trioxide and 2-methoxyestradiol reduce beta-catenin accumulation after proteasome inhibition and enhance the sensitivity of myeloma cells to Bortezomib. *Leuk Res*, 32:1674–1683, 2008.
370. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*, 23:630–639, 2005.
371. Siegel DS. Relapsed/Refractory multiple myeloma: defining refractory disease and identifying strategies to overcome resistance. *Semin Hematol*, 49(Suppl 1):S3–S15, 2012.
372. Chng WJ, Gualberto A, Fonseca R: IGF-1R is overexpressed in poor prognostic subtypes of multiple myeloma. *Leukemia*, 20:174–176, 2006.
373. Tucci A, Bonadonna S, Cattaneo C, Ungari M, Giustina A, Guiseppe R: Transformation of a MGUS to overt multiple myeloma: the possible role of a pituitary macroadenoma secreting high levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *Leuk Lymphoma*, 44:543–545, 2003.
374. Bataille R, Robillard N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P: CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity. *Haematologica*, 90:706–707, 2005.
375. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, Davis RE, Lin P, Wang H, Madden TL, Wei C, Baladandayuthapani V, Wang M, Thomas SK, Shah JJ, Weber DM, Orlowski RZ. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in pre-clinical models of multiple myeloma. *Blood*, 120:3260–3270, 2012.
376. Que W, Chen J, Chuang M, Jiang D. Knockdown of c-Met enhances sensitivity to bortezomib in human multiple myeloma U266 cells via inhibiting Akt/mTOR activity. *APMIS*, 120:195–203, 2012.
377. Kim A, Park S, Lee JE, Jang WS, Lee SJ, Kang HJ, Lee SS. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leuk Res*, 36:912–920, 2012.
378. Yeom SY, Lee SJ, Kim WS, Park C. Rad knockdown induces mitochondrial apoptosis in bortezomib resistant leukemia and lymphoma cells. *Leuk Res*, 36:1172–1178, 2012.
379. Gu JL, Li J, Zhou ZH, Liu JR, Huang BH, Zheng D, Su C: Differentiation induction enhances bortezomib efficacy and overcomes drug resistance in multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun*, 420:644–650, 2012.
380. Verbrugge SE, Assaraf YG, Dijkmans BA, Scheffer GL, Al M, den Uyl D, Oerlemans R, Chan ET, Kirk CJ, Peters GJ, van der Heijden JW, de Grijl TD, Scheper RJ, Jansen G: Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno)proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*, 341:174–182, 2012.
381. Minderman H, Zhou Y, O’Loughlin KL, Baer MR: Bortezomib activity and in vitro interactions with anthracyclines and cytarabine in acute myeloid leukemia cells are independent of multidrug resistance mechanisms and p53 status. *Cancer Chemother Pharmacol*, 60:245–255, 2007.
382. Rumpold H, Salvador C, Wolf AM, Tilg H, Gastl G, Wolf D: Knockdown of Pgp resensitizes leukemic cells to proteasome inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 361:549–554, 2007.
383. Derenne S, Monia B, Dean N. M., Taylor J. K., Rapp M. J., Harousseau J. L., et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, 100:194–199, 2002.
384. Wulleme-Toumi S, Robillard N, Gomez P., Moreau P., Le Guill S, Avet-Loiseau H, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*, 19, 1248–1252, 2005.
385. Balsas P., Lopez-Royuela N., Galán-Malo P., Anel A., Marzo I., & Naval J. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 77:804–812, 2009.
386. Nencioni A., Hua F., Dillon C. P., Yokoo R., Scheiermann C., Cardone M. H., et al. Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood*, 105, 3255–3262, 2005.
387. Chen S, Zhang Y., Zhou L., Leng Y., Lin H., Kmiecik M., et al. A Bim targeting strategy overcomes adaptive bortezomib resistance in myeloma through a novel link between autophagy and apoptosis. *Blood*, 124:2687–2697, 2014.

388. Vogl, D. T., Stadtmauer, E. A., Tan, K. S., Heitjan, D. F., Davis, L. E., Pontiggia, L., et al. Combined autophagy and proteasome inhibition: A phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. *Autophagy*, 10:1380–1390, 2014.
389. Santo L, Hideshima T, Kung AL, et al. Preclinical activity, pharma-codynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiplemyeloma. *Blood* 2012;119(11):2579–89.
390. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Transcriptionalsignature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma:biological and clinical implications. *Proc Nat Acad Sci USA*, 101(2):540–5, 2004.
391. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, et al. PANORAMA 2:panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone inpatients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*, 122(14):2331–7, 2013.
392. Weber DM, Graef T, Hussein M, et al. Phase I trial of vorino-stat combined with bortezomib for the treatment of relapsingand/or refractory multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 12(5):319–24, 2012.
393. San-Miguel JF, Richardson PG, Gunther A, et al. Phase Ib study ofpanobinostat and bortezomib in relapsed or relapsed and refractorymultiple myeloma. *J Clin Oncol* 31(29):3696–703, 2013.
394. Bianchi G, Oliva L, Cascio P, et al. The proteasome load versus capac-ity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cellsto proteasome inhibition. *Blood* 113(13):3040–9, 2009.
395. Stessman HA, Mansoor A, Zhan F, Linden MA, Van Ness B, BaughnLB. Bortezomib resistance can be reversed by induced expression ofplasma cell maturation markers in a mouse in vitro model of multiplemyeloma. *PLoS One*, 8(10):e77608, 2013.
396. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, et al. Xbp1s-negativetumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic pro-teasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 24(3):289–304, 2013.
397. Gu JL, Li J, Zhou ZH, et al. Differentiation induction enhances borte-zomib efficacy and overcomes drug resistance in multiple myeloma.*Biochem Biophys Res Commun*, 420(3):644–50, 2012.
398. Ling SC, Lau EK, Al-Shabeeb A, et al. Response of myeloma tothe proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfoldedprotein response regulator XBP-1. *Haematologica*, 97(1):64–72, 2012.
399. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genomesequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471(7339):467–72, 2011.
400. Siegel, D. S., Martin, T., Wang, M., Vij, R., Jakubowiak, A. J., Lonial, S., et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 120:2817–2825, 2012.
401. Wang M., Martin T., Bensinger W., Alsina M., Siegel D.S., Kavalarchik E., Huang M., Orłowski R.Z., Niesvizky R. Phase 2 dose-expansion study (px-171-006) of carfilzomib, lenalidomide, and low-dose dexamethasone in relapsed or progressive multiple myeloma. *Blood*, 122:3122–3128, 2013.
402. Jakubowiak A.J., Dytfeld D., Griffith K.A., Lebovic D., Vesole D.H., Jagannath S., Al-Zoubi A., Anderson T., Nordgren B., Detweiler-Short, K. et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood*, 120:1801–1809, 2012.
403. Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, Neslund-Dudas C, Mitra B, Dou QP. From Bortezomib to other Inhibitors of the proteasome and beyond. *Curr. Pharm. Des.*, 19(22):4025–4038, 2013.
404. Potts BC, Albitar MX, Anderson KC, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, Chandra J, Chauhan D, Cusack JC Jr, Fenical W, Ghobrial IM, Groll M, Jensen PR, Lam KS, Lloyd GK, McBride W, McConkey DJ, Miller CP, Neuteboom ST, Oki Y, OvaaH, Pajonk F, Richardson PG, Roccaro AM, Sloss CM, Spear MA, Valashi E, Younes A, Palladino MA. A proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Curr. Cancer Drug T targets.*, 11(3):254–284, 2011.
405. Richardson PG, Spencer A, Cannell P, Hamison SJ, Catley L, Underhill C, Zimmerman TM, Hofmeister CC, Jakubowiak AJ, Laubach JP, Palladino MA, Longenecker AM, Lay A, Wear S, Lloyd GK, Hannah AL, Reich S, Spear MA, Anderson KC. Phase 1 clinical evaluation of twice- weekly marizomib (NPI-0052), a novel proteasome inhibitor, in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (MM). *Ash.*, 118(21):140–141, 2011.
406. Chauhan D., Tian Z., Zhou B, Kuhn D., Orłowski R., Raje N., et al. In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clin. Cancer Res.*, 17:5311–5321, 2011.
407. Richardson PG, Baz R, Wang L, Jakubowiak AJ, Berg D, Liu G, Gupta N, Di Bacco A, Hui AM, Lonial S. Investigational agent MLN9708, an oral proteasome inhibitor, in patients (Pts) with relapsed and/or refractory multiple myeloma (MM): Results from the expansion



- cohorts of a phase 1 dose-escalation study. *Blood*, 118(21):140, 2011.
408. Richardson PG, Berdeja JG, Niesvizky R, Lonial S, Roy V, Hari P, Berg D, Liu G, Gupta N, Di Bacco A, Hui AM, Kumar S. Oral weekly MLN9708, an investigational proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients (pts) with previously untreated multiple myeloma (MM): A phase I/II study. *J Clin. Oncol.*, 30(suppl) abstr 8033, 2012.
409. US National Institute of Health. [cited 2012 July 31] *ClinicalTrials.gov*. 2012. Available from: <http://clinicaltrials.gov/>.
410. Kuhn DJ, Orłowski RZ, Björklund CC. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSI). *Curr. Cancer Drug Targets*, 11(3):285–295, 2011.
411. Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, Voorhees PM, Orłowski M, Orłowski RZ. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood*, 113:4667–4676, 2009.
412. Muchamuel T, Baster M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ, Groettrup M. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.*, 15:781–787, 2009.
413. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630):299–303, 1997.
414. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303:844–888, 2004.
415. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011:1-7, 2011.
416. Goldenberg SJ, Marblestone JG, Mattern MR, Nicholson B. Strategies for the identification of ubiquitin ligase inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 38(Pt 1):132–136, 2010.
417. Verma R, Peters NR, D’Onofrio M, Tochtrop GP, Sakamoto KM, Varadan R, Zhang M, Coffino P, Fushman D, Deshaies RJ, King RW. Ubiquitin-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science*, 306:117–120, 2004.
418. Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:8–17, 2004.
419. Salem, K., McCormick, M. L., Wendlandt, E., Zhan, F., & Goel, A. Copper-zinc superoxide dismutase-mediated redox regulation of bortezomib resistance in multiple myeloma. *Redox Biology*, 4C, 23–33, 2015.
420. Petrini, M., Di Simone, D., Favati, A., Mattii, L., Valentini, P., & Grassi, B. GST- $\pi$  and P-170 co-expression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 90, 393–397, 1995.
421. Stella, F., Weich, N., Panero, J., Fantl, D. B., Schutz, N., Fundia, A. F., et al. Glutathione S-transferase P1 mRNA expression in plasma cell disorders and its correlation with polymorphic variants and clinical outcome. *Cancer Epidemiology*, 37:671–674, 2013.
422. Rolland, D., Raharijaona, M., Barbarat, A., Houlgatte, R., & Thieblemont, C. Inhibition of GST- $\pi$  nuclear transfer increases mantle cell lymphoma sensitivity to cisplatin, cytarabine, gemcitabine, bortezomib and doxorubicin. *Anticancer Research*, 30:3951–3957, 2010.
423. Wang, Z. Y., & Chen, Z. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable. *Blood*, 111:2505–2515, 2008.
424. Campbell, R. A., Sanchez, E., Steinberg, J. A., Baritaki, S., Gordon, M., Wang, C., et al. Antimyeloma effects of arsenic trioxide are enhanced by melphalan, bortezomib and ascorbic acid. *British Journal of Haematology*, 138:467–478, 2007.
425. Voorhees, P. M., Chen, Q., Kuhn, D. J., Small, G. W., Hunsucker, S. A., Strader, J. S., et al. Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 13:6469–6478, 2007.
426. Bhattacharya, S., Ray, R. M., & Johnson, L. R. ST AT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *The Biochemical Journal*, 392: 335–344, 2005.
427. Kumar, S. K., Jett, J., Marks, R., Richardson, R., Quevedo, F., Moynihan, T., et al. Phase I study of sorafenib in combination with bortezomib in patients with advanced malignancies. *Investigational New Drugs*, 31:1201–1206, 2013.
428. Srkalovic, G., Hussein, M. A., Hoering, A., Zonder, J. A., Popplewell, L. L., Trivedi, H., et al. A phase II trial of BAY 43-9006 (sorafenib) (NSC-724772) in patients with relapsing and resistant multiple myeloma: SWOG S0434. *Cancer Medicine*, 3:1275–1283, 2014.
429. Lin, P., Owens, R., Tricot, G., & Wilson, C. S. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases

- of multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*, 121:482–488, 2004.
430. van der Veer, M. S., de Weers, M., van Kessel, B., Bakker, J. M., Wittebol, S., Parren, P. W., et al. The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the antimyeloma effect of newly emerging multi-drug therapies. *Blood Cancer Journal*, 1: e41, 2011.
431. Collins, S. M., Bakan, C. E., Swartzel, G. D., Hofmeister, C. C., Efebera, Y. A., Kwon, H., et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CSI ligation: Evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62:1841–1849, 2013.
432. Affer, M., Chesi, M., Chen, W. D., Keats, J. J., Demchenko, Y. N., Tamizhmani, K., et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*, 28:1725–1735, 2014.
433. Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468:1067–1073, 2010.
434. Siegel, M. B., Davare, M. A., Liu, S. Q., Spurgeon, S. E., Loriaux, M. M., Druker, B. J., et al. 4702 the bromodomain inhibitor CPI203 demonstrates preclinical synergistic activity with bortezomib in drug resistant myeloma. In ASH annual meeting, Abstract 4702, 2014.
435. Chesi, M., Matthews, G. M., Garbitt, V. M., Palmer, S. E., Shortt, J., Lefebvre, M., et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*, 120:376–385, 2012.
436. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!. *Blood*, 84:1052-1070, 1993.
437. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Steins H, Sundays ME, Reinherz EL. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10662-10666, 1991.
438. Rozenfurt, E. Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13: 128–134, 2002.
439. Moody, T. W., Chan, D., Fahrenkrug, J., and Jensen, R. T. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr. Pharm. Des.*, 9: 495–509, 2003.
440. Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 110–116, 2003.
441. Antczak, C., De Meester, I., and Bauvois, B. Ectopeptidases in pathophysiology. *Bioessays*, 23: 251–260, 2001.
442. Nanus D.M. Of peptides and peptidases: The role of cell surface peptidases in cancer. *Clin cancer Res*, 9:6307-6309, 2003.
443. Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Papandreou, C. N., Giaccotti, F. G., Knudsen, B., and Nanus, D. M. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J. Clin. Investig.*, 106: 1399–1407, 2000.
444. Levin E.R. Endothelins. *N Engl J Med*, 333:356-63, 1995.
445. Goldie R.G. Endothelins in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26:145-48, 1999.
446. Masaki T. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35:S3-5, 2000.
447. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, et al. Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164:587-93, 1989.
448. Battistini B., Chailier P., D’Orleans-Juste P., Briere N., Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14:385-99, 1993.
449. Yanagisawa, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411–415, 1988.
450. Stow, L. R., Jacobs, M. E., Wingo, C. S., Cain, B. D. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J.* 25:16–28, 2011.
451. Matteucci, E. et al. Epigenetic control of endothelin-1 axis affects invasiveness of breast carcinoma cells with bone tropism. *Exp. Cell Res.* 319:1865–1874, 2013.
452. Li, D. et al. The inhibitory effect of miRNA-1 on ET-1 gene expression. *FEBS Lett.* 586: 1014–1021, 2012.
453. Li, D. et al. MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1. *Life Sci*, 91: 440–447, 2012.
454. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem*, 264:14954-9, 1989.
455. Rubin SA, Levin ER. The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:6-10.

456. Stow, L. R., Jacobs, M. E., Wingo, C. S., Cain, B. D. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J.* 25:16–28, 2011.
457. Bagnato A, Spinella F, Rosano L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol*, 86:473-484, 2008.
458. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, 4:2989-3000, 1990.
459. Simonson MS, Herman WH. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1: cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, 268:9347-57, 1993.
460. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 267:12468-74, 1992.
461. Koh E, Morimoto S, Kim S, Nabata T, Miyashita Y, Ogihara T. Endothelin stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int*, 20:375-80, 1990.
462. Filep JG, Herman F, Battistini B, Chabrier PE, Braquet P, Sirois P. Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17:Suppl 7:S216-S218, 1991.
463. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:9797-800, 1988.
464. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79:1277-85, 1994.
465. Bagnato A, Natali PG. Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treatment and Research*, 119:293-314, 2004.
466. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews*, 13:637-651, 2013.
467. Bloch, K. D. et al. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J. Biol. Chem.* 264:10851–10857, 1989.
468. Nelson, J. B. & Carducci, M. A. The role of the endothelin axis in prostate cancer. *Prostate J.* 1:126–130, 1999.
469. Remuzzi, G., Perico, N. & Benigni, A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nature Rev. Drug Disc.* 1:986–1000, 2002.
470. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. & Ullrich, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379:557–560, 1996.
471. Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K. J. & Tecce, R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signalling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 60:5310–5317, 2000.
472. Rosano, L. et al. Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res.* 67:6351–6359, 2007.
473. Rosano, L. et al.  $\beta$ -arrestin links endothelin A receptor to  $\beta$ -catenin signalling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106:2806–2811, 2009.
474. Spinella, F. et al. Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J. Mol. Med.* 91:395–405, 2013.
475. Hinsley, E. E., Hunt, S., Hunter, K. D., Whawell, S. A. & Lambert, D. W. Endothelin-1 stimulates motility of head and neck squamous carcinoma cells by promoting stromal-epithelial interactions. *Int. J. Cancer*, 130:40–47, 2012.
476. Rosanò, L. et al.  $\beta$ -arrestin-1 is a nuclear transcriptional regulator of endothelin-1-induced  $\beta$ -catenin signaling. *Oncogene* <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.527>, 2012.
477. Bagnato, A. et al. Growth inhibition of cervix carcinoma cell *in vivo* by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res.*, 62:6381–6384, 2002.
478. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Rev. Cancer*, 9:265–273, 2009.
479. Ha, N. *et al.* Lactoferrin-endothelin-1 axis contributes to the development and invasiveness of triple-negative breast cancer phenotypes. *Cancer Res.*, 71:7259–7269, 2011.
480. Wu, M. H. *et al.* Endothelin-1 promotes MMP-13 production and migration in human chondrosarcoma cells through FAK/PI3K/Akt/mTOR pathways. *J. Cell. Physiol.* 227:3016–3026, 2012.

481. Rosanò, L. et al. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 61:8340–8346, 2001.
482. Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K. J. & Tecce, R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signalling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, 60:5310–5317, 2000.
483. Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V. & Catt, K. J. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, 57:1306–1311, 1997.
484. Bagnato, A. *et al.* Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res.* 64:1436–1443, 2004.
485. Spinella, F. *et al.* Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 278:41294–41301, 2003.
486. Bagnato, A., Spinella, F., & Rosanò, L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocrine-Related Cancer*, 12:761–772, 2005.
487. Grimshaw, M. J. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 14:233–244, 2007.
488. Bagnato A, Rosano L. The endothelin axis in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40:1443-1451, 2008.
489. Guise, T. A., Mohammad, K. S., Clines, G., Stebbins, E. G., Wong, D. H., Higgins, L. S., et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clinical Cancer Research*, 12:6213s–6216s, 2006.
490. Van Sant C, Wang G, Anderson MG, Trask OJ, Lesniewski R, Semizarov D. Endothelin signaling in osteoblasts: global genome view and implication of the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cancer Ther*, 6:253-261, 2007.
491. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9:265-73, 2009.
492. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. The importance of endothelin axis in initiation, progression, and therapy of ovarian cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 299:R395-404, 2010.
493. Nelson, J. B. et al. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nature Med*, 1: 944–949, 1995.
494. Papandreou, C. N. et al. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Med*, 4:50–57, 1998.
495. Nelson, J. B. et al. The endothelin receptor antagonist atrasentan improves the time to clinical progression in hormone refractory prostate cancer patients: a randomized, double-blind, multi-national study. *J. Urol*, 16:168, 2001.
496. Carducci, M. A. et al. Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol*, 20:2171–2180, 2002.
497. Bagnato, A. et al. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*, 59:720–727, 1999.
498. Rosano, L. et al. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 61:8340–8346, 2001.
499. Rosano, L. et al. Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clin. Sci*, 103:306S–309S, 2002.
500. Salani, D. et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am. J. Pathol*, 157:1703–171, 2000.
501. Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Natali, P. G. & Bagnato, A. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277:27850–27855, 2002.
502. Wu-Wong, J. R., Chiou, W. J. & Wang, J. Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 293:514–521, 2000.
503. Del Bufalo, D. et al. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol. Pharmacol*, 61:524–532, 2002.
504. Eberl, L. P., Egidy, G., Pinet, F. & Juillerat-Jeanneret, L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 36: S354–S356, 2000.
505. Eberl, L. P., Valdenaire, O., Saintgiorgio, V., Jeannin, J. F. & Juillerat-Jeanneret, L. Endothelin receptor

- blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 86:182–187, 2000.
506. Nelson, J. B. *et al.* New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* 53:1063–1069, 1999.
507. Guise, T. A. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer*, 88 (Suppl.):2892–2898, 2000.
508. Bagnato A., Rosano L., Di Castro V., Albini A., Salani D., Varmi M., Nicotra M.R., Natali P.G. Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol*, 158:841-7, 2001.
509. Rosano L., Spinella F., Di Castro V., Nicotra M.R., Albini A., Natali P.G., Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of tumor invasion in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol*, 163:753-62, 2003.
510. Lahav R, Suva ML, Rimoldi D, Patterson PH, Stamenkovic I. Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. *Cancer Res*, 64:8945-8953, 2004.
511. Jamal S, Schneider RJ. UV induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest*, 110:443-452, 2002.
512. Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res*, 64:1436-1443, 2004.
513. Spinella F, Rosano L, Di Castro V *et al.* Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human melanoma cells. *Cancer Res*, 67:1725-1734, 2007.
514. Berger Y, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret. Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp Biol Med*, 231:1111-1119, 2006.
515. Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, *et al.* A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs*, 25:247-252, 2007.
516. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3:110-116, 2003.
517. Bagnato A. The endothelin axis as therapeutic target in human malignancies: Present and Future. *Curr Pharm Des*, 18(19):2720-33, 2012.
518. Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 163: 220-233, 2011.
519. Ishikawa K, Fukami T, Nagase T, Fujita K, Hayama T, Niiyama K *et al.* Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ETA selectivity. Potency- and solubility-enhancing modifications. *J Med Chem*, 35: 2139–2142, 1992.
520. Rosanò L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG *et al.* Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 61: 8340–8346, 2001.
521. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Salani D, Rosanò L, Spinella F *et al.* Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin Sci (Lond)* 103 (Suppl. 48):302S–305S, 2002.
522. Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I, Loizidou M. Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg*, 94: 106–112, 2007.
523. Zhang W-M, Zhou J, Ye Q-J. Endothelin-1 enhances proliferation of lung cancer cells by increasing intracellular free Ca<sup>2+</sup>. *Life Sci*, 82: 764–771, 2008.
524. Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther*, 110: 386–414, 2006.
525. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T *et al.* Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4892–4896, 1994.
526. Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol*, 49: 173–180, 2005.
527. Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 11496–11500, 1999.
528. Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ETB receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*, 20: 53–66, 2002.
529. Sekulic A, Suresh P, Pittelkow MR, Markovic S. Bosentan, a novel endothelin-A and -B receptor antagonist inhibits proliferation of malignant melanoma cells. (Abstract) Meeting of the American Association for Cancer Research. Mayo Clinic: Rochester, MN, USA, 2002.

530. Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, Millward M, Trotter JM, Wyld DK et al. A Phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs*, 25: 247–252, 2007.
531. Kefford RF, Clingan PR, Brady B, Ballmer A, Morganti A, Hersey. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer*, 9: 69, 2010.
532. Morris, C. D. et al. Specific inhibition of the endothelin A receptor with ZD4054: clinical and pre-clinical evidence. *Br. J. Cancer*, 92:2148–2152, 2005.
533. Miller, K. *et al.* Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16:187–192, 2013.
534. Cognetti, F. et al. A Phase II, randomized, double-blind study of zibotentan (ZD4054) in combination with carboplatin/paclitaxel versus placebo in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer sensitive to platinum-based chemotherapy (AGO-OVAR 2.14). *Gynecol. Oncol*, 130:31–37, 2012.
535. Kandalaf, L. E., Facciabene, A., Buckanovich, R. J. & Coukos, G. Endothelin B receptor, a new target in cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res*, 15:4521–4528, 2009.
536. Hiestand PC, Meckler P, Nordman R et al. Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2599-603, 1986.
537. de Mello-Coelho V, Gagnerault MC, Souberbielle JC et al. Growth hormone and its receptor are expressed on human thymic epithelial cells. *Endocrinology*, 139:3837-42, 1998.
538. Carr DJJ, Weigent DA, Blalock JE. Hormones common to the endocrine and immune systems. *Drug Des Deliv*, 4: 187-95, 1989.
539. Berczi I, Chalmers IM, Nagy E, Warrington RJ. The immune effects of neuropeptides. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10: 227-57, 1996.
540. Weinstock JV. Tachinin production by granuloma eosinophils in murine *Schistosomiasis mansoni*. In MacDermott RP (ed): *Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and Future Approach*. Amsterdam: Elsevier, 335-41, 1988.
541. Fuller PJ, Verity K. Somatostatin gene expression in the thymus gland. *J Immunol*, 143: 1015-7, 1989.
542. Aguila MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM. Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphatic organs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 11485-9, 1991.
543. Kogner P, Ericsson A, Barbany G et al. Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukaemia. *Blood*, 80: 1324-9, 1992.
544. De Giorgio R, Tazzari PL, Barbara G et al. Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. *J Neuroimmunol*, 82: 175-81, 1998.
545. Finch RJ, Sreedharan SP, Goetzl EJ. High-affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human myeloma cells. *J Immunol*, 142: 1977-81, 1988.
546. Tsutsumi A, Takano H, Ichikawa K et al. Expression of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in human lymphoid cells. *Cell Immunol*, 181: 44-9, 1997.
547. van Hagen PM, Hofland LJ, Lichtenauer-Kaligjs EGR et al. Neuropeptides and their receptors in the immune system. *Ann Med*, 31 (Suppl 2): 15-22, 1999.
548. Hemming PG, Stromberg T, Janson ET et al. The somatostatin analog octreotide inhibits growth of interleukin-6 (IL6-)-dependent and IL-6-independent human multiple myeloma cell lines. *Blood*, 93: 1724-31, 1999.
549. Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol*, 10: 1688-96, 1996.
550. Lipp RW, Silly H, Ranner Get al. Radiolabeled octreotide for the demonstration of somatostatin receptors in malignant lymphoma and lymphadenopathy. *J Nucl Med*, 36: 13-8, 1995.
551. Reubi JC, Waser B, van Hagen PM et al. *In vivo* and *in vitro* detection of somatostatin receptors in human malignant lymphomas. *Int J Cancer*, 50: 895-900, 1992.
552. Ferone D, Hofland LJ, Colao A, Lamberts SWJ, van Hagen PM. Neuroendocrine aspects of immunolymphoproliferative diseases. *Annals of Oncology*, 12(Suppl. 2): S125-S130, 2001.
553. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccob Sh et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 108: 2020-2028, 2006.
554. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD et al. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia*, 1-16, 2009.

555. Papandreou CN, Usmani BA, Geng Y, Bogenreider T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Med*, 4: 50-57, 1998.
556. Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri R-M, Destouni C, Apostolou E, Daliani D, Papandreou CN. Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NFκB/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int*, 11:1-13, 2011.
557. He S, Dibas A, Yorio T, Prasanna G. Parallel signaling pathways in endothelin-1-induced proliferation of U373MG astrocytoma cells. *Exp Biol Med*, 232:370-384, 2007.
558. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, et al. Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1:1059-1066, 1995.
559. Zhang YM, Wang K-Q, Zhou G-M, Zuo J, Ge J-B. Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1. *Acta Pharmacol Sin* 24:563-568, 2003.
560. Tamkus T, Leece C, Gallo K, Madhukar BV, Dimitrov N (2011) Endothelin-1/Endothelin A receptor signaling in breast cancer, poster session 2. *Cancer Res* 71(24 Suppl): Abstract nr P2-03-06.
561. Tsiapakidis K, Vlachostergios PJ, Voutsadakis JA, Befani CD, Patrikidou A, Hatzidaki E, Daliani DD, Moutzouris G, Liakos P, Papandreou CN. Bortezomib reverses the proliferative and antiapoptotic effect of neuropeptides on prostate cancer cells. *Int J Urol* 19:565-574, 2012.
562. Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis JA, Hatzidaki E, Valeri RM, Destouni C, Apostolou E, Papandreou CN. Neuropeptide inducible upregulation of proteasome activity precedes nuclear factor kappa B activation in androgen independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 12:31, 2012.
563. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10:4670-9, 2004.
564. Gomez-Bougie P, Wuilleme-Tpumi S, Menoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, Bataille R, Amiot M. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res* 67: 5418-5424, 2007.
565. Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Amiot M. A humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. *BJC* 100:366-369, 2009.
566. Balsas P, Lopez-Royuela N, Galan-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J. Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem Pharmacol* 77:804-812, 2009.
567. Zhou L, Hou J, Fu W, Wang D, Yuan Z, Jiang H. Arsenic trioxide and 2-methoxyestradiol reduce b-catenin accumulation after proteasome inhibition and enhance the sensitivity of myeloma cells to bortezomib. *Leuk Res*, 32:1674-1683, 2008.
568. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*, 20 Suppl 12:S11-4, 1992.
569. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:4892-6, 1994.
570. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol*, 39:147-164, 2002.
571. 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*, 107:2628-2636, 2002.
572. Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR. Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia*, 7:631-637, 2005.
573. Ge NK, Rudikoff S (2000) Insulin-like growth factor 1 is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 96:2856-2861
574. Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulin-like growth factor 1 signalling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates and pathway cross-talk. *Blood*, 99:4138-4146, 2002.
575. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:10983-10985, 2001.
576. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, 22:239-51, 2008.

577. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Gene Dev*, 16: 1472-87, 2002.
578. Shuqing Lu, Jianmin Wang. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res*, 1:13, 2013.
579. Kusahara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzuki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 50:3257-3261, 1990.
580. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest*, 87:1867-1871, 1991.
581. Nakamuta M, Ohashi M, Tabata S, Tanabe Y, Goto K, Naruse M, et al. High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 88:248-252, 1993.
582. Shankar A, Loizidou M, Aliev G, Fredericks S, Holt D, Boulous B, et al. Raised endothelin 1 levels in patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 85:502-6, 1998.
583. Kojima K, Nihei Z. Expression of endothelin-1 immunohistochemistry in breast cancer. *Surg Onc*, 4:309-15, 1995.
584. Nelson B, Chan-Tack K, Hedican P, Magnuson R, Opgenorth T, Bova G et al. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 56:663-8, 1996.
585. Hoosein M, Dashwood M, Dawas K, Grant K, Taylor I, Loizidou M. Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19:775-82, 2007.
586. Grant K, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*, 88:163-6, 2003.
587. Eberle J, Fecker L, Orfanos C, Geilen C. Endothelin-1 decreases basic apoptotic rates in human melanomacell lines. *J Invest Dermatol*, 119:549-55, 2002.
588. Grimshaw M, Wilson J, Balkwill F. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol*, 32:2393-400, 2002.
589. Helleman J, Smid M, Jansen MP, van der Burg ME, Berns EM. Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. *Gynecol Oncol*, 117:170-176, 2010.
590. Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Martinelli S, Castelli I, et al. Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in Chronic Lymphocytic leukemia B Cells through ETA receptor. *PLOS ONE*, 9:e98818, 2014.
591. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia*, 1-16, 2009.
592. Kondoh M, Miyazaki H, Watanabe H, Shibata T, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K. Isolation of anti-endothelin receptor monoclonal antibodies for use in receptor characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, 172:503-510, 1990.
593. Shannon TR, Hale CC. Identification of a 65kDa endothelin receptor in bovine cardiac sarcolemmal vesicles. *Eur J Pharm*, 267:233-238, 1994.
594. Freedman, NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors: evidence for Gprotein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*, 272:17734-17743, 1997.
595. Kurokawa K, Yamada H, Ochi J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol*, 389:348-360, 1997.
596. Masuda Y, Miyazaki H, Kondoh M, Watanabe H, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K. Two different forms of endothelin receptors in rat lung. *FEBS Lett*, 257:208-210, 1989.
597. Bednar DL, Stein RB, Garsky VM, Williams DL. The bovine endothelin receptor has an apparent molecular weight of 43,000. *Biochem Biophys Acta*, 1092: 226-232, 1991.
598. Takasura T, Sakurai T, Goto K, Furuichi Y, Watanabe T. Human endothelin receptor ETB. *J Biol Chem*, 269:7509-7513, 1994.
599. Adachi M, Yang YY, Furuichi Y, Miyamoto C. Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 180:1265-1272, 1991.
600. Cyr C, Huebner K, Druck T, Kris R. Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ETA receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 181:184-190, 1991.
601. Miyamoto Y, Yoshimasa T, Arai H, Takaya K, Ogawa Y, Itoh H, Nakao K. Alternative RNA splicing of the human endothelin-A receptor generates multiple transcripts. *Biochem J*, 313:795-801, 1996.
602. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takawa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and



- functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 178: 656-663, 1991.
603. Elshourbagy NA, Adamou JE, Gagnon AW, Wu HL, Pullen M, Nambi P. Molecular characterization of a novel human endothelin receptor splice variant. *J Biol Chem*, 271:26300-25307, 1996.
604. Tsutsumi M, Liang G, Jones PA. Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene*, 228:43-49, 1999.
605. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. *J Exp Med*, 172:1741-1748, 1990.
606. Kondo M, Ishida N, Kobayashi M, Mitsui Y. Secretion of endothelin-1 in human endothelial cell line but not in B cell line by transfection of preproendothelin-1 cDNA. *Biochim Biophys Acta*, 1134:242-246, 1992.
607. Yamaguchi E, Yamanoi A, Ono T, Nagasue N. Experimental investigation of the role of endothelin-1 in idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol*, 22:1134-1140, 2007.
608. Redmond EM, Cahill PA, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 1996:469-479, 1996.
609. LeBrun G, Aubin P, Soliman H, Ropiquet F, Vilette JM, Berthou P, Creminon C, Cussenot O, Fiet J. Upregulation of endothelin-1 and its precursor by IL-1 beta, TNF-alpha and TGF-beta in the PC3 human prostate cancer cell line. *Cytokine*, 11:157-162, 1999.
610. Mallat A, Preaux AM, Serradeil-Le-Gal C, Raufaste D, Gallois C, Brenner DA, Bradham C, Macclouf J, Iourgenko V, Fouassier L, Dhumeaux C, Mavier P, Lotersztajn S. Growth inhibitory properties of endothelin-1 inactivated human hepatic stellate cells: a cyclic adenosine monophosphate-mediated pathway. Inhibition of both extracellular signal-regulated kinase and c-jun kinase and upregulation of endothelin B receptors. *J Clin Invest*, 98:2771-2778, 1996.
611. Oikawa T, Kushuhara M, Ishikawa S, Hitomi J, Kono A, Iwanaga T, Yamaguchi K. Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*, 69:1059-1064, 1994.
612. Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulous PB, Burnstock G, Taylor I. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *BJC*, 85:1759-1763, 2001.
613. Grimshaw MJ. Endothelins in breast tumor cell invasion. *Cancer Lett*, 222:129-138, 2005.
614. Godara G, Cannon GW, Cannon Jr GM, Bies RR, Nelson JB, Pflug BR. Role of endothelin axis in progression to aggressive phenotype of prostate adenocarcinoma. *Prostate*, 65:27-34, 2005.
615. Donckier JE, Mertens-Strijthagen J, Flamion B. Role of the endothelin axis in the proliferation of human thyroid cancer cells. *Clin Endocrinol*, 67:552-556, 2007.
616. Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Siros P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14:385-399, 1993.
617. Gooding RP, Bybee A, Cooke F, Little A, Marsh SGE, Coelho E, Gupta D, Samson D, Apperley JF. Phenotypic and molecular analysis of six human cell lines derived from patients with plasma cell dyscrasia. *Br J Haematol*, 106:669-681, 1999.
618. Ali H, Dashwood M, Dawas K, Loizidou M, Savage F, Taylor I. Endothelin receptor expression in colorectal cancer. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36:S69-71, 2000.
619. Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoaka Y, Nakajima M. Expression of the endothelin receptor A associated with prostate cancer progression. *J Urol*, 165:1033-6, 2001.
620. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 406:536-540, 2000.
621. Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch*, 438:485-491, 2001.
622. Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR et al. Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1 alpha in human melanoma cells. *Cancer Res*, 67:1725-1734, 2007.
623. Voortman J, Checinska A, Giaccone G. The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer*, 6:73, 2007.
624. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, et al. Differential and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5:665-675, 2006.
625. Lu S, Yang J, Song X, et al. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J Pharmacol Exp Ther*, 32:423-431, 2008.


626. Lu S, Yang J, Chen J, et al. Different mutants of PSMB5 confer varying bortezomib resistance in T lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from the Jurkat cell line. *Exp Hematol*, 37:831-837, 2009.
627. Ge NK, Rudikoff S. Insulin-like growth factor 1 is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*, 96:2856-2861, 2000.
628. Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, Ugander M, Ingemansson R, Edvinson L, et al. PKC and MAPK signaling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *Eur J Pharmacol*, 580:190-200, 2008.
629. Orlowski RZ, Small GW, Shi YY. Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 277:27864-27871, 2002.
630. Esparis-Ogando A, Alegre A, Aguando B, Mateo G, Gutierrez N, Blade J, Schenkein D, Pandiella A, San Miguel JF. Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias. *Int J Cancer*, 114:665-667, 2005.
631. Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor bortezomib. *Exp Cell Res*, 295:555-566, 2004.
632. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munchi NC, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene*, 22:8386-8393, 2003.
633. Befani CD, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Patrikidou A, Bonanou S, Simos G, Papandreou CN, Liakos P. Bortezomib represses HIF-1 $\alpha$  protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/mTOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *J Mol Med*, 90:45-54, 2012.
634. Khun DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, Davis RA, et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in pre-clinical models of multiple myeloma. *Blood*, 120:3260-70, 2012.
635. Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 47:685-8, 2000.
636. Shin DH, Chun YS, Lee DS, Huang LE, Park JW. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia inducible factor-1. *Blood*, 111:3131-3136, 2008.
637. Zhu K, Chan W, Heymach J, Wilkinson M, McConkey DJ. Control of HIF-1 $\alpha$  expression by eIF2 $\alpha$  phosphorylation mediated translational repression. *Cancer Res*, 69:1836-1843, 2009.
638. Voorhees P.M., Dees E.C., O'Neil B., Orlowski R.Z. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 9:6316-6325, 2003.
639. Christmann M., Verbeek B., Roos WP., Kaina B. O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta*, 1816:179-190, 2011.
640. Xu-Welliver M., Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 23:823-830, 2002.
641. Lavon I., Fuchs D., Zrihan D., Efroni G., Zelikovitch B., Fellig Y., Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res.*, 67:8952-8959, 2007.
642. Vlachostergios P.J., Hatzidaki E., Stathakis N.E., Koukoulis G.K., Papandreou C.N. Bortezomib downregulates MGMT expression in T98G glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*, 33:313-318, 2013.
643. Obeng E., Carlson L., Gutman D., Harrington JW., Lee KLHB. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107:4907-4916, 2006.
644. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K. Jr, Boise LH, Chiao PJ, Huang P. et al. Bortezomib inhibits PKR-Like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 65: 11510-11519, 2005.
645. Fribley A, Wang CY. Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cancer Biol Ther* 5:745-748, 2006.
646. Morgillo F, D' Aiuto E, Troiani T, Martinelli E, Cascone T, De Palma R et al. Antitumor activity of bortezomib in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 71:283-290, 2011.
647. Kretwoski R., Stypulkowska A., Cechowska-Pasko M. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line. *Mol Cell Biochem*, 398:165-173, 2015.
648. Festjens N., Berghe T.V., Vandenaabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10):1371-1387, 2006.

649. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 21:871–877, 2009.
650. Papandreou CN, Logothetis CJ: Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* 64:5036–5043, 2004.
651. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberg MA, Simons JW: Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, 1:944–949, 1995.

# ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

---

# Endothelin-1 (ET-1) induces resistance to bortezomib in human multiple myeloma cells via a pathway involving the ET<sub>B</sub> receptor and upregulation of proteasomal activity

Maria Vaiou<sup>1</sup> · Evanthia Pangou<sup>2</sup> · Panagiotis Liakos<sup>2</sup> · Nikos Sakellaridis<sup>3</sup> · George Vassilopoulos<sup>4</sup> · Konstantinos Dimas<sup>3</sup>  · Christos Papandreou<sup>1</sup>

Received: 30 January 2016 / Accepted: 4 August 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

## Abstract

**Purpose** Bortezomib (BTZ) is used for the treatment of multiple myeloma (MM). However, a significant proportion of patients may be refractory to the drug. This study aimed to investigate whether the endothelin (ET-1) axis may act as an escape mechanism to treatment with bortezomib in MM cells.

**Methods** NCI-H929 and RPMI-8226 (human MM cell lines) were cultured with or without ET-1, BTZ, and inhibitors of the endothelin receptors. ET-1 levels were determined by ELISA, while the protein levels of its receptors and of the PI3K and MAPK pathways' components by

western blot. Effects of ET-1 on cell proliferation were studied by MTT and on the ubiquitin proteasome pathway by assessing the chymotryptic activity of the 20S proteasome in cell lysates.

**Results** Endothelin receptors A and B (ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R, respectively) were found to be expressed in both cell lines, with the RPMI-8226 cells that are considered resistant to BTZ, expressing higher levels of ET<sub>B</sub>R and in addition secreting ET-1. Treatment of the NCI-H929 cells with ET-1 increased proliferation, while co-incubation of these cells with ET-1 and BTZ decreased BTZ efficacy with concomitant upregulation of 20S proteasomal activity. Si-RNA silencing or chemical blockade of ET<sub>B</sub>R abrogated the protective effects of ET-1. Finally, data suggest that the predominant signaling pathway involved in ET-1/ET<sub>B</sub>R-induced BTZ resistance in MM cells may be the MAPK pathway.

**Conclusion** Our data suggest a possible role of the ET-1/ET<sub>B</sub>R axis in regulating the sensitivity of MM cells to BTZ. Thus, combining bortezomib with strategies to target the ET-1 axis could prove to be a novel promising therapeutic approach in MM.

Konstantinos Dimas and Christos Papandreou have contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00432-016-2216-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Konstantinos Dimas  
kdimas@med.uth.gr

✉ Christos Papandreou  
cpapandreou@med.uth.gr

<sup>1</sup> Department of Medical Oncology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

<sup>2</sup> Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

<sup>4</sup> Department of Hematology, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Biopolis, 41110 Larissa, Greece

**Keywords** Multiple myeloma · Bortezomib · Endothelin-1 · Ubiquitin–proteasome pathway · ET<sub>B</sub>R

## Abbreviations

Akt	Protein kinase B
BTZ	Bortezomib
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGF	Epidermal growth factor
Erk1/2 (p44/42)	Extracellular signal-regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3

ET <sub>A</sub> R	Endothelin receptor A
ET <sub>B</sub> R	Endothelin receptor B
FBS	Foetal bovine serum
GPCR	G-protein coupled receptor
HMCLs	Human multiple myeloma cell lines
HY	Hyperdiploid class
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LB	Low bone disease class
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MM	Multiple myeloma
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NEP/CD10	Neuropeptidase
NF-κB	Nuclear factor κB
NP's	Neuropeptides
P70S6K	p70S6 Kinase
PI	Proteasome inhibitor
PI3-K	Phosphoinositide 3-kinase
PS-341	Bortezomib
UPS	Ubiquitin proteasome system

## Introduction

Multiple myeloma (MM) is a frequent and incurable plasma cell neoplasm, characterized by a clonal population of malignant plasma cells in the bone marrow and high levels of a specific immunoglobulin band (M protein). Patients experience anemia and present with bone lesions and end-organ damage, including renal failure (Seece 2007; Rajkumar 2009). MM is the second most common hematological malignancy, constituting 13 % of blood cancers and 1 % of all cancers with a median survival of 3 years. MM accounts for approximately 20 % of deaths from hematological malignancy and nearly 2 % of deaths from cancer (Bergsagel and Kuehl 2005).

The ubiquitin proteasome system (UPS) has emerged as one of the most important systems contributing to multiple myeloma pathophysiology. The UPS consists of the 26S proteasomes, ubiquitin, ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2), ubiquitin ligases (E3) and deubiquitinases (Hershko and Ciechanover 1998). Total ubiquitinated proteins, including those associated with chromosomal translocations, have been reported to be markedly increased in MM cells as compared to normal plasma cells (Xu et al. 2010). This could relate to E1 activity, which is responsible for the first step of the ubiquitination process. Another essential component of the UPS pathway, the 26S proteasomes, consisting of a core 20S catalytic complex and a 19S regulatory complex, have been identified as good biomarkers for MM treatment response and prognosis (Adams 2003). The 19S complex is responsible for selecting the ubiquitinated proteins for catalytic

degradation by the 20S complex, which possesses chymotryptic, tryptic and peptidylglutamyl-like activities (Kumar and Rajkumar 2008). Several studies have also shown that the concentrations of proteasomes and their mRNA levels were consistently higher in a variety of malignant human hematopoietic cell lines, including MM cells, compared to resting peripheral lymphocytes and monocytes from healthy adults (Kumatori et al. 1990).

Modulation of the activity of the UPS pathway with the proteasome inhibitor (PI) bortezomib (PS-341, Velcade), the first-in-class PI to enter the clinic, has been validated as a rational therapeutic strategy for MM (Kane et al. 2003). Following several large, multicenter clinical trials, bortezomib was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and by the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of MM patients both in the first-line and relapsed–refractory settings (Richardson et al. 2003, 2005; Fisher et al. 2006; San Miguel et al. 2008).

Bortezomib is a dipeptidyl boronic acid-based, and specific, reversible PI that targets the chymotrypsin- and caspase-like active sites of the 20S core of the proteasome, with minimal effect on the trypsin-like activity (Moreau et al. 2012). It has been shown to induce caspase-mediated apoptosis (Reddy and Czuczman 2010) and endoplasmic reticulum stress response associated with disruption of the unfolded protein response (UPR) that is triggered by the accumulation of intracellular misfolded and/or unfolded proteins. This is an important aspect of proteasome inhibition because multiple myeloma cells produce large amounts of immunoglobulin and a functional UPR is required for their survival (Hideshima et al. 2011). Bortezomib also leads to downregulation of the expression of several tumor-promoting proteins in the bone marrow microenvironment, through the inhibition of the NF-κB activation pathway (Rajkumar et al. 2005; Moreau et al. 2012).

However, it has been found that a significant proportion of patients are resistant to bortezomib even before treatment, or eventually become refractory to bortezomib therapy. Response rates in patients with previously bortezomib-sensitive disease are typically decreased upon drug re-challenge (Conner et al. 2008; Warzocha et al. 2008; Wolf et al. 2008). Studies have shown that proteasome inhibition activates multiple inducible chemoresistance mechanisms, including mutations/overexpression of b subunits of proteasomes and/or modulation of cell signaling pathways (Shuqing and Wang 2013), which could explain acquired drug resistance.

Neuropeptides (NPs) are naturally occurring peptides that act as potent mitogens for many cancer types (Shipp et al. 1991; Shipp and Look 1993). Their potential role in the immune system as well, which occurs through autocrine/paracrine modulation of lymphoid cell activity, including proliferation and mitogenesis has also been

phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit mAb, p44/42 MAPK (Erk 1/2) rabbit mAb; phospho-p70 S6 kinase (Thr389) rabbit mAb, p70 S6 kinase rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA). Si-RNAs targeting ET<sub>B</sub>R, AllStarssiRNA and Lipofectamine RNAiMAX were purchased from Qiagen and Invitrogen (Life Technologies Ltd, UK).

### Cell lines and cultures

The human multiple myeloma cell lines (HMCLs) RPMI-8226 and NCI-H929 were purchased from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECCAC, Health Protection Agency, Salisbury, UK). Cells were cultured in RPMI-1640 (Gibco, UK) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco, UK), 2 mM L-Glutamine (Gibco, UK), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco, UK). NCI-H929 cell cultures were also supplemented with 50 µM 2-mercaptoethanol (Gibco, UK). All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>.

### Enzyme-linked immunosorbent assays

Cells were incubated for 3, 6, 12, 24 and 48 h in medium containing 0.5 % FBS. After the incubation period, culture supernatants and 0.5 % CHAPS cell lysates were collected, and ET-1 levels were measured by a commercially available double-sandwich-based ELISA assay (IBL International). To concentrate analytes, culture supernatants were lyophilized in a Speed Vac concentrator and the lyophilized fractions were solubilized in 100 µl IBL's buffer prior to use in ELISA assays. The performance characteristics of the assay were the followings: 0.23 pg/ml sensitivity and cross-reactivity: 100 % ET-1, 0.1 % ET-3, ≤0.1 % ET-1 (1–31), ≤0.1 % ET-2 and ≤0.1 % human big ET-1. The absorbance was read at 450 nm on a microplate reader (BIO-TEK Instruments). Each sample was tested in duplicate, and concentrations were reported in pg/ml based on absorbance unit plot readings.

### NEP enzymatic activity assay

Chromogenic NEP activity assay in total cell lysates was performed as described previously (Papandreou et al. 1998; Patrikidou et al. 2011). Briefly total protein cell lysates were prepared using a 0.5 % CHAPS buffer, which did not affect enzymatic activity, and the NEP activity assay was performed using the Suc-Ala-Ala-Phe-pNP (Bachem AG, Germany) as substrate. Absorbance was read at 540 nm using a Wallac Victor™ multilabel counter. Specific activity was calculated as picomoles of converted substrate per microgram protein per minute. Values were compared

against a substrate-specific standard curve and an rhNEP enzyme activity curve.

### Cell proliferation

Cell proliferation was monitored using the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Applichem, Germany, GmbH). In this assay, dehydrogenases expressed by metabolically active cells convert MTT into a purple intracellular formazan product. The quantity of formazan product as measured by 540 nm absorbance is directly proportional to the number of viable cells in culture.

Approximately  $15 \times 10^3$  cells were seeded in 100 µl medium containing 0.5 % FBS in 96-well flat-bottomed plates and then treated with 0.1 µM ETR antagonists for 30 min, then with 100 nM ET-1 for 24 h and finally with 2 nM BTZ (or 5 nM for some selected experiments on RPMI-8226) for a further 24 h. MTT (5 mg/ml dissolved in PBS) was then added to a final concentration 0.5 mg/ml to each well. Cells were incubated at 37 °C for 4 h and then allowed to adhere to a 96-well plate by centrifugation at 2000 rpm for 20 min. The supernatant was removed, and the converted dye was solubilized with 150 µl DMSO per well. Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (BIO-TEK Instruments). The percentage of surviving cells was estimated by dividing the  $(OD_{\text{treated cells}} - OD_{\text{Blank}})$  with  $(OD_{\text{untreated cells}} - OD_{\text{Blank}})$ . The corresponding IC<sub>50</sub> values were determined from the dose-response curve.

### Proteasome activity assay

To measure proteasome activity,  $5 \times 10^5$  cells were incubated in 25-cm<sup>2</sup> T-flasks (Corning) in medium supplemented with 0.5 % FBS and then treated with 0.1 µM ETR antagonists for 30 min, then with 100 nM ET-1 for 2 h and finally with 2 nM BTZ for a further 30 min. After the incubation period, chymotryptic activity of the 20S proteasome was measured in 0.5 % CHAPS total cell lysates as previously described (Patrikidou et al. 2011).

### Western blot analysis

Fractionation of cells, analysis of total cellular proteins, electrophoresis and immunoblotting were carried out as previously described (Patrikidou et al. 2011). For the detection of ET-1 receptors, cells were incubated in physiological culture conditions, while for the analysis of ET-1-mediated signaling pathways, treatment conditions were as stated for proteasome activity assay. Briefly, equal amounts of proteins were resolved by 4–12 % Bis-Tris or 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE) transferred onto PVDF membranes and probed with the following antibodies: ETA (1:1500), ETB (1:1000), CD10 (1:1000), p-Erk1/2 (1:1000), total Erk1/2 (1:1000), p-Akt (1:1000), total Akt (1:1000), p-p70S6K (1:500), p70S6K (1:500) and b-actin (1: 10,000). The blots were then washed with TBST and probed with 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at RT. After 3 × washes, the blots were developed using an ECL kit (Santa Cruz, Biotechnology, USA). Images were acquired and then analyzed by UVIAlliance Software.

### Transfection and siRNA-mediated silencing of ET<sub>B</sub>R

mRNA encoding ET<sub>B</sub>R was targeted using Hs-EDNRB-8(5'-CAGAATGATCCCAATAGATGT-3') HP validated siRNA and AllStarssiRNA as negative control. RPMI-8226 cells were incubated in RPMI-1640 containing 2.5 % FBS without antibiotics for 24 or 48 h with siRNA (10 nM) in the presence of Lipofectamine RNAiMAX as described by the manufacturer for the reverse transfection protocol. The cells were allowed to grow and were then harvested to determine the knockdown efficiency by western blot. For MTT and proteasome activity assays, 24 h post-transfection, cells were either untreated (control) or treated with BTZ (2 nM).

### Statistical analysis

The SPSS Statistical package for Windows (IBM SPSS Statistics version 23) was used. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post hoc test was used for the comparison of data, and the statistical significance limit was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### ET-1 axis in the pathobiology of MM cells

Since no information is yet available regarding the role and function of the ET-1 axis in MM, we initially focused on the detection of its major components-ET-1, ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R receptors, as well as the related enzyme neuropeptidase (NEP)/CD10.

At first, we screened the two MM cell lines for the expression of ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R at the protein level, under basal culture conditions. Western blot analysis revealed that both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are present in MM cells. Specifically, we detected bands with a molecular weight of approximately 49 kDa for ET<sub>A</sub>R, which is similar to the size described by the supplier of the anti-ET<sub>A</sub>R antibody (Abcam, Cambridge, UK) (Fig. 1a). Similarly, anti-ET<sub>B</sub>R

recognized three bands with sizes approximately at 59, 49 and 48 kDa. The specificity of the detected signal for the ET<sub>B</sub>R antibody was further confirmed by knockingdown ET<sub>B</sub>R via transfection of the RPMI-8226 cells with siRNA (see materials and methods and Fig. 1a). Western blot analysis showed efficient knockdown of ET<sub>B</sub>R in cells transfected with the specific siRNA as compared to the control cells (cells transfected with scrambled siRNA) (on average ~40 %) and thus the signal at these molecular weights was attributed to specific binding of the antibody (Fig. 1a, b).

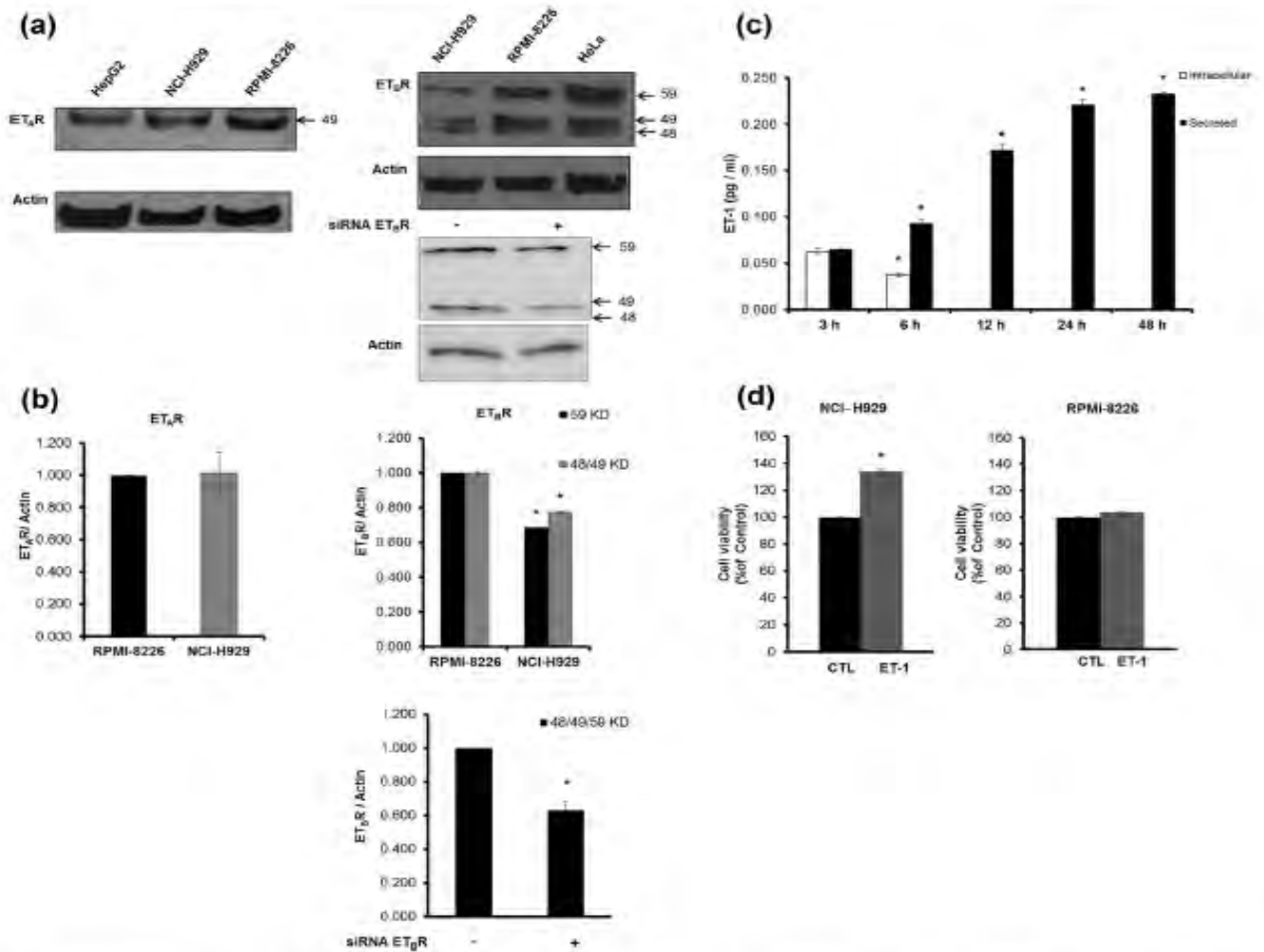
Densitometric quantification after normalization on b-actin showed that the ET<sub>A</sub>R receptor expression level was comparable in the two MM cell lines. However, the level of ET<sub>B</sub>R receptor produced in the RPMI-8226 was about 30 % higher than in NCI-H929 cells (Fig. 1b).

In a further step to ascertain whether MM cells produce ET-1, we determined the levels of this protein in culture supernatants and cell lysates by ELISA, after culture in the presence of 0.5 % FBS, the low-serum condition in which all our experiments were performed. Secreted ET-1 was detected in the supernatant from unstimulated RPMI-8226 cells as early as 3 h after the initiation of cultures and increased in a time-dependent manner, ranging from  $0.065 \pm 0.001$  pg/ml at 3 h to  $0.221 \pm 0.006$  pg/ml at 24 h, remaining at these levels for up to 48 h (the last time point analyzed). Also, cell-associated ET-1 could be measured as early as 3 h in whole cell lysates ( $0.063 \pm 0.004$  pg/ml), and a marked decrease was noted at 6 h, reaching at no detectable levels after 12 h (Fig. 1c). Conversely, we did not detect any secretion or production of ET-1 by NCI-H929 (data not shown). The PC3 prostate cancer cell line was used as positive control, as we previously demonstrated that secreted ET-1 concentration measured in cell culture supernatants was 4.95 pg/ml (Patrikidou et al. 2011). The results obtained for the ET-1 secreted by the RPMI-8226 cells in the present study were similar to the one previously observed in PC3 cells (4.031 pg/ml).

Subsequently, since the specific function of ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R in MM cells remains unknown, we investigated its biological role and its possible cellular mechanism by establishing an autocrine loop and/or by acting throughout the micro-environment. To this end, based on data demonstrating ET-1 to be mitogenic and to act as an autocrine or paracrine regulator of growth in many tumor cells (Bagnato et al. 1995; Grant et al. 2007; He et al. 2007; Tamkus et al. 2011; Zhang et al. 2003b), we studied its effects on the proliferation of HMCLs.

As in previous studies conducted by other investigators to address ET-1 effects in human melanoma, ovarian and colorectal cancer cell lines, we performed all the experiments in 0.5 % FBS to eliminate the confounding effects of growth factors (e.g., IGF-1) present in serum (Bagnato





**Fig. 1** ET-1 axis in the pathobiology of MM cells. **a, b** Expression of ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R receptors in MM cells. Detection of ET<sub>A</sub>R (left) and ET<sub>B</sub>R (upper right) was determined by western blot in total cell extracts using 4–12 % Bis-Tris polyacrylamide gels. ET<sub>A</sub>R receptor at approximately 49 kDa and ET<sub>B</sub>R bands at approximately 48, 49 and 59 kDa are shown. RPMI-8226 total cell lysates from cells transfected with either scrambled siRNA (10 nM) or siRNA ET<sub>B</sub>R (10 nM) were analyzed by western blot using 10 % SDS-polyacrylamide gels (bottom right) (a). b-Actin was used as a loading control. HepG2 and HeLa cell lysates were used as positive controls. Densitometric analysis of the bands was done using the UVIAlliance image analysis software (b). The quantification of band intensity is presented as a mean ± SD after normalization to actin (n = 4), p < 0.05;

\*vs RPMI-8226 or scrambled siRNA. **c** Time-dependent secretion/production of ET-1 in RPMI-8226 cell line. Culture supernatants and 0.5 % CHAPS cell lysates were collected at 3, 6, 12, 24 and 48 h and assayed for the secreted and intracellular ET-1 content by a double-sandwich ELISA. Data are represented as mean ± SD of two independent experiments each performed in duplicate. p < 0.05; \*vs 3, 6 or 12 h. **d** Effect of ET-1 on proliferation of MM cells. NCI-H929 (left) and RPMI-8226 (right) cell lines were incubated in the absence (CTL) or presence of 100 nM ET-1 for 48 h. After the incubation period, cell proliferation was determined by MTT Assay. Data represent mean values ± SD of three independent experiments each performed in triplicate. p < 0.05; \*vs CTL.

et al. 1995; Ali et al. 2000; Berger et al. 2006). To exclude that the reduction of FBS could influence the viability of the cells, both RPMI-8226 and NCI-H929 cell were grown in medium supplemented with either 0.5 or 5 % FBS, respectively, and cell growth was subsequently determined by the MTT assay for up to 72 h. The amount of FBS

slightly affected the doubling time of the cells, but not their viability (Supplementary Fig. S1).

In order to study the impact of ET-1 on the response of the cells to BTZ, preliminary assays with the ET-1 peptide were also conducted and the optimal incubation concentration and time point for MM cells were found to be 100 nM

and 48 h, respectively. This concentration is also consistent with previous reports that studied the effects of ET-1 in prostate and ovarian cancer cell lines (Rosano et al. 2001; Spinella et al. 2003, 2004; Patrikidou et al. 2012; Tsapakidis et al. 2012). As shown in Fig. 1d, cell viability of NCI-H929 increased upon ET-1 stimulation by about 30 %, as compared to unstimulated control cells. Contrarily, in the case of RPMI-8226 no difference in cell viability was detected between treated and untreated cells. The fact that the RPMI-8226 cells do not respond to exogenously added ET-1 may be due to an already highly active state of the pathway as a result of endogenously produced and secreted ET-1 by the same cells. Thus, unlike in NCI-H929, additional ET-1 has no further effect in RPMI-8226 cells. Subsequently, these data may suggest that endogenous ET-1 could act as an autocrine growth factor to stimulate and sustain the proliferation of the RPMI-8226 MM cells.

Given that neuropeptidase NEP/CD10 comprises a key component of ET-1 signaling, we addressed whether possible aberration of NEP expression could be involved in the observed differential ET-1 levels in multiple myeloma cell lines, by affecting peptide concentrations at the cell surface. To this end, we evaluated the baseline NEP expression in the two MM cell lines and the corresponding enzymatic activity. MM cells were found to be negative for NEP expression on western blot analysis and as expected showed negligible NEP enzymatic activity as well (Supplementary Fig. S2).

#### ET-1 is involved in the acquisition of resistance to BTZ by MM cells

Previous studies have shown that NCI-H929 are more sensitive to BTZ (>40 % apoptotic cells in treated cultures), as compared to the resistant RPMI-8226 (<25 % apoptotic cells in treated cultures) (Gomez-Bougie et al. 2007; Descamps et al. 2009). Similar results were reported by other investigators who evaluated the sensitivity of these myeloma cell lines to BTZ (Zhou et al. 2008; Balsas et al. 2009).

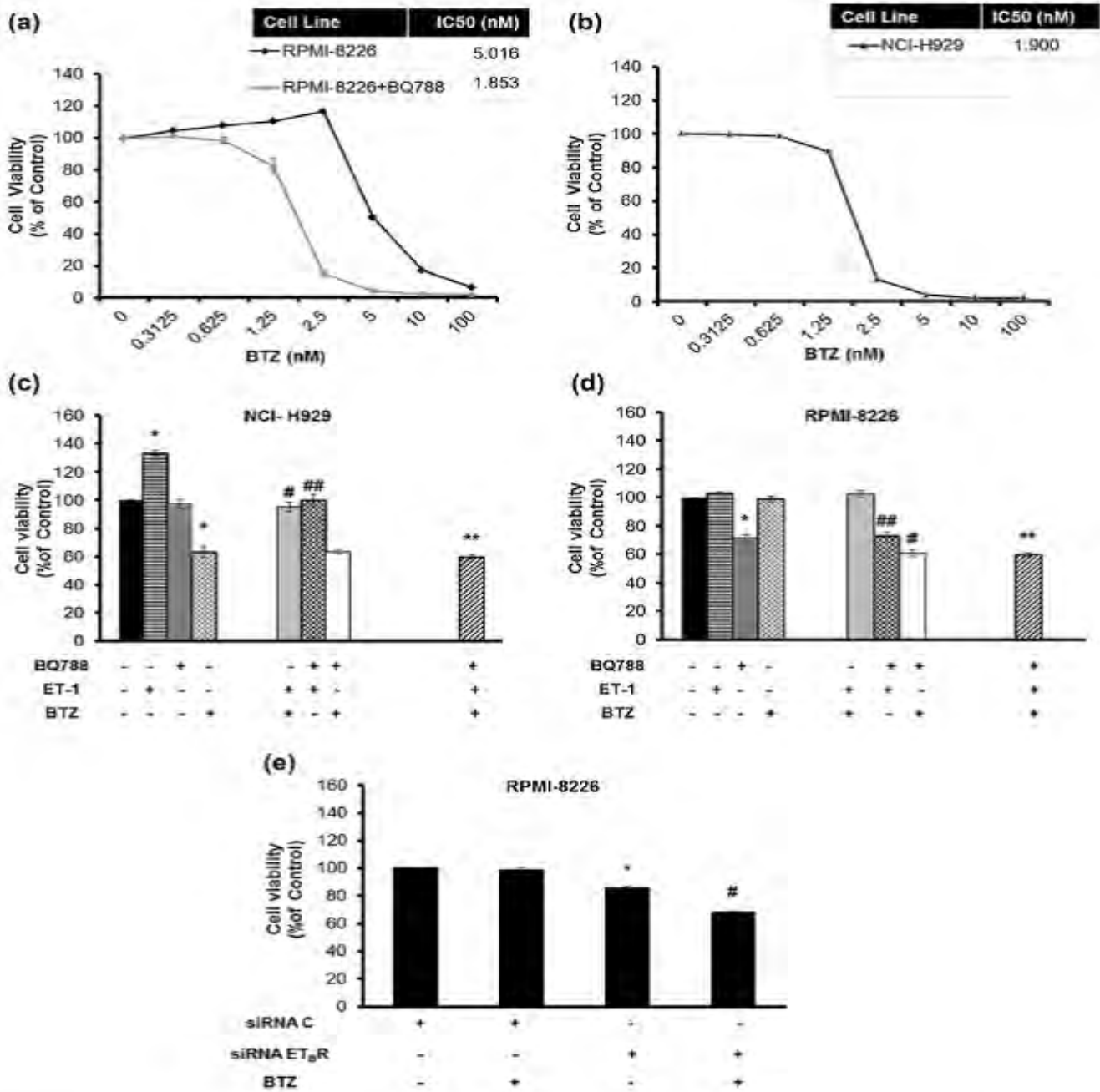
To confirm the differential sensitivity of these cell lines to BTZ, MTT assay was performed in cultures where cells were co-incubated with increasing concentrations of BTZ (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 100 nM) for 24 h. The final concentration of DMSO that was used for the dilution of BTZ never exceeded 0.1 %, and this concentration showed no effect on the proliferation of all tested cell lines (negative control). As shown in Fig. 2a, b, BTZ inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner after 24-h incubation. Indeed, the IC<sub>50</sub> of BTZ was 2.5 times higher in RPMI-8226 as compared to NCI-H929 (about 5 and 2 nM, respectively, Fig. 2a, b).

In order to determine whether ET-1 and subsequent ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R activation may contribute to BTZ resistance, we challenged both drug-resistant and sensitive cell lines with BTZ in the presence or not of ET-1. As illustrated in Fig. 2c, the addition of exogenous recombinant human ET-1 to NCI-H929 cells stimulated the proliferation of those cells and ultimately protected NCI-H929 cells from the BTZ-induced cell viability decrease, enhancing their viability from  $63.449 \pm 4.112$  % in BTZ-treated to  $95.039 \pm 3.404$  % in cells treated with ET-1 + BTZ (Fig. 2c). Unlike in NCI-H929 cells, viability of RPMI-8226 cells treated with BTZ at the same concentration (i.e., 2 nM) was unaffected. Additionally, we found no difference in cell viability between BTZ-, ET-1- and ET-1 + BTZ-treated RPMI-8226 cells (Fig. 2d), demonstrating that the presence of exogenous ET-1 did not have any effect on RPMI-8226 whatsoever.

#### Suppression of ET-1/ET<sub>B</sub>R pathway enhances the inhibitory effects of BTZ, re-sensitizing MM cells to the drug

In order to shed some light on ET-1 axis function in MM cells, we further examined which ET-1 receptor(s) could be responsible for the effects of ET-1 on MM cells. To this end, we studied cell proliferation induced in cells by adding exogenous ET-1 in the presence of either the ET<sub>A</sub>R antagonist BQ123 (Ihara et al. 1992) or the ET<sub>B</sub>R antagonist BQ788 (Ishikawa et al. 1994). At a concentration of 0.1 μM, these modified-peptide antagonists are reported to be highly specific for their respective receptor (Ihara et al. 1992; Ishikawa et al. 1994). As shown in Fig. 2c, the incubation of cells with the ET<sub>B</sub>R inhibitor BQ788 alone did not exert any effect on NCI-H929 cells. However, upon stimulation with the ET-1 peptide, the blockade of ET<sub>B</sub>R by BQ788 abrogated ET-1-induced proliferation of NCI-H929 cells. More importantly the presence of BQ788 was able to reverse the ET-1 induced resistance to BTZ attenuating the viability from  $95.039 \pm 3.404$  to  $60.205 \pm 1.676$  % and re-sensitizing thus NCI-H929 cells to BTZ (Fig. 2c).

As reported above, when RPMI-8226 cells were co-incubated with the same concentration of ET-1, no changes in their proliferation were observed, probably due to the endogenous production of ET-1 by these cells. Furthermore, when BTZ added to the RPMI-8226 cells at the same concentration used for NCI-H929 was as well inactive in accordance to our previous observations that higher concentrations of BTZ are needed to inhibit proliferation of these cells. On the other hand, when RPMI-8226 cells were treated with BQ788 alone, a significant reduction in viability was observed ( $71.259 \pm 1.500$  %) possibly because of the pre-existent greater reliance of the resistant cells on



ET-1/ET<sub>B</sub>R signaling for proliferation (Fig. 2d). Viability was further reduced when the ET<sub>B</sub>R inhibitor was used in combination with BTZ (60.893 ± 1.773 %).

To confirm the role of ET<sub>B</sub>R signaling on the cellular proliferation of RPMI-8226 cells, we knockeddown the

receptor with siRNA and found that viability was again decreased compared to cells transfected with scrambled siRNA (85.6 ± 2.54 %). ET<sub>B</sub>R-silenced RPMI-8226 cells showed enhanced susceptibility to chemotherapy with BTZ, to an extent similar to that obtained by the combination of

**Fig. 2** Suppression of ET-1/ET<sub>B</sub>R pathway by blockade or silencing of the ET<sub>B</sub>R enhances the inhibitory effects of BTZ re-sensitizing MM cells to the drug. **a, b** Sensitivities of myeloma cell lines to BTZ. Growth curves of RPMI-8226 (**a**) and NCI-H929 (**b**) cells treated with various concentrations of BTZ (0.3125–100 nM) for 24 h in the absence or presence of BQ788 (only for RPMI8226, BQ788 pretreatment 0.1 μM for 30 min). Results are expressed as percentage of cells in treated versus untreated cultures. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments each one performed in triplicate ( $p < 0.05$ ). Standard deviations were generally less than 10 %. **c, d** Proliferation of NCI-H929 (**c**) and RPMI-8226 (**d**) cell lines treated in the absence or presence of ET<sub>B</sub>R antagonist (BQ788, 0.1 μM for 30 min), ET-1 (100 nM for 48 h) and BTZ (2 nM for 24 h). **e** Proliferation of RPMI-8226 cells transfected with scramble siRNA or ET<sub>B</sub>R-specific siRNA either in the absence (control) or in the presence of BTZ (2 nM for 24 h). All data represent mean values ± SD of three independent experiments each one performed in triplicate.  $p < 0.05$ ; \*vs CTL, \*vs BTZ or BQ788, \*\*vs ET-1 + BTZ, \*\*vs ET-1

the ET<sub>B</sub>R antagonist BQ788 and BTZ ( $68.1 \pm 1.96$  %) (Fig. 2c). To confirm further whether ET<sub>B</sub>R blockade might sensitize RPMI-8266 cells to BTZ-mediated inhibition of proliferation, cells pretreated with the BQ788 antagonist at the concentration of 0.1 μM were subsequently exposed to increasing concentrations of BTZ, as mentioned above. In agreement with the results above, the pretreatment of cells with BQ788 resulted in increased susceptibility of RPMI-8226 cells to BTZ (IC<sub>50</sub> value 2 nM, Fig. 2a). These experiments showed that ET<sub>B</sub>R blockade or silencing could restore drug sensitivity in a BTZ-resistant cell line, improving the drug's inhibitory effect.

Interestingly, blockade of the ET<sub>A</sub>R receptor by the BQ123 peptide did not affect the proliferation in multiple myeloma cell lines in any tested conditions, suggesting that ET<sub>A</sub>R may not be a critical mediator of the effects of ET-1 in the MM cells (Supplementary Fig. S3).

Our data point out that ET-1 could act as an autocrine/paracrine regulator and exerts its effects on cell growth, specifically through ET<sub>B</sub>R receptor, suggesting that the ET-1/ET<sub>B</sub>R axis could be a promising target to enhance the anti-myeloma efficacy of BTZ.

### ET-1 affects proteasome activity in MM cells

Searching for potential molecular mechanisms of the heterogeneous anti-proliferative response to BTZ among different cell lines, we assayed the basal proteasome activity of the two HMCLs, namely RPMI-8226 and NCI-H929. In line with previous reports regarding lymphoid cells (Goldberg et al. 2002), chymotryptic activity accounted for 80 % and the caspase-like activity accounted for only 2 % of all proteasome-specific activity in the MM cell lines. We therefore evaluated the chymotryptic-like proteasome activity (ChT-L) catalyzed by the β5 subunit. The basal levels of proteasome activity were consistently found to be 30 %

higher in the BTZ-resistant RPMI-8226 cells, as compared to the BTZ-sensitive NCI-H929 cell line (Fig. 3a).

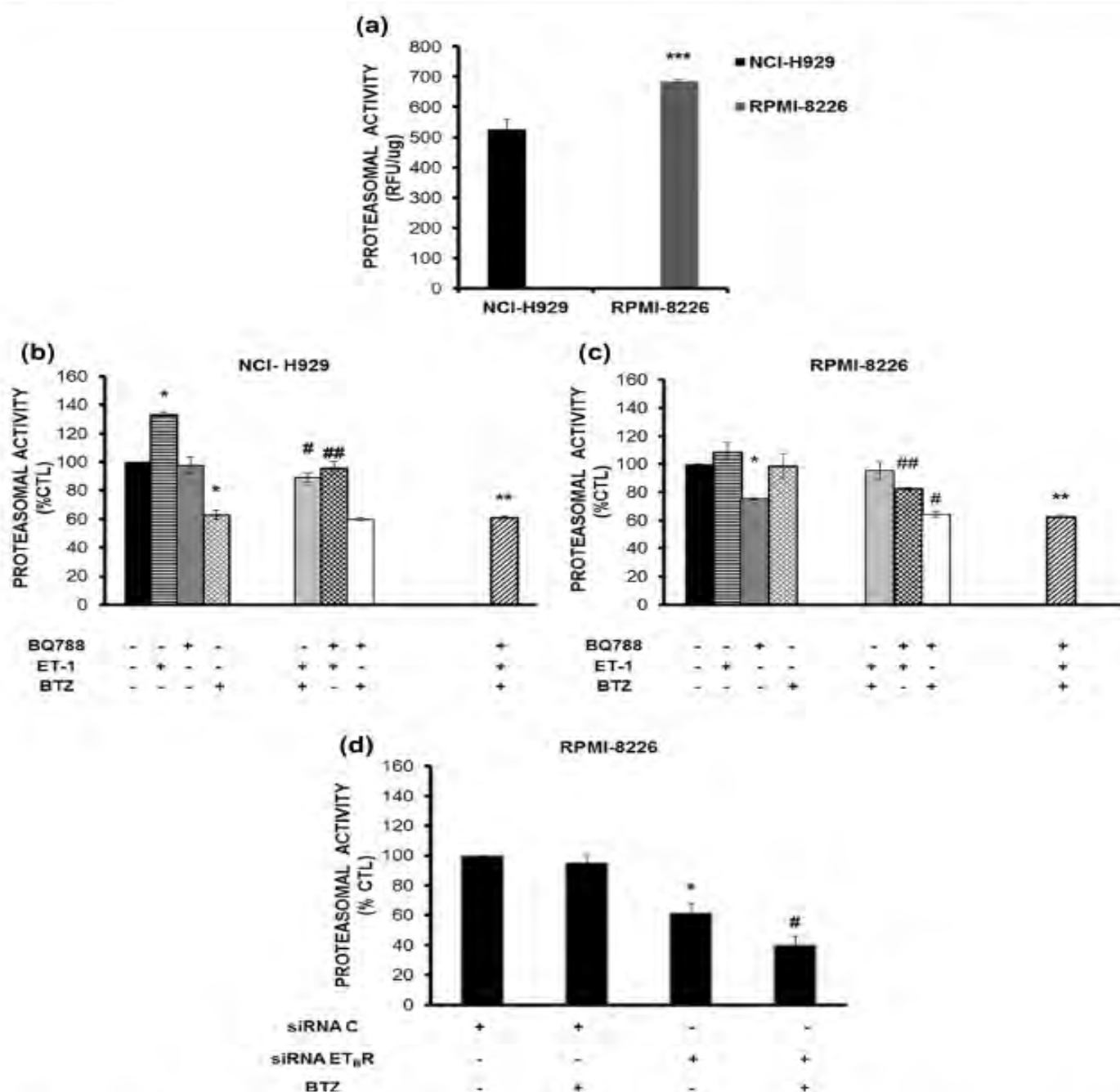
We next studied the effects of BTZ on proteasome activity in both MM cell lines, exposing cells to the same concentration of BTZ as in the proliferation studies. In order to define the optimum incubation time with the drug, we initially performed a series of proteasomal activity assays at different time points (30, 60 and 120 min). We subsequently observed that 30 min exposure to 2 nM BTZ was sufficient to achieve a significantly high degree of proteasome inhibition in the sensitive NCI-H929 cells as compared to the untreated ( $62.963 \pm 3.145$  %, Fig. 3b). However, when the RPMI-8226 cells were treated with BTZ, proteasome activity levels did not change as compared to the control (untreated) cells ( $98.657 \pm 9.032$  %, Fig. 3c). These findings support the hypothesis that the effects of BTZ on cell growth could be attributed to differences in the proteasome activity of the two MM cell lines. This suggests that different myelomas may show different levels of proteasome activity, which could be a potential molecular mechanism that leads to variable susceptibility to BTZ.

In a step further toward unraveling the mechanism by which ET-1 could exert its protective effect in MM cells against BTZ-induced inhibition of cell growth, we explored the impact of ET-1 on the UPS pathway in MM cells. We first performed time-course proteasomal activity assays to determine the optimal incubation time with ET-1 (30, 60 and 120 min). We then challenged the BTZ-sensitive NCI-H929 cell line with BTZ in the presence or not of ET-1. The incubation of NCI-H929 cells with 100 nM of recombinant human ET-1 for 2 h in the absence of BTZ induced a ~30 % increase in proteasome activity as compared to the untreated cells ( $133.223 \pm 5.771$  %, Fig. 3b), resulting thus in similar proteasome activity level as that of the resistant cell line. Also, we found that ET-1 could attenuate the effect of BTZ. As shown in Fig. 3b while BTZ alone decreased the proteasome activity levels down to  $62.96 \pm 3.145$  %, the addition of ET-1 in the treatment schedule could counteract the drug effect inducing an increase in proteasome activity of up to  $89.076 \pm 4.742$  %.

Finally, exposure of RPMI-8226 cells to 100 nM ET-1 for 2 h did not have any effect ( $108.794 \pm 6.543$ ) on the levels of proteasomal activity whatsoever (Fig. 3c).

### ET<sub>B</sub>R blocking restores the BTZ effect on the UPS pathway

After observing that ET-1 may affect the response of NCI-H929 MM cells to BTZ, we next sought to address ET<sub>B</sub>R's involvement on sensitizing these cells to the drug. In line with the results on cell proliferation, treatment of cells with BQ788 alone had no effect on the ChT-L activity of proteasome ( $97.631 \pm 5.771$  %, Fig. 3b). However, treatment



**Fig. 3** ETR-1 reduces the sensitivity to BTZ-mediated inhibition of proteasome 20S activity. Blockade or silencing of ET<sub>B</sub>R receptor helps to overcome resistance to BTZ. **a** Baseline proteasome-specific activity in NCI-H929 (left) and RPMI-8226 (right) cells. Each point represents a mean ± SD of three independent experiments each performed in triplicate. *p* < 0.05; \*\*\*vs NCI-H929. **b, c** Levels of proteasome activity in NCI-H929 (**b**) and RPMI-8226 (**c**) cells in the absence or presence of ETR antagonists (BQ788, 0.1 μM for

30 min), ET-1 (100 nM for 2 h) and BTZ (2 nM for 30 min). **d** Levels of proteasome activity in RPMI-8226 cells transfected with CTL siRNA or ET<sub>B</sub>R siRNA either untreated (control) or treated with BTZ (2 nM for 30 min). Relative fluorescence units (RFU) normalized to micrograms of total protein, and data are expressed as relative to untreated control cells. Each column represents the mean ± SD of at least three independent experiments each one performed in duplicate. *p* < 0.05; \*vs CTL, #vs BTZ or BQ788, \*\*vs ET-1 + BTZ, ##vs ET-1

with BQ788 was able to restore NCI-H929 cells' sensitivity to BTZ-mediated inhibition of proteasome activity in the presence of ET-1 ( $61.181 \pm 0.953$  vs.  $89.076 \pm 4.742$  %, Fig. 3b).

Unlike NCI-H929 though and consistent with the proliferation data of the BTZ-resistant RPMI-8226 cell line, treatment with  $0.1 \mu\text{M}$  of the  $\text{ET}_B\text{R}$  antagonist BQ788 alone for 30 min resulted in a slight but statistically significant ( $p < 0.05$ , Fig. 3c) decrease in the level of proteasome activity ( $75.162 \pm 3.528$ ), possibly because of the greater dependence of the resistant cells on ET-1/ $\text{ET}_B\text{R}$  signaling, which as shown seems to be already activated in these cells. Additionally, the combination of both BQ788 and BTZ was more effective, increasing significantly the degree of proteasome inhibition ( $65.817 \pm 2.689$ ), reaching the BTZ sensitivity levels of NCI-H929 cell line ( $64.233 \pm 2.012$ ). Notably knockdown of  $\text{ET}_B\text{R}$  in RPMI-8226 attenuated the levels of proteasome activity to an extent even greater to that obtained by the BQ788 antagonist alone ( $61.6 \pm 6.2$ ). Finally, and most importantly, upon co-treatment of  $\text{ET}_B\text{R}$  knockdown RPMI-8226 cells with BTZ the reduction of the proteasome activity levels was more pronounced compared to that observed by pretreatment of cells with BQ788 ( $40.257 \pm 5.6$  vs.  $65.817 \pm 2.689$ , Fig. 3d).

In order to exclude that some of the observed differences between the cell lines simply stem from the increased amount of dead or dying sensitive NCI-H929 cells, we also performed proliferation and proteasome activity experiments for RPMI-8226 using the specific  $\text{IC}_{50}$  of BTZ for this cell line (i.e.  $5 \text{ nM}$ ). As it can be seen in supplementary Fig. S4, treatment with the  $\text{ET}_B\text{R}$  antagonist again potentiated the drug-mediated effect on viability and proteasome activity, suggesting that the blockade of  $\text{ET}_B\text{R}$  may effectively result in restoring sensitivity to BTZ.

Overall, these data suggest that the constitutive activation of the ET-1/ $\text{ET}_B\text{R}$  signaling may be associated with increased proteasome activity at steady state and a, subsequently, lower sensitivity to BTZ in MM cells.

#### Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is involved in ET-1/ $\text{ET}_B\text{R}$ -induced BTZ resistance in MM cells

To provide further insight about the molecular mechanisms by which ET-1 and  $\text{ET}_B\text{R}$  activation contribute to BTZ resistance, we sought to assess the activation of signal transduction pathways and effectors downstream the ET-1 receptors. Previous data have established a relationship between pro-survival signaling initiated by ET-1 and activation of Akt and MAPK pathways (Bagnato and Natali 2004a, b; Nelson et al. 2005; Osman et al. 2006; Wu-Wong et al. 2000). Both of these signal transduction molecules

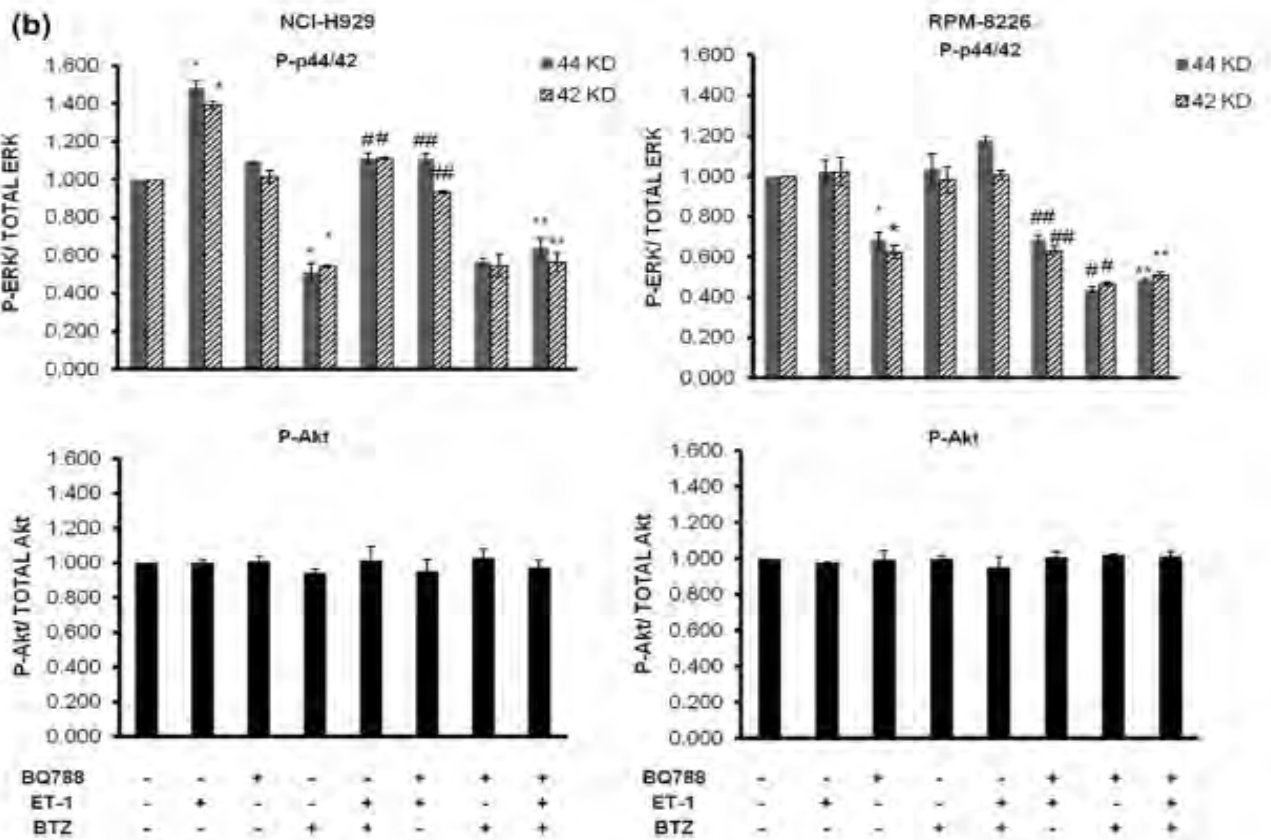
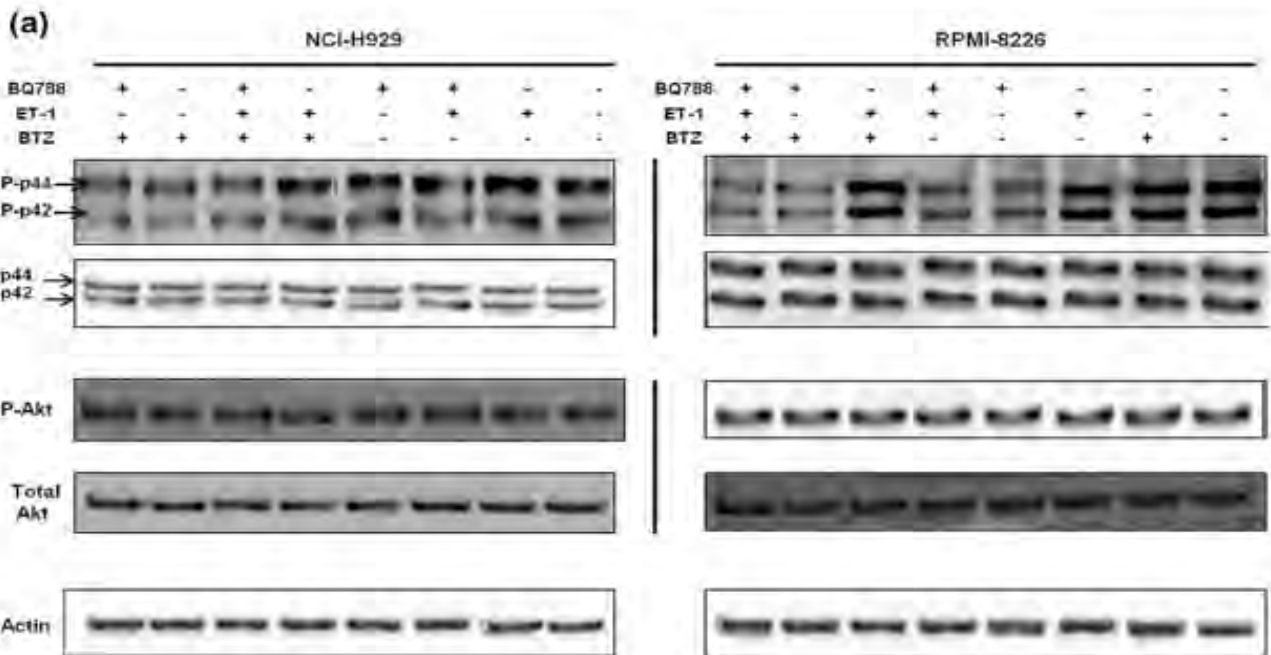
have also been shown to play important functions in the growth and survival of MM cells (Ge and Rudikoff 2000; Qiang et al. 2002). Subsequently, we focused our attention on these two signal transduction pathways.

Based on previous data demonstrating that ET-1 induced drug resistance in myeloma cells through the UPS pathway, we evaluated the ET-1/ $\text{ET}_B\text{R}$ -induced signaling pathways triggering UPS-mediated BTZ resistance initially using the in vitro model of the BTZ-sensitive, NCI-H929 cell line. As illustrated in Fig. 4a, b, regarding the MAPK pathway, when cells were stimulated with  $100 \text{ nM}$  ET-1 alone we detected a significant increase in phosphorylation of p44/42 kinases (Erk1/2) as compared to the untreated control ( $1.488 \pm 0.034$  and  $1.395 \pm 0.016$  for the p44 and p42 kinases, respectively). In the presence of BTZ, we found that ET-1 could abrogate the BTZ-induced decrease of Erk1/2 phosphorylation levels, with an increase from  $0.510 \pm 0.048$  (p44) and  $0.544 \pm 0.007$  (p42) in BTZ-treated MM cells to  $1.111 \pm 0.029$  (p44) and  $0.937 \pm 0.005$  (p42) in cells treated with ET-1 + BTZ, respectively. Again, blocking  $\text{ET}_B\text{R}$  reversed the ET-1-mediated BTZ resistance, restoring sensitivity to the drug ( $0.640 \pm 0.050$  and  $0.565 \pm 0.049$  for the p44 and p42 kinases, respectively).

Unlike NCI-H929 cells the pretreatment of the resistant RPMI-8226 cells with the  $\text{ET}_B\text{R}$  antagonist BQ788 alone resulted in a significant reduction of the Erk1/2 phosphorylation as compared to the untreated control ( $0.684 \pm 0.041$  and  $0.624 \pm 0.034$  for p44 and p42 kinases, respectively). Phosphorylation and thus activation of Erk1/2 were even more significantly attenuated in the presence of both BQ788 and BTZ ( $0.438 \pm 0.015$  and  $0.467 \pm 0.010$  for p44 and p42 kinases, respectively), suggesting that blocking  $\text{ET}_B\text{R}$  could drastically enhance BTZ-induced effects (Fig. 4a, b).

In an effort to study the impact of the PI3K/Akt/mTOR pathway, we checked the Akt phosphorylation downstream of PI3K. PIP3K generates phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, a lipid second-messenger essential for the translocation of Akt to the plasma membrane where it is phosphorylated and activated by phosphoinositide-dependent-kinase-1 and possibly other kinases (Testa and Bellacosa 2001). Western blot analysis revealed that Akt basal constitutive phosphorylation was not modified and levels remained stable compared to untreated cells in the two studied cell lines when exposed to the same conditions used above for the analysis of the MAPK pathway (Fig. 4a, b).

In parallel and in an effort to confirm these results, we carried out western blots to analyze the phosphorylation state of p70S6K which is a direct downstream target of mTORC1 in the PI3K/Akt/mTOR pathway, and thus a



**Fig. 4** ET-1 induces activation of the MAPK pathway via the ET<sub>B</sub>R, whereas the PI3K/Akt pathway is not affected. NCI-H929 (*left*) and RPMI-8226 (*right*) cells either untreated or stimulated with ET-1 (100 nM, 2 h) followed by incubation with 2 nM BTZ for an additional 30 min. For the blockade of the ET<sub>B</sub>R, cells were pretreated for 30 min with 0.1 μM of the ET<sub>B</sub>R antagonist BQ788 prior ET-1 to be added in the cultures and cells were further incubated as described above. **a** Equivalent amounts of cell lysates were separated by SDS-PAGE, then immunoblotted with anti-phospho p44/42 and anti-phospho-Akt antibodies. Equal loading was determined using b-actin. **b** Histograms showing the densitometric ratios of phospho-p44/42 and phospho-Akt versus total p44/42 and total Akt, respectively. Both phospho- and total proteins were normalized to b-actin. Data are presented as mean ± SD of two independent experiments relatively to unstimulated control cell cultures. *p* < 0.05; \*vs CTL, \*\*vs ET-1 + BTZ, #vs BTZ or BQ788, ##vs ET-1

surrogate marker of mTORC activity (DeYoung et al. 2008; Fingar et al. 2002). Consistent with the previously obtained results of Akt, the constitutive phosphorylation state of p70S6K remained stable compared to untreated cells (data not shown).

These data suggest that the MAP kinase signaling pathway may be the most important pathway downstream of ET<sub>B</sub>R that mediates ET-1 protective signals, indicating a possible interplay between the ET-1/ET<sub>B</sub>R, MAPK and UPS pathways.

## Discussion

The proteasome inhibitor bortezomib represents a significant advance in the therapeutic armamentarium against multiple myeloma. However, resistance to BTZ is not uncommon (Shuqing and Wang 2013; Oerlemans et al. 2008), constituting an important obstacle toward achieving better clinical results. Thus, novel approaches to enhancing the sensitivity of MM cells to BTZ are still in great need.

The neuropeptide endothelin-1 exerts its biological actions through at least two major G-protein-coupled receptor subtypes ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R (Simonson and Dunn 1990). Although the ET-1 axis has been deeply examined in solid tumors (Kusuhara et al. 1990; Shichiri et al. 1991; Nakamuta et al. 1993; Kojima and Nihei 1995; Nelson et al. 1996; Shankar et al. 1998; Bagnato et al. 1999), little is known about its role in hematological malignancies. Only recently, Maffei et al. (2014) demonstrated a role of ET-1 signaling via ET<sub>A</sub>R in chronic lymphocytic leukemia B cells (CLL) pathobiology, by prolonging survival, proliferation and drug resistance and suggesting that the ET-1/ET<sub>A</sub>R axis may represent a novel therapeutic target in CLL.

At first, since there has been no investigation of the ET-1 axis in MM, we provide new evidence that both ET<sub>A</sub>R and

ET<sub>B</sub>R receptors are expressed in human myeloma cells, using as models two established and well-characterized human MM cell lines, the NCI-H929 and RPMI-8226 (Gomez-Bougie et al. 2007; Zhou et al. 2008; Balsas et al. 2009; Descamps et al. 2009). We have herein confirmed the differential sensitivity of these cells to BTZ, with RPMI-8226 being more resistant as compared to the NCI-H929. In these cell lines using anti-ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R-antibodies, we identified immunoreactive bands at about 49 kDa and 48, 49 and 59 kDa, respectively. There have been numerous reports of different molecular weights for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors ranging between 32 and 70 kDa with similar apparent molecular weights to what we have found (Masuda et al. 1989; Kondoh et al. 1990; Bednar et al. 1991; Shannon and Hale 1994; Takasura et al. 1994; Freedman et al. 1997; Kurokawa et al. 1997). The apparent differences in reported molecular weights could be attributed to the source of antibody, tissue specificity, posttranslational modifications, result of difference in vivo proteolytic processing or ultimately the result of inaccuracy inherent in the estimation of the molecular weight of membrane proteins by SDS-PAGE (Zhang et al. 2003a). In particular, the 49 kDa band of ET<sub>A</sub>R corresponds to isoform 1 and the 48, 49 and 59 kDa bands of ET<sub>B</sub>R to the respective isoforms A, B and C that are produced by alternative splicing and are expressed in a variety of human tissues (Adachi et al. 1991; Cyr et al. 1991; Sakamoto et al. 1991; Elshourbagy et al. 1996; Miyamoto et al. 1996; Tsutsumi et al. 1999).

Densitometric analysis revealed that unlike ET<sub>A</sub>R expression where levels were the same in the two MM cell lines, the RPMI-8226 cell line expressed about 30 % higher levels of the ET<sub>B</sub> receptor. Additionally, under the experimental conditions used in this study it seems that the two MM cell lines differ in that RPMI-8226 produce/secrete higher levels of ET-1 as compared to the NCI-H929, which displayed practically no detectable levels of ET-1. The latter is in accordance with other reports demonstrating that ET-1 is undetectable in unstimulated B and T lymphocytes or neutrophils and in cell lines of hematological malignancies (Ehrenreich et al. 1990; Kondo et al. 1992; Kusuhara et al. 1990; Yamaguchi et al. 2007).

Since we found that the major components of the ET-1 axis are present in MM cells and that the expression of ET<sub>B</sub> receptor and ET-1 production/secretion was different in the two MM cell lines, we further investigated whether endothelin-1 signaling could possibly be associated with a BTZ-resistant phenotype, as the two cell lines at the same time show differential sensitivity to BTZ. To this end, we initially challenged the two cell lines with BTZ in the presence or not of ET-1 and evaluated its effects on cell proliferation. Under the experimental condition tested herein,



ET-1 in addition to the BTZ-sensitive NCI-H929 cells was found to enhance the proliferation rate of the cells either alone or more importantly in the presence of BTZ, inducing a BTZ-resistant phenotype to the otherwise BTZ-sensitive NCI-H929 cells. This suggests that addition of exogenous ET-1 could protect sensitive cells against BTZ-induced inhibition of cell growth. Unlike NCI-H929 cells, ET-1 had no effect whatsoever in RPMI-8226 BTZ-resistant cells. The fact that ET-1 shows no effect on RPMI-8226 could be attributed to a possible autocrine role of ET-1 in this cell line due to the production/secretion of endogenous ET-1 by the cells.

Having showing that ET-1 may induce resistance to BTZ in human MM cells, our next aim was to shed some light on the mechanism by which ET-1 protection of MM cells could occur. The use of ET-receptor chemical antagonists that could specifically inhibit either ET<sub>A</sub>R or the ET<sub>B</sub>R under the concentrations used herein revealed that the effect of ET-1 toward the acquisition of a BTZ-resistant phenotype most probably is mediated by ET<sub>B</sub>R. Indeed, the pretreatment of NCI-H929 with the selective ET<sub>B</sub>R antagonist BQ788 could counteract the effect of ET-1 and re-establish sensitivity to BTZ, unlike the BQ123 (selective ET<sub>A</sub>R antagonist) compound. Additionally, when BTZ-resistant RPMI-8226 cells were treated with the BQ788 alone, a reduction in the growth rate was observed while BQ788 was found to act synergistically with BTZ resulting to an even greater reduction of the growth rate, thus enhancing the drugs' inhibitory effect. The results on RPMI-8226 were additionally confirmed by knockingdown the expression of the ET<sub>B</sub>R using a specific siRNA molecule. Overall, our findings suggest that blocking ET<sub>B</sub>R with the selective antagonist BQ788 could restore sensitivity to BTZ, suggesting that ET-1 may trigger protective signals on MM cells and that these effects may be at least partially mediated by ET<sub>B</sub>R.

Earlier studies have shown that increased basal proteasome activity was related to resistance to proteasome inhibitor treatment in lung and breast cancer cell lines (Codony-Servat et al. 2006; Voortman et al. 2007), while Bianchi et al. (2009) demonstrated that PI-sensitive HMCLs displayed significantly lower chymotryptic activity, expressed significantly lower levels of immunocatalytic subunits and thus a smaller proteasome complement, which accounts for reduced proteasome activity. In line with these previous reports, our data demonstrated 30 % higher proteasome activity at the steady state in the BTZ-resistant RPMI-8226 cells as compared to the sensitive NCI-H929 cells.

Investigating further potential molecular correlates of the protective role of ET-1 against BTZ-mediated anti-proliferative effects, we investigated whether there is any relationship between the ET-1/ET<sub>B</sub>R axis and the UPS pathway in MM, by evaluating the 20S chymotryptic activity of the proteasome upon treatment of the resistant and sensitive

cell lines with BTZ in the presence or absence of ET-1. Our results showed that ET-1 upregulated 20S proteasomal activity by about 30 % in the sensitive NCI-H929 cells, increasing proteasomal activity to similar levels as those observed in the BTZ-resistant RPMI-8226 cells. This could suggest that over activation of UPS might be responsible for the observed attenuation of the BTZ-mediated inhibitory effects in MM. In agreement with the observations on the proliferation of the cells, when the resistant RPMI-8226 cell lines were treated in the presence of BQ788 alone or when the ET<sub>B</sub>R expression was downregulated by specific siRNA, a substantial inhibition of proteasome activity was observed without or with BTZ; co-treatment with the latter resulted in even more pronounced inhibition.

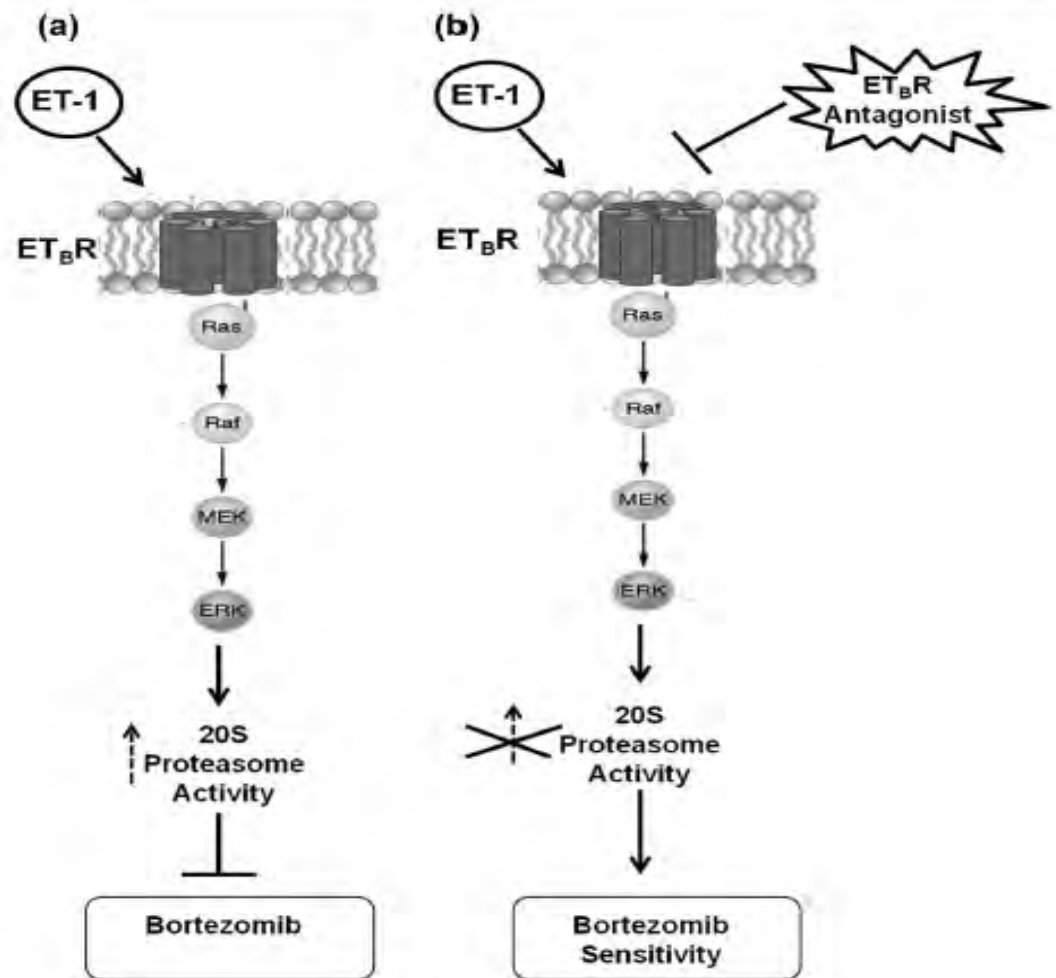
These findings are in agreement with previous studies conducted by our group, demonstrating that ET-1 interacts with the UPS pathway and results in a gradual increase in the activity of the 20S proteasome in a human prostate cancer cell line (Patrikidou et al. 2012; Tsapakidis et al. 2012). Addition of the ET<sub>B</sub>R antagonist completely neutralized the protective effects of ET-1, re-sensitizing the cells to the BTZ, suggesting that the ET-1 axis is associated with the UPS pathway through ET<sub>B</sub>R triggering in MM.

Previous reports suggest that Akt and MAPK pathways play important role in the growth and survival of MM cells (Ge and Rudikoff 2000; Qiang et al. 2002). It has also been reported that mitogen-activated protein kinase (MAPK) is an important mediator in the regulation of ET<sub>B</sub>R expression/activity (Nilsson et al. 2008). Under this prism, we sought to investigate the potential signaling pathway(s) by which the ET-1/ET<sub>B</sub>R axis could lead to BTZ resistance. Under the experimental conditions adopted herein, we observed that BTZ-treatment reduced the phosphorylation of ERK1/2 (and thus its activation) in NCI-H929 cells, but when ET-1 was included in the treatment, the phosphorylation of ERK1/2 was restored. Pretreatment of cells with BQ788 counteracted ET-1 activity, further supporting a potential role of ET<sub>B</sub>R in the activity of ET-1. This hypothesis is further supported by the fact that when resistant RPMI-8226 cells exposed to BQ788 antagonist alone demonstrated a reduction in the Erk1/2 phosphorylation levels as compared to the untreated cells. Combined treatments with BTZ and BQ788 resulted in a more pronounced inhibitory effect on Erk1/2 phosphorylation similar to that achieved with BTZ alone in the sensitive NCI-H929 cell line.

On the contrary, we were not able to observe any changes upon the various treatments to the PI3K/Akt/mTOR pathway. These findings provide evidence that the Raf/MEK/Erk1/2 pathway is a putative link between the ET-1 axis and the development of resistance against BTZ.

To conclude, MM is characterized clinically by a good initial response to therapy, but even patients who achieve a complete remission after standard-dose or high-dose

**Fig. 5** Proposed model of the possible interactions of ET-1/ET<sub>B</sub>R and UPS pathways conferring resistance to BTZ in MM cells. **a** Binding of ET-1 to ET<sub>B</sub>R leads to activation of MAPK signaling pathway, causing upregulation of proteasome 20S chymotryptic activity, thereby promoting BTZ resistance. **b** Blockade of ET<sub>B</sub>R restores the sensitivity to the drug



approaches incorporating BTZ progressively become chemoresistant (Khun et al. 2012). In addition to the important role of the ET-1 axis in several solid tumors, the findings herein highlight for the first time the relevance of ET-1/ET<sub>B</sub>R axis in MM and provide a putative mechanism by which MM cells evade BTZ-mediated inhibitory effects. The data presented herein prompt to validate a model in which the interactions/correlations between the ET-1/ET<sub>B</sub>R axis, the ubiquitin–proteasome system and the MAPK signaling possibly support a key role in regulating the sensitivity of multiple myeloma cells to BTZ (Fig. 5). On this ground, the ability of the ET<sub>B</sub>R selective antagonist to interfere with intrinsic and extrinsic protective signals in MM cells may represent a novel, more efficient potential therapeutic approach of MM that could help to overcome resistance to BTZ therapy in patients with relapsed–refractory MM, leading ultimately to enhanced clinical efficacy.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** All authors declare no conflict of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Informed consent** No human participants were used in this study.

**References**

Adachi M, Yang YY, Furuichi Y, Miyamoto C (1991) Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1265–1272

Adams J (2003) The proteasome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29:3–9

Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I (2000) Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists. *Gut* 47:685–688

Angelova E, Beuvon F, Leonard N, Chaverot N, Varlet P, Couraud PO et al (2005) Functional endothelin ETB receptors are

- selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain Res Mol Brain Res* 137:77–88
- Bagnato A (2012) The endothelin axis as therapeutic target in human malignancies: present and future. *Curr Pharm Des* 18:2720–2733
- Bagnato A, Natali PG (2004a) Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* 2:16
- Bagnato A, Natali PG (2004b) Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treat Res* 119:293–314
- Bagnato A, Rosano LE (2008) The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1443–1451
- Bagnato A, Tecce R, Moretti C et al (1995) Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1:1059–1066
- Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ (1997) Activation of mitogenic signaling by endothelin-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 57:1306–1311
- Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra A, Venuti A, Natali PG (1999) Expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res* 59:720–727
- Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R et al (2004) Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* 64:1436–1443
- Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J (2011) Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 163:220–233
- Balsas P, Lopez-Royuela N, Galan-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J (2009) Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochem Pharmacol* 77:804–812
- Bednar DL, Stein RB, Garsky VM, Williams DL (1991) The bovine endothelin receptor has an apparent molecular weight of 43,000. *Biochem Biophys Acta* 1092:226–232
- Berger Y, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L (2006) Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp Biol Med* 231:1111–1119
- Bergsagel PL, Kuehl WM (2005) Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23:6333–6338
- Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F et al (2009) The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* 113:3040–3049
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Sefior E et al (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406:536–540
- Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M et al (2006) Differential and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:665–675
- Conner TM, Doan QD, Walters IB, LeBlanc AL, Beveridge RA (2008) An observational retrospective analysis of retreatment with bortezomib for multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 8:140–145
- Cyr C, Huebner K, Druck T, Kris R (1991) Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ETA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 181:184–190
- De Giorgio L, Tazzari PL, Barbara G et al (1998) Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. *J Neuroimmunol* 82:175–181
- Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosano L, Triscioglio D, Spinella F, Bagnato A (2002) Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol* 61:524–532
- Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ (2001) Expression of the endothelin B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 438:485–491
- Descamps G, Gomez-Bougie P, Venot C, Moreau P, Amiot M (2009) A humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody (AVE1642) enhances bortezomib-induced apoptosis in myeloma cells lacking CD45. *BJC* 100:366–369
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 22:239–251
- Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS et al (1990) Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. *J Exp Med* 172:1741–1748
- Elshourbagy NA, Adamou JE, Gagnon AW, Wu HL, Pullen M, Nambi P (1996) Molecular characterization of a novel human endothelin receptor splice variant. *J Biol Chem* 271:25300–25307
- Ferone D, Hafland LJ, Colao A, Lamberts SWJ, van Hagen PM (2001) Neuroendocrine aspects of immunolymphoproliferative diseases. *Ann Oncol* 12:125–130
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Gene Dev* 16:1472–1487
- Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS et al (2006) Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24:4867–4874
- Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ (1997) Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors: evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem* 272:17734–17743
- Ge NK, Rudikoff S (2000) Insulin-like growth factor 1 is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 96:2856–2861
- Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39:147–164
- Gomez-Bougie P, Willeme-Tpumi S, Menoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, Bataille R, Amiot M (2007) Noxa up-regulation and McI-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res* 67:5418–5424
- Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I, Loizidou M (2007) Mechanisms of endothelin-1 stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg* 94:106–112
- He S, Dibas A, Yorio T, Prasanna G (2007) Parallel signaling pathways in endothelin-1-induced proliferation of U373MG astrocytoma cells. *Exp Biol Med* 232:370–384
- Helleman J, Smid M, Jansen MP, van der Burg ME, Berns EM (2010) Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. *Gynecol Oncol* 117:170–176
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–479
- Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC (2011) Mechanisms of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological basis of synergy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 10:2034–2042
- Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M (1992) In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(Suppl 12):S11–S14
- Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T et al (1994) Biochemical

- and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4892–4896
- Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R (2003) Velcade: US FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* 8:508–513
- Khun DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, Davis RA et al (2012) Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in pre-clinical models of multiple myeloma. *Blood* 120:3260–3270
- Kogner P, Ericsson A, Barbany G et al (1992) Neuropeptide Y (NPY) synthesis in lymphoblasts and increased plasma NPY in pediatric B-cell precursor leukaemia. *Blood* 80:1324–1329
- Kojima K, Nihei Z (1995) Expression of endothelin-1 immunohistochemistry in breast cancer. *Surg Onc* 4:309–315
- Kondo M, Ishida N, Kobayashi M, Mitsui Y (1992) Secretion of endothelin-1 in human endothelial cell line but not in B cell line by transfection of preproendothelin-1 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1134:242–246
- Kondoh M, Miyazaki H, Watanabe H, Shibata T, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K (1990) Isolation of anti-endothelin receptor monoclonal antibodies for use in receptor characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 172:503–510
- Kumar S, Rajkumar SV (2008) Many facets of bortezomib resistance/susceptibility. *Blood* 112:2177–2178
- Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S, Ichihara A (1990) Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7071–7075
- Kurokawa K, Yamada H, Ochi J (1997) Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol* 389:348–360
- Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzuki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 50:3257–3261
- Lahav R (2005) Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 49:173–180
- Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, Martinelli S, Castelli I et al (2014) Endothelin-1 promotes survival and chemoresistance in Chronic Lymphocytic leukemia B Cells through ETA receptor. *PLoS ONE* 9:e98818
- Masuda Y, Miyazaki H, Kondoh M, Watanabe H, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K (1989) Two different forms of endothelin receptors in rat lung. *FEBS Lett* 257:208–210
- Miyamoto Y, Yoshimasa T, Arai H, Takaya K, Ogawa Y, Itoh H, Nakao K (1996) Alternative RNA splicing of the human endothelin-A receptor generates multiple transcripts. *Biochem J* 313:795–801
- Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harousseau J-L (2012) Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120:945–959
- Nakamuta M, Ohashi M, Tabata S, Tanabe Y, Goto K, Naruse M et al (1993) High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 88:248–252
- Nelson JB (2009) Endothelin receptors as therapeutic targets in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol Suppl* 8:20–28
- Nelson B, Chan-Tack K, Hedicani P, Magnuson R, Opgenorth T, Bova G et al (1996) Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 56:663–668
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 3:110–116
- Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR (2005) Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* 7:631–637
- Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, Ugander M, Ingemansson R, Edvinsson L et al (2008) PKC and MAPK signaling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *Eur J Pharmacol* 580:190–200
- Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG et al (2008) Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112:2489–2499
- Osman I, Dai J, Mikhail M et al (2006) Loss of neutral endopeptidase and activation of protein kinase B (Akt) is associated with prostate cancer progression. *Cancer* 107:2628–2636
- Papandreou CN, Usmani B, Geng Y et al (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4(1):50–57
- Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri R-M, Destouni C, Apostolou E, Daliani D, Papandreou CN (2011) Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NFκB/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 11:1–13
- Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri RM, Destouni C, Apostolou E, Papandreou CN (2012) Neuropeptide inducible upregulation of proteasome activity precedes nuclear factor kappa B activation in androgen independent prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* 12:31
- Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S (2002) Insulin-like growth factor I signalling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates and pathway cross-talk. *Blood* 99:4138–4146
- Rajkumar SV (2009) Multiple myeloma. *Curr Probl Cancer* 33:7–64
- Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2005) Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 23:630–639
- Reddy N, Czuczman MS (2010) Enhancing activity and overcoming chemoresistance in hematologic malignancies with bortezomib: preclinical mechanistic studies. *Ann Oncol* 21:1756–1764
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348:2609–2617
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW et al (2005) Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 352:2487–2498
- Rosano L, Spinella F, Bagnato A (2013) Endothelin-1 in cancer: biological implication and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 13:637–651
- Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T (1991) Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178:656–663
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al (2008) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 359(9):906–917
- Seece DE (2007) Management of multiple myeloma: the changing landscape. *Blood Rev* 21:301–314
- Shankar A, Loizidou M, Aliev G, Fredericks S, Holt D, Boulous B et al (1998) Raised endothelin 1 levels in patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg* 85:502–506
- Shannon TR, Hale CC (1994) Identification of a 65 kDa endothelin receptor in bovine cardiac sarcolemmal vesicles. *Eur J Pharm* 267:233–238
- Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F (1991) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 87:1867–1871
- Shipp MA, Look AT (1993) Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 84:1052–1070

- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Steins H, Sundays ME, Reinherz EL (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10662–10666
- Shuqing Lu, Wang Jianmin (2013) The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res* 1:13
- Simonson M, Dunn M (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4:2989–3000
- Smollich M, Wulfig P (2007) The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. *Curr Vasc Pharmacol* 5:239–248
- Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A (2003) Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278:41294–41301
- Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A (2004) Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10:4670–4679
- Takasura T, Sakurai T, Goto K, Furuichi Y, Watanabe T (1994) Human endothelin receptor ETB. *J Biol Chem* 269:7509–7513
- Tamkus T, Leece C, Gallo K, Madhukar BV, Dimitrov N (2011) Endothelin-1/endothelin A receptor signaling in breast cancer, poster session 2. *Cancer Res* 71(24 Suppl): Abstract nr P2-03-06
- Testa JR, Bellacosa A (2001) AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10983–10985
- Tsapakidis K, Vlachostergios PJ, Voutsadakis JA, Befani CD, Patrikidou A, Hatzidaki E, Daliani DD, Moutzouris G, Liakos P, Papandreou CN (2012) Bortezomib reverses the proliferative and antiapoptotic effect of neuropeptides on prostate cancer cells. *Int J Urol* 19:565–574
- Tsutsumi M, Liang G, Jones PA (1999) Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 228:43–49
- Voortman J, Checinska A, Giaccone G (2007) The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer* 6:73
- Warzocha K, Kraj M, Poglod R, Kwasniak B (2008) Bortezomib in multiple myeloma: treatment and retreatment. A single center experience. *Acta Pol Pharm* 65:753–756
- Wolf J, Richardson PG, Schuster M, Blanca Le, Walters IB, Battelman DS (2008) Utility of bortezomib retreatment in relapsed or refractory multiple myeloma patients: a multicenter case series. *Clin Adv Hematol Oncol* 6:755–760
- Wu-Wong JR, Chiou WJ, Wang J (2000) Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 293:514–521
- Xu GW, Ali M, Wood TE, Wong D, Maclean N, Wang X, Gronda M, Skrtic M, Li X, Hurren R, Mao X, Veukatesan M, Beheshti Zavareh R, Ketela T, Reed JC, Rose D, Moffat J, Batey RA, Dhe-Paganon S, Schimmer AD (2010) The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma. *Blood* 115:2251–2259
- Yamaguchi E, Yamanoi A, Ono T, Nagasue N (2007) Experimental investigation of the role of endothelin-1 in idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 22:1134–1140
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccob Sh et al (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108:2020–2028
- Zhang X, Krishnamoorthy RR, Prasanna G, Narayan S, Clark A, Yorio T (2003a) Dexamethasone regulates endothelin-1 and endothelin receptors in human non-pigmented ciliary epithelial (HNPE) cells. *Exp Eye Res* 76:261–272
- Zhang YM, Wang K-Q, Zhou G-M, Zuo J, Ge J-B (2003b) Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1. *Acta Pharmacol Sin* 24:563–568
- Zhou L, Hou J, Fu W, Wang D, Yuan Z, Jiang H (2008) Arsenic trioxide and 2-methoxyestradiol reduce  $\beta$ -catenin accumulation after proteasome inhibition and enhance the sensitivity of myeloma cells to bortezomib. *Leuk Res* 32:1674–1683
- Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD (2009) The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia* 23(11):1941–1956