

Justyna Sidor-Kaczmarek



**OCENA WPŁYWU INHIBITORÓW PROTEASOMÓW
NA KOMÓRKI LINII AMELANOTYCZNEJ (AB)
CZERNIAKA BOMIRSKIEGO**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Janusz Moryś

Zakład Anatomii i Neurobiologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2013 r.

Składam serdeczne podziękowania:

*Panu Profesorowi Januszowi Morysiowi za
cierpliwość, nieocenioną pomoc oraz wszelkie rady w
trakcie realizacji pracy.*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Anatomii
i Neurobiologii za mobilizację, wsparcie i wspianą
atmosferę.*

*Pani Sylwii Scisłowskiej za pomoc w przygotowaniu
rycin.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	8
1.1. CZERNIAK.....	8
1.2. CZERNIAK PRZESZCZEPIALNY CHOMIKA– CHARAKTERYSTYKA LINII AB.....	10
1.3. UKŁAD UBIKWITYNA – PROTEASOMY	11
1.3.1. Proteasom – miejsce degradacji ubikwitynowanych białek	12
1.4. INHIBITORY PROTEASOMÓW – CHARAKTERYSTYKA CHEMICZNA.....	14
1.4.1. Inhibitory peptydowe.....	15
1.4.2. Inhibitory niepeptydowe.....	17
1.5. MECHANIZMY DZIAŁANIA INHIBITORÓW PROTEASOMÓW I ICH WPŁYW NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE.....	18
1.5.1. Indukcja apoptozy pod wpływem inhibitorów proteasomów	19
1.5.2. Wpływ inhibitorów proteasomów na cykl komórkowy komórek nowotworowych	24
1.6. MECHANIZMY OPORNOŚCI NA DZIAŁANIE INHIBITORÓW PROTEASOMÓW	25
1.6.1. Rola białek HSP w oporności na inhibitory proteasomów.....	26
1.7. LECZENIE CZERNIAKA.....	28
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. MATERIAŁ	30
3.1.1. Zwierzęta	30
3.1.2. Komórki linii Ab czerniaka przeszczepialnego chomika.....	30
3.1.3. Inhibitory proteasomów.....	31
3.1.4. Inhibitor kaspaz	31
3.2. METODY	32
3.2.1. Ocena aktywności proteasomów metodą luminescencyjną.....	32
3.2.2. Badanie żywotności komórek z użyciem XTT.....	32
3.2.3. Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny.....	33
3.2.4. Ocena zmian apoptotycznych w błonie komórkowej – eksternalizacja fosfatydyloseryny	34
3.2.5. Analiza zmian morfologicznych chromatyny jądrowej.....	36
3.2.6. Ocena aktywacji kaspazy 9 i 3 oraz ekspresji białek HSP metodą immunoblottingu	36
3.2.7. Analiza uwalniania cytochromu C i AIF z mitochondriów za pomocą barwień immunofluorescencyjnych.....	37
3.2.7.1. Barwienie cytochromu C	38
3.2.7.2. Barwienie białka AIF	38
3.2.7.3. Analiza jakościowa barwień immunofluorescencyjnych	39
3.2.8. Analiza statystyczna	39
4. WYNIKI	41
4.1. INHIBITORY PROTEASOMÓW HAMUJĄ AKTYWNOŚĆ CHT-L PROTEASOMÓW W KOMÓRKACH AB.....	41
4.2. INHIBITORY PROTEASOMÓW ZMNIEJSZAJĄ ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK AB	43
4.3. INHIBITORY PROTEASOMÓW POWODUJĄ ŚMIERĆ KOMÓREK AB NA DRODZE APOPTOZY	47

4.3.1. Kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jąder komórkowych.....	47
4.3.2. Apoptotyczne zmiany w błonie komórkowej.....	49
4.3.3. Aktywacja kaspazy 3	52
4.4. INHIBITORY PROTEASOMÓW INDUKUJĄ W KOMÓRKACH AB SZLAK MITOCHONDRIALNY APOPTOZY	52
4.4.1. Aktywacja kaspazy 9	52
4.4.2. Uwalnianie cytochromu C z mitochondriów	54
4.4.3. Uwalnianie białka AIF z mitochondriów	56
4.5. ŚMIERĆ KOMÓREK AB POD WPLYWEM INHIBITORÓW PROTEASOMÓW ODBYWA SIĘ CZĘŚCIOWO NA DRODZE APOPTOZY KASPAZONIEZALEŻNEJ	58
4.5.1. Inhibitor kaspaz BAF hamuje spadek żywotności komórek	58
4.5.2. Inhibitor kaspaz BAF hamuje apoptotyczne zmiany w błonie komórkowej..	59
4.5.3. Inhibitor kaspaz BAF hamuje fragmentację jąder komórkowych.....	61
4.6. INHIBITORY PROTEASOMÓW NIE ZATRZYMUJĄ CYKLU KOMÓRKOWEGO KOMÓREK AB.....	63
4.6.1. Inhibitor kaspaz BAF hamuje akumulację komórek we frakcji subG1.....	66
4.7. INHIBITORY PROTEASOMÓW INDUKUJĄ EKSPRESJĘ BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO (HSP) W KOMÓRKACH AB	69
5. DYSKUSJA.....	71
5.1. WPLYW INHIBITORÓW PROTEASOMÓW NA ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK AB	71
5.2. INDUKCJA APOPTOZY W KOMÓRKACH AB POD WPLYWEM INHIBITORÓW PROTEASOMÓW	74
5.3. INDUKCJA SZLAKU MITOCHONDRIALNEGO APOPTOZY W KOMÓRKACH AB POD WPLYWEM INHIBITORÓW PROTEASOMÓW	77
5.4. UDZIAŁ APOPTOZY KASPAZONIEZALEŻNEJ W ŚMIERCI KOMÓREK AB WYWOŁANEJ INHIBITORAMI PROTEASOMÓW	79
5.5. ZMIANY CYKLU KOMÓRKOWEGO KOMÓREK AB POD WPLYWEM INHIBITORÓW PROTEASOMÓW	80
5.6. INDUKCJA EKSPRESJI BIAŁEK HSP W KOMÓRKACH AB POD WPLYWEM INHIBITORÓW PROTEASOMÓW	83
6. WNIOSKI	86
7. STRESZCZENIE	87
8. PIŚMIENNICTWO	88

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ab	linia amelanotyczna czerniaka przeszczepialnego chomika (czerniaka Bomirskiego)
AIF	czynnik indukujący apoptozę (ang. <i>apoptosis inducing factor</i>)
aktywność ChT-L	aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu (ang. <i>ChymoTripsin-Like</i>)
aktywność T-L	aktywność trypsynopodobna proteasomu (ang. <i>Trypsin-Like</i>)
aktywności C-L	aktywność kaspazopodobna proteasomu (ang. <i>Caspase-Like</i>)
APAF-1	czynnik-1 aktywujący proteazy apoptotyczne (ang. <i>apoptosis protease activating factor 1</i>)
BAF	ogólny inhibitor kaspaz Boc-D-FMK
CDK	kinazy cyklinozależne (ang. <i>cyclin-dependent kinases</i>)
CP 20S	rdzeń proteasomu (ang. <i>core particle</i>) o stałej sedymentacji 20S
cyt C	cytochrom C
G0, G1, S, G2, M	fazy cyklu komórkowego
HSP	białka szoku termicznego (ang. <i>heat shock proteins</i>)
IP	inhibitor proteasomów
PI	jodek propidyny (ang. <i>propidium iodide</i>)
poli-Ub	łańcuch poliubikwityny
PS	fosfatydyloseryna (ang. <i>phosphatidylserine</i>)
RP 19S	kompleks regulatorowy proteasomu (ang. <i>regulatory particle</i>) o stałej sedymentacji 19S
Ub	ubikwityna
UPS	układ ubikwityna-proteasomy (ang. <i>ubiquitin-proteasome system</i>)

1. WSTĘP

1.1. Czerniak

Czerniaka po raz pierwszy opisał francuski lekarz René Laennec przedstawiając swoje obserwacje na wykładzie w Faculté de Médecine de Paris w 1804, a następnie publikując je w 1806 roku. Jest to nowotwór złośliwy wywodzący się z melanocytów, wyspecjalizowanych komórek syntetyzujących i wydzielających brązowy barwnik – melaninę. Najczęściej występuje w obrębie skóry, naczyńówki oka oraz błon śluzowych [Ruka 2005; Krzakowski 2006].

Według światowych statystyk liczba zachorowań na czerniaka skóry stale wzrasta. Za najważniejsze czynniki zwiększonego ryzyka uznaje się: działanie promieniowania ultrafioletowego (szczególnie w dzieciństwie), stałe drażnienie mechaniczne lub chemiczne oraz niską zawartość barwnika w skórze (jasne włosy, oczy oraz jasny fototyp skóry) [Ruka 2009, Kyrgidis 2010, Alekseenko 2010]. Najwięcej zachorowań odnotowuje się w Australii (ok. 40–60 zachorowań na 100 000 mieszkańców rocznie) wśród ludności o jasnej karnacji pochodzącej z Europy, a najmniej w Chinach, Indiach i Japonii (od 0,2 do 0,6 zachorowań na 100 000 mieszkańców rocznie) [Ruka 2005, Wolnicka-Głubisz 2007]. Istnieją również predyspozycje genetyczne, ponieważ około 10-13% czerniaków to formy rodzinne [Ruka 2009, Ko 2010].

W Polsce czerniaki występują względnie rzadko - standaryzowany współczynnik zachorowalności w 2009 roku wyniósł około 4,5/100 000, co odpowiada rocznie około 1200 zachorowaniom u mężczyzn i niecałym 1400 u kobiet [Krajowy Rejestr Nowotworów, Didkowska 2011]. Czerniaki są jednak nowotworami o największej dynamice wzrostu liczby zachorowań. W Polsce w ostatnich dwudziestu latach liczba zachorowań zwiększyła się 3-krotnie [Ruka 2009].

Uważa się, że za transformację nowotworową melanocyta odpowiadają spontaniczne mutacje genetyczne oraz uszkodzenia DNA powstałe pod wpływem czynników środowiskowych, z których najważniejsze jest promieniowanie UV. Dlatego też jasny fototyp skóry i skłonność do oparzeń słonecznych zwiększają ryzyko zachorowania na czerniaka skóry [Krzakowski 2006, Alekseenko 2010, von Thaler 2010]. Jednak, jak w przypadku większości nowotworów, oprócz czynników środowiskowych do powstania czerniaka skóry przyczyniają się spontaniczne mutacje niektórych genów oraz sekwencji regulatorowych DNA [Hanahan 2011, Bennett 2008]. Dokładna molekularna droga przekształcenia melanocyta w komórkę nowotworową nie jest jeszcze znana. Nie

wszystkie czerniaki zawierają takie same mutacje, ale niektóre z nich pojawiają się częściej niż inne. Najczęściej spotykane zmiany w DNA można podzielić w zależności od wpływu na komórkę na (1) mutacje przełamujące wyciszenie proliferacyjnej komórki; (2) mutacje zwiększające tempo proliferacji; (3) mutacje hamujące przebieg apoptozy. Najczęściej ulegający uszkodzeniom gen w czerniaku skóry (80-90% przypadków) to *CDKN2A*, który koduje inhibitory kinaz cyklinozależnych (CDK) hamujących podziały komórkowe. Większość czerniaków wykazuje również mutacje aktywujące genów *BRAF* (50-70%) lub *NRAS* (15-25%), które prowadzą do przyspieszenia proliferacji. Wśród mutacji hamujących przebieg apoptozy najczęściej występują mutacje inaktywujące działanie genu *APAF-1* (42%), co uniemożliwia aktywację kaspazy 9 [Bennett 2008, Kyrgidis 2010, Ko 2010, Takata 2009, Dahl 2007]. Innym czynnikiem przyczyniającym się do zahamowania apoptozy jest też obserwowana w czerniakach aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB oraz nadekspresja białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 (Bcl-2 i Mcl-1) [Kyrgidis 2010]. Kolejnym rodzajem mutacji zwiększającej oporność komórki na apoptozę jest nadmierna aktywacja białek szoku termicznego HSP70 i HSP27 obserwowana w niektórych czerniakach [Schmitt 2006, Carta 2005].

W przeciwieństwie do wielu innych nowotworów, w czerniaku rzadko stwierdza się mutacje najbardziej znanego supresora nowotworów – białka p53. Tylko 9% przypadków wykazuje obniżenie jego aktywności [Bennett 2008, Dahl 2007].

Czerniaki różnią się między sobą zawartością melaniny, czyli stopniem melanizacji. Zmiany nowotworowe mogą przybierać różne barwy od czarnej, przez brązową aż do białej. Spośród wszystkich czerniaków złośliwych około 2-8% klasyfikuje się jako amelanotyczne, to znaczy takie, które zawierają bardzo mało lub wcale nie zawierają melaniny [Adler 1997, Wain 2008, Moloney 2011]. W większości przypadków są to przerzuty, gdzie 35 do 60% to formy amelanotyczne, choć zdarzają się również amelanotyczne czerniaki pierwotne [Kapila 1991, Wain 2008]. Z powodu trudności diagnostycznych czerniak amelanotyczny wykrywany jest często w zaawansowanym stadium, co przekłada się na krótszy czas przeżycia. Jednak za gorsze niż w przypadku formy melanotycznej rokowanie, niezależnie od późniejszej diagnozy, odpowiadają też cechy biologiczne czerniaka amelanotycznego. Dowiedziono, że amelanizacji czerniaka u ludzi towarzyszy przyspieszenie podziałów komórkowych [Cheung 2012], a w modelach zwierzęcych również szybszy wzrost guza [Cichorek 2006¹]. W konsekwencji utratę melaniny najczęściej uważa się za objaw mniejszego zróżnicowania morfologicznego

czerniaka, a jak wiadomo obniżenie zróżnicowania nowotworu podnosi jego złośliwość i wiąże się ze złym rokowaniem.

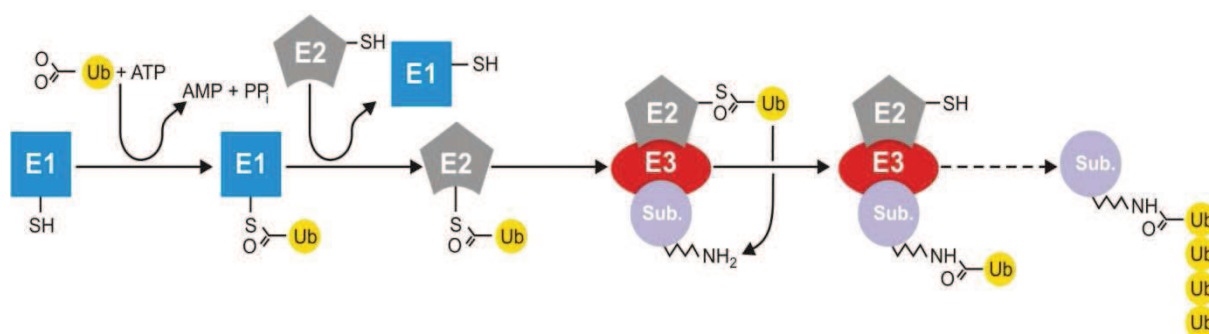
Właściwie we wszystkich przypadkach czerniaków amelanotycznych w ich komórkach wykrywa się obecność tyrozynazy – enzymu odpowiedzialnego za syntezę melaniny [Cheung 2012]. Tyrozynaza jest jednak zatrzymywana w formie niedojrzałej w siateczce wewnątrzplazmatycznej lub aparacie Golgiego i nie dociera do miejsc syntezy melaniny - melanosomów. Niedojrzała forma enzymu jest też szybciej degradowana przez proteasomy [Halaban 1997, Halaban 2002].

1.2. Czerniak przeszczepialny chomika– charakterystyka linii Ab

Wobec trudności z uzyskaniem materiału badawczego od ludzi przydatnym narzędziem w badaniach nad czerniakiem są modele zwierzęce. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły modele oparte na gryzoniach - myszach i chomikach [Becker 2010]. Model przeszczepialnego czerniaka chomika (zwany czerniakiem Bomirskiego) został opracowany przez Bomirskiego i wsp. w 1977 roku. Ze spontanicznie powstałego czerniaka skóry w hodowli chomików złocistych wyprowadzono dwie główne linie: melaniczną nazwaną Ma oraz amelanotyczną oznaczoną Ab [Bomirski 1977]. W badaniach podstawowych szczególnie cenna jest forma amelanotyczna Ab, która pozwala analizować tę stosunkowo rzadko występującą u ludzi ale bardzo agresywną postać czerniaka. Linia Ab powstała z linii Ma, gdy ta samoistnie straciła zdolność syntezy melaniny [Bomirski 1988]. Utrata barwnika świadczy o zmniejszeniu stopnia zróżnicowania komórek czerniaka, co łączy się z szybszą proliferacją, zwiększoną złośliwością nowotworu i wcześniejszą śmiercią obarczonych nim chomików, w porównaniu z linią melaniczną Ma [Bomirski 1988]. Późniejsze prace Cichorek i wsp. wskazują na obniżoną zdolność do spontanicznej apoptozy komórek linii Ab w porównaniu z macierzystą formą melaniczną [Cichorek 2006¹, Cichorek 2006²], a jednocześnie dowodzą, że linia ta jest znacznie bardziej wrażliwa na apoptozę indukowaną kamptotecyną [Cichorek 2006², Kozłowska 2002, Cichorek 2007]. Ponieważ amelanizacja czerniaka wiąże się z obniżeniem poziomu syntezy i sekrecji melaniny, dowiedziono że komórki linii Ab wydzielają do środowiska zewnętrznego mniej białek niż komórki linii Ma [Wachulska 2005].

1.3. Układ ubikwityna – proteasomy

Degradacja białek komórkowych (proteoliza) to wysoce złożony i ściśle kontrolowany proces, który zapewnia homeostazę i reguluje wiele funkcji komórki. Podstawowym jego elementem jest układ ubikwityna-proteasomy (ang. *ubiquitin-proteasome system*, UPS), który odpowiada za degradację około 80% białek w komórce [Crawford 2011]. Proteolizie w proteasomach ulegają wyłącznie białka ubikwitynowane, to jest z dołączoną cząsteczką ubikwityny. Ubikwityna (Ub) jest ewolucyjnie bardzo konserwatywnym polipeptydem występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych. W procesie ubikwitynacji cząsteczka Ub o masie 8,5kDa składająca się z 76 aminokwasów zostaje kowalencyjnie związana z białkiem substratowym, co stanowi oznakowanie białka jako przeznaczonego do degradacji. Białko z dołączoną cząsteczką Ub jest szybko rozpoznawane i trawione przez proteasom. Przyłączenie Ub katalizowane jest przez cykliczne działanie enzymów nazywanych E1, E2 oraz E3 (ryc.1). W pierwszym etapie Ub jest aktywowana przez enzym E1, tzw. enzym aktywujący ubikwitynę. W zależnej od ATP reakcji powstaje produkt pośredni E1-Ub. Kolejny produkt pośredni E2-Ub powstaje w wyniku przeniesienia aktywowanej Ub jest na enzym koniugujący E2. Na końcu enzym koniugujący E2 we współpracy z enzymem E3 zwanym ligazą ubikwityny przenosi cząsteczkę Ub na białko substratowe. W ten sposób powstaje wiązanie izopeptydowe między C-końcem cząsteczki Ub a jedną z reszt lizyny białka substratowego [Mayer 2005, Huang 2008, Bubko 2010, Nagy 2010, Shi 2010].



Ryc. 1. Proces ubikwitynacji białka.

Poprzez ubikwitynację układ UPS kontroluje czas trwania w komórce kluczowych białek regulatorowych, a co za tym idzie wpływa na wiele istotnych procesów komórkowych, takich jak cykl komórkowy, apoptoza, regulacja transkrypcji, naprawa DNA oraz prezentacja antygenów [Mayer 2005, Crawford 2011].

Badania procesu degradacji białek i roli układu UPS zapoczątkowali w latach 70. XX wieku Aaron Ciechanover, Avram Hershko oraz Irwin Rose. Jako pierwsi zauważyli, że proteoliza komórkowa wymaga nakładu energii w postaci ATP, musi to więc być proces specyficzny i wymagający regulacji [Ciechanover 1978]. W kolejnych pracach autorzy udowodnili, że proteolizy nie dokonuje jedna proteaza lecz cały kompleks białkowy złożony z wielu podjednostek oraz opisali mechanizm ubikwitynacji białek [Ciechanover 1980, Hershko 1980, Hershko 1998]. Wagę tych odkryć potwierdziła przyznana badaczom w 2004 roku Nagroda Nobla w dziedzinie chemii.

1.3.1. Proteasom – miejsce degradacji ubikwitynowanych białek

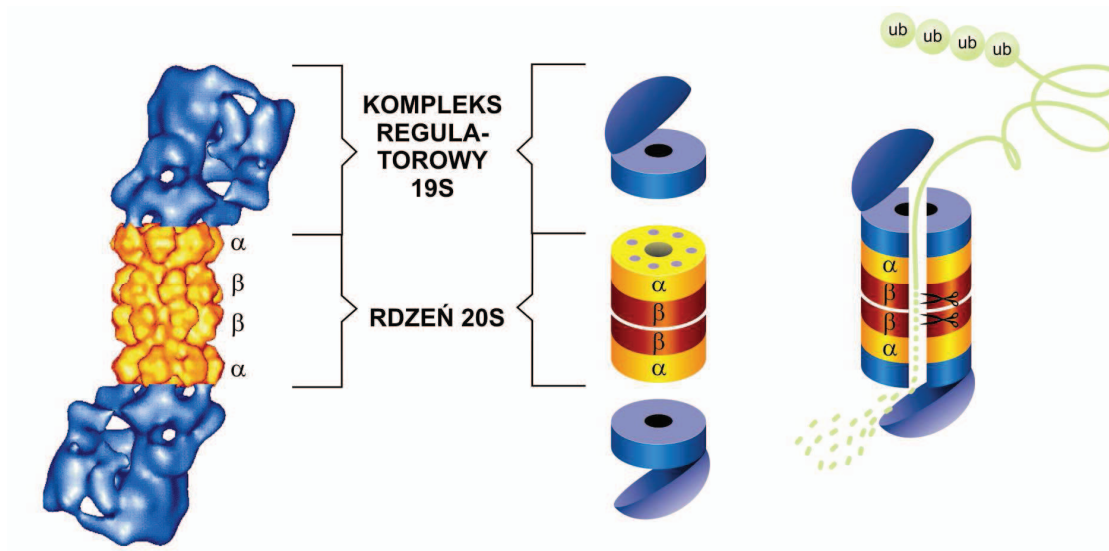
Ubikwitynowane białka są rozpoznawane przez białkowy kompleks katalityczny zwany proteasomem, który degradowuje je do peptydów o długości 8-12 aminokwasów [Rockel 2008].

Proteasom został po raz pierwszy wyizolowany z wołowych przysadek mózgowych przez Rechsteina i współpracowników w 1986r i opisany jako duża ATP-zależna proteaza zasadowa [Hough 1986]. Dwa lata później, w 1988 roku, Goldberg scharakteryzował jego aktywność enzymatyczną i zaproponował nazwę proteasom [Arrigo 1988].

Proteasom jest dużym kompleksem enzymatycznym zbudowanym z ponad 40 różnych łańcuchów polipeptydowych. Kompleks proteasomu o stałej sedymentacji 26S i masie około 2,5MDa (proteasom 26S) składa się z dwóch części: kompleksu regulatorowego o stałej sedymentacji 19S (*ang. regulatory particle, RP 19S*) oraz rdzenia o stałej sedymentacji 20S (*ang. core particle, CP 20S*) (ryc. 2). Kompleks regulatorowy 19S rozpoznaje i rozwija poliubikwitynowane białka, natomiast rdzeń 20S posiada aktywność proteolityczną i odpowiada za degradację białek substratowych [Kisselev 2001, Mayer 2005, Kim 2011²].

W komórkach eukariotycznych rdzeń 20S zbudowany jest z 28 podjednostek należących do dwóch typów: α i β . Podjednostki tego samego rodzaju tworzą heptametry o kształcie pierścienia. Rdzeń składa się z czterech pierścieni. Dwa identyczne wewnętrzne pierścienie zbudowane są z siedmiu różnych podjednostek β ($\beta_1 - \beta_7$) każdy, a dwa identyczne zewnętrzne z siedmiu różnych podjednostek α ($\alpha_1 - \alpha_7$). Czwartorzędowa struktura proteasomu może więc być opisana jako $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ [Mayer 2005, Kim 2011²], a jego kształt przypomina pusty w środku cylinder (ryc. 2). Nieaktywne katalitycznie

pierścienie α tworzą zakończenia cylindra, natomiast proteolityczne centra aktywne zlokalizowane są w dwóch wewnętrznych pierścieniach β na N-końcach podjednostek β_1 , β_2 oraz β_5 . Do wnętrza rdzenia prowadzi wąski kanał utworzony w zewnętrznych pierścieniach α , przez który mogą przejść tylko rozwinięte polipeptydy. N-końce podjednostek α tworzą rodzaj bramki, która kontroluje przejście substratu przez kanał.



Ryc. 2. Budowa proteasomu.

W komórkach eukariotycznych miejsca aktywne rdzenia proteasomu zlokalizowane są w podjednostkach β_1 , β_2 oraz β_5 , po 3 w każdym pierścieniu wewnętrznym. Miejsca te różnią się specyficznością substratową:

- podjednostka β_5 posiada aktywność „chymotrypsynopodobną” (ang. *ChymoTripsin-Like*, ChT-L) i hydrolizuje łańcuch polipeptydowy za resztami hydrofobowymi;
- podjednostka β_2 wykazuje aktywność „trypsynopodobną” (ang. *Trypsin-Like*, T-L) i przeprowadza hydrolizę polipeptydów za resztami zasadowymi;
- podjednostka β_1 o aktywności „kaspazopodobnej” (ang. *Caspase-Like*, C-L) hydrolizuje polipeptydy za resztami kwasowymi [Kisselev 2001, Rockel 2008, de Bettignies 2010].

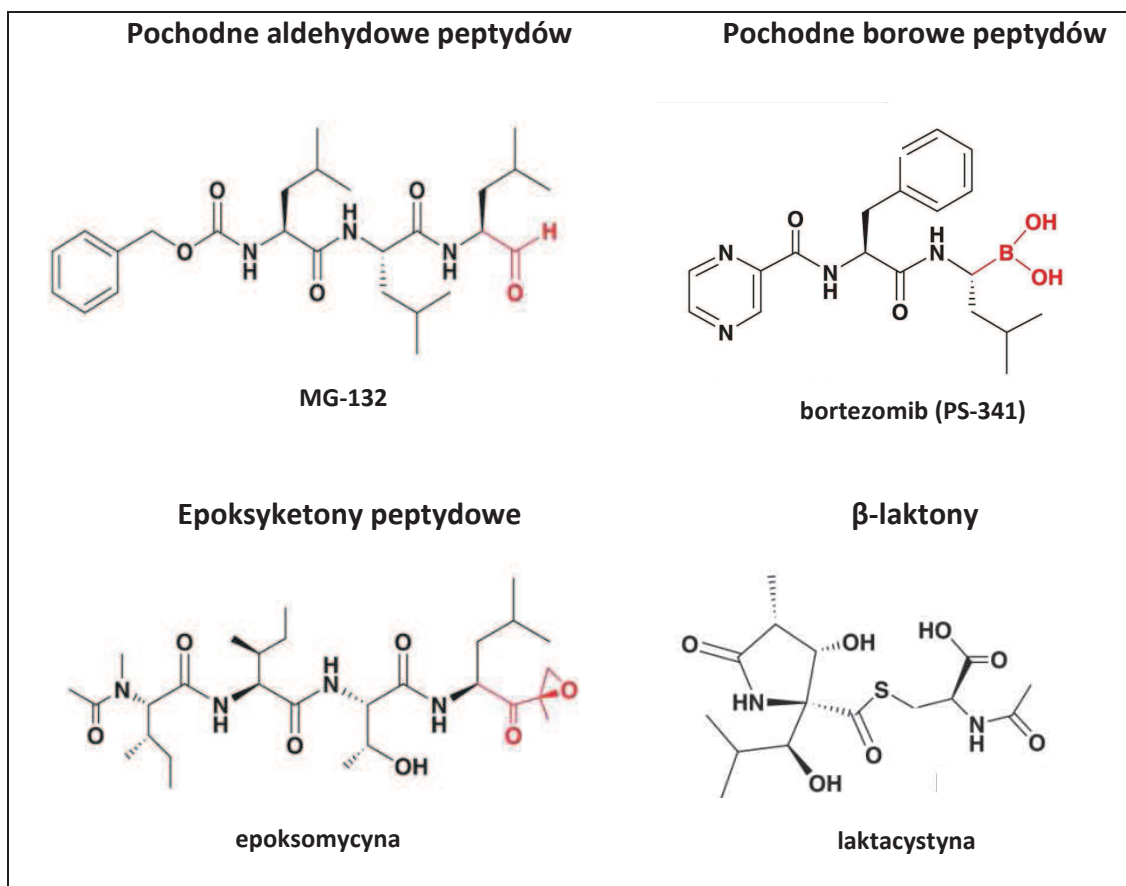
1.4. Inhibitory proteasomów – charakterystyka chemiczna

Od wczesnych latach dziewięćdziesiątych, kiedy to zidentyfikowano proteasomy jako enzymy odpowiedzialne za degradację ubikwitynowanych białek [Hough 1986; Waxman 1987], trwały próby znalezienia specyficznych związków hamujących ich aktywność. W pierwszym okresie poszukiwano inhibitorów do badań podstawowych nad aktywnością katalityczną proteasomów, lecz w miarę odkrywania kluczowej roli układu UPS w funkcjonowaniu komórki, zaczęto rozważać potencjalne zastosowanie tych związków jako leków. Początkowo inhibitory proteasomów (IP) miały służyć zapobieganiu zanikowi białek włókien mięśniowych, które towarzyszy różnym stanom chorobowym. Wkrótce okazało się też, że IP mają silne działanie przeciwnowotworowe. Wczesne prace dowiodły, że wykazują działanie cytotoksyczne *in vitro* w liniach komórkowych białaczek [Imajoh-Ohmi 1995, Shinohara 1996, Drexler 1997] oraz działają przeciwnowotworowo *in vivo* w modelu chłoniaka Burkitta [Orlowski 1998]. W dalszych badaniach okazało się, że IP wywierają efekt cytotoksyczny także na wiele innych rodzajów nowotworów.

Niektóre IP są związkami syntetycznymi, jednak duża ich część, jak na przykład epoksomycyna lub laktacystyna, to naturalne substancje produkowane przez bakterie, które odkrywano w badaniach przesiewowych przy okazji poszukiwania związków o działaniu przeciwnowotworowym [Hanada 1992, Omura 1991]. W oparciu o naturalne substancje syntetyzowano nowe pochodne o zwiększonej sile i swoistości, które kierowano do prób klinicznych. Wynikiem tych poszukiwań była rejestracja w USA jednego z IP, bortezomibu (PS341), w 2003 roku jako leku w terapii szpiczaka mnogiego, a w 2005 w terapii chłoniaka. Obecnie wysiłki badaczy skupiają się na odkryciu lub zsyntetyzowaniu nowych IP o większym spektrum aktywności, lepszym przyswajaniu oraz mniejszych efektach ubocznych [de Bettignies 2010].

Chociaż proteasom posiada różne miejsca aktywne, do znacznego obniżenia poziomu degradacji białek wystarczy zahamowanie aktywności chymotrypsynopodobnej (ChT-L). Natomiast inhibicja aktywności trypsynopodobnej (T-L) lub kaspazopodobnej (C-L) tylko nieznacznie zmniejsza poziom proteolizy [Kisselev 2006]. Ponieważ dodatkowo większość inhibitorów aktywności ChT-L to związki hydrofobowe, które znacznie łatwiej wnikają do komórki niż hydrofilowe inhibitory aktywności T-L lub C-L, duża większość z opisanych inhibitorów proteasomów działa przede wszystkim hamując aktywność chymotrypsynopodobną (ChT-L).

Najważniejsze inhibitory proteasomów pod względem struktury chemicznej można podzielić na 5 klas: aldehydowe pochodne peptydów, borowe pochodne peptydów, epoksyketony peptydowe, winylowo-sulfonowe pochodne peptydów, oraz β -laktony [Adams 2004¹, Genin 2010]. Ryc. 3 przedstawia wzory strukturalne przedstawicieli głównych grup IP.



Ryc. 3. Wzory strukturalne przedstawicieli głównych klas chemicznych inhibitorów proteasomów.

1.4.1. Inhibitory peptydowe

Pochodne aldehydowe peptydów

Jest to grupa najwcześniej odkrytych i ciągle w badaniach podstawowych najszerzej stosowanych IP [Rock 1994, Vinitsky 1992].

Aldehydowe pochodne peptydów były już wcześniej dobrze znane jako inhibitory proteaz cysteinowych i serynowych, takich jak katepsyny i kalpajny. Jednak z powodu bardzo reaktywnej aldehydowej grupy funkcyjnej związku te są mało specyficzne i hamują działanie wielu różnych proteaz. Zsyntetyzowano więc analogi o większej specyficzności dla proteasomu, a wśród nich najbardziej znany z tej grupy, MG-132 [Tsubuki 1993].

MG-132 hamuje głównie aktywność ChT-L, łatwo wnika do komórek, ale też szybko oddysocjowuje od proteasomu, ulega utlenianiu i jest wydalany z komórki przez transportery oporności wielolekowej – jest więc inhibitorem odwracalnym [Kisselev 2001; de Bettignies 2010]. Jednak, w przeciwieństwie do innych pochodnych aldehydowych, MG-132 posiada stosunkowo dobrą swoistość dla proteasomu – katepsyny i kalpajny hamuje przy 10-krotnie większym stężeniu.

Pochodne borowe peptydów

Pochodne borowe peptydów jako inhibitory proteasomów zsyntetyzowane zostały przez Adamsa i współpracowników z firmy ProScript Inc., późniejszego Millenium Pharmaceuticals [Adams J 2004²]. Dzięki podstawieniu atomu boru w miejsce grupy aldehydowej, inhibitory tej grupy działają efektywniej i wykazują większą specyficzność dla proteasomu niż pochodne aldehydowe. Pochodne borowe w warunkach fizjologicznych są też łatwo wchłaniane i stabilne metabolicznie, co pozwala stosować je *in vivo* [de Bettignies 2010].

Dzięki połączeniu siły, swoistości i stabilności metabolicznej borowe pochodne peptydów wybrano jako pierwsze do badań klinicznych w terapiach przeciwnowotworowych. Najbardziej znany z tych związków, bortezomib (PS341) po dobrych wynikach prób klinicznych został dopuszczony w roku 2003 w USA do stosowania u ludzi w leczeniu szpiczaka mnogiego, a w 2005 w terapii chłoniaka. Jednak liczne efekty uboczne oraz szybko pojawiająca się oporność na bortezomib skłaniają do poszukiwań IP lepiej dostosowanych do leczenia klinicznego. Obecnie trwają próby kliniczne innego związku z tej grupy – CEP-18770, który w przeciwieństwie do bortezomibu może być podawany doustnie [de Bettignies 2010, Genin 2010].

Epoksyketony peptydowe

Epoksyketony takie jak epksomycyna lub eponemycyna to naturalne związki wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Actinomycetes*. Epksomycyna została zidentyfikowana w 1992 r. przez Hanadę i wsp. jako substancja o działaniu przeciwnowotworowym w badaniach różnych linii nowotworowych *in vitro*, oraz *in vivo* w modelu myszy obarczonych guzem czerniaka B16 [Hanada 1992]. W 1999 Meng i wsp. wykazali, że jej działanie opiera się na hamowaniu aktywności proteasomów. Epksomycyna jest inhibitorem nieodwracalnym i hamuje głównie aktywność ChT-L. Dzięki wyjątkowemu sposobowi blokowania miejsca aktywnego związku z tej grupy to

najbardziej specyficzne spośród wszystkich znanych inhibitorów proteasomów. Jak dotąd nie stwierdzono, aby epoksomycyna hamowała aktywność jakichkolwiek innych enzymów proteolitycznych [Kisselev 2001, de Bettignies 2010].

Wyjątkowa specyficzność epoksyketonów spowodowała, że w oparciu o ich strukturę zaczęto syntetyzować nowe związki o lepszych parametrach farmakokinetycznych. Najbardziej zaawansowane są prace nad carfilzomibem (PR-171), pochodną epoksomycyny która weszła w drugą fazę badań klinicznych w terapii szpiczaka mnogiego [Genin 2010, McCormack 2012].

Winylo-sulfonowe pochodne peptydów

Związki te są syntetycznymi nieodwracalnymi inhibitorami proteasomów. Po wyznakowaniu radioaktywnym izotopem, barwnikiem fluorescencyjnym lub biotyną stosowane są jako związki znakujące miejsca aktywne w badaniach struktury proteasomów w różnych komórkach i tkankach [Kisselev 2001, de Bettignies 2010].

1.4.2. Inhibitory niepeptydowe

Czynnikiem ograniczającym użyteczność inhibitorów peptydowych jest to, że w żywym organizmie mogą być degradowane przez endogenne proteazy. To zainicjowało poszukiwania niepeptydowych inhibitorów proteasomów, które przynajmniej w teorii powinny być bardziej stabilne metabolicznie.

β -laktony

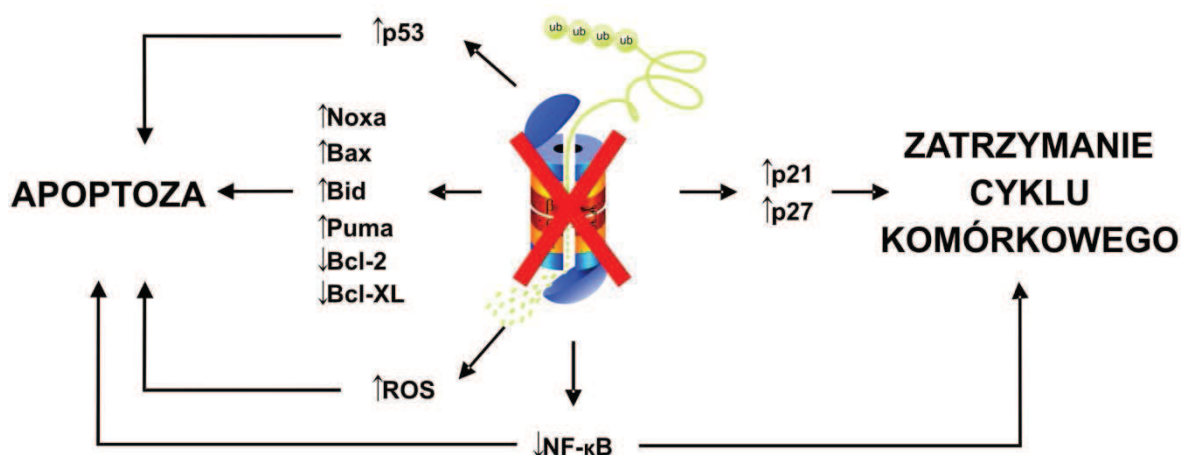
Najszerzej stosowanym inhibitorem z tej grupy jest laktacystyna, substancja naturalnie wydzielana przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Została odkryta przez Omurę i współpracowników w 1991 jako związek powodujący zatrzymanie cyklu komórkowego i indukujący różnicowanie komórek nerwowych. W 1995 Fenteany i wsp. opisali jej działanie jako nieodwracalnego inhibitora aktywności Ch-TL proteasomów. Późniejsze badania dowiodły, że *in vitro* związek w tej postaci jest nieaktywny, jednak w neutralnym pH ulega spontanicznej hydrolizie do *klasto*- β -laktanu laktacystyny, zwanego omuralidem [Corey 1999, Dick 1996]. β -laktan nie hamuje działania większości proteaz serynowych, jego selektywność względem proteasomu jest więc znacznie większa niż aldehydów peptydowych, takich jak MG-132 [Kisselev 2001].

Opracowano także odmienny chemicznie lecz strukturalnie podobny do laktacystyny związek, salinosporamid A, znany również pod nazwą marizomib lub NPI-0052, który hamuje nieodwracalnie i z podobną skutecznością wszystkie 3 rodzaje miejsc aktywnych proteasomu [Feling 2003]. Obecnie trwają badania kliniczne NPI-0052 w terapii szpiczaka mnogiego u pacjentów, u których pojawiła się oporność na bortezomib lub inne klasyczne chemioterapeutyki [McConkey 2008, Genin 2010]. Obiecujące wyniki przyniosły też próby kliniczne NPI-0052 w terapii skojarzonej z inhibitorami deacetylazy histonowej u pacjentów z czerniakiem [Millward 2012].

1.5. Mechanizmy działania inhibitorów proteasomów i ich wpływ na komórki nowotworowe

Wybiórcza ubikwitynacja i degradacja białek regulatorowych przez układ UPS jest kluczowa dla kontroli wielu procesów komórkowych, między innymi cyklu komórkowego, apoptozy, naprawy DNA, chemotaksji i angiogenezy. Ta wyjątkowa rola w komórce spowodowała, że proteasomy stały się obiecującym celem terapii przeciwnowotworowych [Adams J 2000, Adams J 2004¹]. Dodatkowo okazało się, że komórki nowotworowe są dużo bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie IP niż komórki prawidłowe, co zapewnia konieczną w terapii selektywność leku wobec nowotworu [Fernandez 2005, Fernandez 2006, Qin 2005, Qin 2006, Nikiforov 2007, Bazzaro 2006, Zanotto-Filho 2012]. Przyczyny tego zjawiska w znacznej mierze pozostają nieznanymi, lecz uważa się, że częściowo może to wynikać ze zwiększonego tempa podziałów komórek nowotworowych, zaburzeń regulacji cyklu komórkowego oraz zwiększonego zapotrzebowania na syntezę nowych białek [McConkey 2008]. Początkowo sądzono, że systemowe podawanie IP będzie się wiązało z ciężkimi efektami ubocznymi spowodowanymi dużą toksycznością. Jednak badania przedkliniczne na gryzoniach i małpach dowiodły, że nawet 80% zahamowanie aktywności proteasomów w prawidłowych komórkach jest dobrze tolerowane [Adams 2002; McConkey 2008].

Do najważniejszych mechanizmów działania cytotoksycznego IP w komórkach nowotworowych należy zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcja apoptozy. Śmierć komórki nowotworowej może nastąpić w wyniku jednoczesnej aktywacji kilku procesów pro-apoptotycznych (ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat działania inhibitorów proteasomów w komórkach nowotworowych.

Warto podkreślić, że IP w różnych rodzajach nowotworów mogą indukować odmienne mechanizmy prowadzące do apoptozy [Crawford 2011, McConkey 2008, Mayer 2005, Frankland-Searby 2012].

1.5.1. Indukcja apoptozy pod wpływem inhibitorów proteasomów

Apoptoza – ogólna charakterystyka procesu

Proces apoptotycznej śmierci komórki został po raz pierwszy zaobserwowany i opisany w 1972 roku w pionierskich badaniach Kerra i wsp. nad niedokrwiennym uszkodzeniem wątroby. Apoptoza inaczej zwana jest programowaną śmiercią komórki, ponieważ wymaga kontrolowanej aktywacji proteaz takich jak kaspazy i innych hydrolaz, które odpowiadają za szybką degradację struktur komórkowych. Zjawisko apoptozy występuje naturalnie w rozwoju płodowym, jest też ważną drogą eliminacji uszkodzonych lub zmutowanych komórek z organizmu. Zaburzenia tego procesu są czynnikiem onkogennym i przyczyniają się do nowotworzenia komórek [Kroemer 2007].

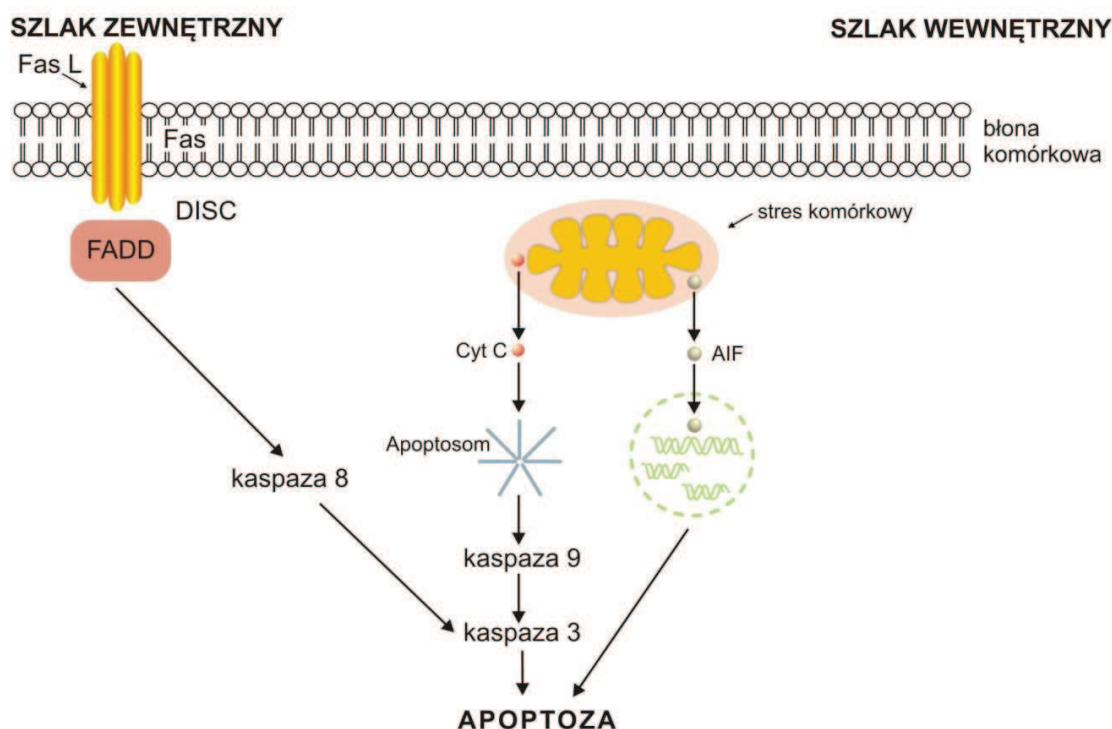
Umierająca w procesie apoptozy komórka podlega zmianom zarówno morfologicznym, jak i biochemicznym [Zhivotovsky 2010]. W przeciwieństwie do nekrozy, gdzie dochodzi do rozerwania błony komórkowej i wywołania odpowiedzi zapalnej, apoptoza zachodzi całkowicie w obrębie komórki z zachowaną błoną komórkową. Na poziomie morfologicznym klasycznymi wyznacznikami komórki apoptotycznej są kondensacja chromatyny jądrowej, obkurczenie cytoplazmy, fragmentacja jądra oraz tworzenie się pęcherzyków błony komórkowej (ang. *membrane blebbing*). Następnie komórka rozpada się na fragmenty otoczone błoną, tak zwane ciała

apoptotyczne. Ostatnim etapem śmierci jest fagocytoza ciałek apoptotycznych przez makrofagi lub sąsiadujące komórki [Vicencio 2008, Zhivotovsky 2010].

Do biochemicznych markerów apoptozy zalicza się aktywację kaspaz oraz zmiany struktury błony komórkowej. Kaspazy są syntetyzowane w komórce jako nieaktywne proenzymy. Ich aktywacja polega na proteolitycznym odcięciu prodomeny i uwolnieniu aktywnych podjednostek p20 i p10 [Kumar 2007, Li 2008]. Natomiast apoptotyczne zaburzenia struktury błony komórkowej polegają na przemieszczeniu fosfatydyloseryny (PS) z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej, co określa się mianem eksternalizacji. Eksternalizacja PS jest sygnałem do fagocytozy przez sąsiednie komórki.

Indukcja apoptozy może przebiegać różnymi drogami. Najważniejsze i najlepiej poznane to szlak zewnętrzny (receptorowy) oraz wewnętrzny (mitochondrialny) (ryc.5). Oba szlaki śmierci apoptotycznej mają trzy kolejne fazy: inicjacji, integracji (decyzji) oraz egzekucji (degradacji). Wczesna faza inicjacji przebiega różnie w zależności od czynnika indukującego apoptozę. W fazie integracji dochodzi do jednoczesnej aktywacji kaspaz i uwolnienia białek proapoptotycznych z mitochondrium. W tym czasie zostaje podjęta ostateczna decyzja o śmierci i komórka przekracza tzw. „punktu bez powrotu”. Późna faza egzekucji jest podobna dla wszystkich dróg apoptozy. W tym czasie aktywowane są procesy wywołujące rozpad komórki i opisane wcześniej zmiany morfologiczne [Kroemer 2007]. Niezależnie od czynnika indukującego, w przebiegu śmierci apoptotycznej niemal zawsze obserwuje się aktywację kaspaz. Kaspazy działają na zasadzie kaskady enzymatycznej, gdzie jeden enzym aktywuje drugi. Ze względu na fazę apoptozy kaspazy dzielą się na inicjatorowe (kaspaza 8 i 9), które aktywują następne kaspazy, oraz efektorowe (kaspaza 3, 6 i 7), które degradują białka komórkowe w późnej fazie apoptozy [Kroemer 2007, Kumar 2007, Li 2008].

Szlak zewnętrzny, receptorowy, apoptozy aktywowany jest w odpowiedzi na sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego komórki. Czynnikiem indukującym jest związanie liganda z jednym z tak zwanych receptorów śmierci. Jest to grupa receptorów powierzchniowych z rodziny TNFR (receptory dla TNF), której najważniejsi przedstawiciele to Fas/CD95, TNFR1, TRAIL-1 i -2. Związanie liganda powoduje przyłączanie się cząsteczek białka adaptorowego np. FADD (ang. *Fas-associating death domain-containing protein*) do domeny wewnątrzkomórkowej receptora i utworzenie kompleksu DISC (ang. *death-inducing signaling complex*), który następnie aktywuje inicjatorową kaspazę 8. Aktywna kaspaza 8 z kolei aktywuje kaspazy efektorowe [Zhivotovsky 2010, Kroemer 2007].



Ryc. 5. Schemat głównych szlaków indukcji apoptozy.

Apoptozę na drodze wewnętrznej, mitochondrialnej, wywołują czynniki pochodzenia wewnątrzkomórkowego. Do aktywacji tej drogi dochodzi w odpowiedzi na różnego rodzaju warunki stresowe w komórce, na przykład uszkodzenie DNA, stres oksydacyjny, wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , nagromadzenie źle zwiniętych białek i wywołany tym stres siateczki wewnątrzplazmatycznej; stres ER. Drogą mitochondrialną często przebiega również apoptoza wywołana substancjami cytotoksycznymi. Kluczowym elementem tego szlaku jest błona mitochondrialna. Czynniki apoptotyczne powodują pośrednio lub bezpośrednio wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej, co prowadzi do obniżenia potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) i uwolnienia do cytoplazmy białek proapoptotycznych takich jak cytochrom C, AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), endonukleaza G, Smac/DIABLO, mi/HtrA2. Cytochrom C, który w warunkach prawidłowych jest częścią łańcucha oddechowego i znajduje się w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, w cytoplazmie łączy się z białkiem APAF-1 (ang. *apoptosis protease activating factor 1*) oraz kaspazą 9 w multimetryczny kompleks zwany apoptosomem. Przyłączenie kaspazy 9, która jest kaspazą inicjatorową szlaku wewnętrznego, do apoptosomu powoduje jej aktywację. Aktywna kaspaza 9 aktywuje z kolei kaspazy efektorowe – głównie kaspazę 3. Obecność cytochromu C w cytoplazmie jest więc niezbędna w przebiegu apoptozy drogą wewnętrzną [Zhivotovsky 2010, Kroemer 2007].

Wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej może spowodować śmierć komórki nawet przy braku aktywnych kaspaz w procesie nazywanym apoptozą kaspazonieależną. W tym przypadku śmierć komórka umiera z powodu nieodwracalnej utraty funkcji oddechowej mitochondriów (katastrofa bioenergetyczna) lub też w wyniku uwolnienia z mitochondriów do cytoplazmy niezależnych od kaspaz białek apoptogennych: AIF i endonukleazy G. Szczególnie ważna jest rola AIF, który w warunkach prawidłowych zlokalizowany jest w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium i bierze udział w fosforylacji oksydacyjnej. W procesie apoptozy przemieszcza się do jądra, gdzie powoduje kondensację chromatyny oraz masową aktywację endonukleaz degradujących komórkowe DNA [Kroemer 2005, Lartigue 2009, Pradelli L 2010].

Jak wspomniano wcześniej, najważniejszym zdarzeniem na wewnętrznej drodze apoptozy jest wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej. Integralność zewnętrznej błony mitochondrium regulowana jest głównie przez białka z rodziny Bcl-2. W rodzinie Bcl-2 znajdują się dwie grupy białek o przeciwnym działaniu. Jedną grupę tworzą białka antyapoptotyczne: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 hamujące apoptozę, a drugą białka proapoptotyczne: Bax, Bak, Bad, Bim, Noxa oraz Puma indukujące proces apoptozy. Bax i Bak to białka efektorowe, które inicjują tworzenie porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i zwiększenie jej przepuszczalności. Pozostałe białka tej rodziny regulują działanie Bak i Bax [Levine 2008, Chipuk 2010, Llambi 2011].

Wpływ inhibitorów proteasomów na apoptozę komórek nowotworowych

Dowodzono, że podobnie jak chemioterapeutyki, inhibitory proteasomów indukują apoptozę w różnych rodzajach komórek nowotworowych, takich jak rak jajnika, glejak, białaczki, szpiczak, rak piersi, rak prostaty, rak wątrobowokomórkowy, rak trzustki, rak jelita grubego oraz czerniak [Bazzaro 2006, Zanotto-Filho 2012, Satou 2004, Baou 2010, Zavrski 2003, An 2000, Keyomarsi 2010, Shirley 2005, Naumann 2012, Baiz 2009, Nawrocki 2002, Ding 2007, Gartel 2012]. Ponieważ układ UPS kontroluje niemalże wszystkie funkcje życiowe komórki potrzebne zarówno do proliferacji jak i zachowania homeostazy, jego zablokowanie najczęściej uruchamia wiele różnych szlaków inicjacji apoptozy jednocześnie. Dokładna sekwencja zjawisk prowadzących do śmierci komórki nie jest poznana lecz przypuszcza się, że jest ona specyficzna dla konkretnego typu komórek lub/i inhibitora proteasomów [Ding 2007, McConkey 2008]. W większości przypadków apoptoza zachodzi drogą wewnętrzną, chociaż IP potrafią też uwrażliwić

komórki nowotworowe na indukcję szlaku receptorowego apoptozy [Seol 2011, Zhu 2005, Naumann 2011, Nikrad 2005].

Ostatecznym czynnikiem powodującym apoptozę może być bezpośrednio zaburzenie poziomu i aktywności białek zaangażowanych w proces apoptozy, obniżenie aktywności prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NFκB, nagromadzenie źle zwiniętych białek i stres siateczki wewnątrzplazmatycznej (stres ER), lub też stres oksydacyjny. W zależności od rodzaju nowotworu, śmierć komórki może wynikać z uruchomienia różnych mechanizmów [Mayer R 2005, McConkey 2008, Crawford 2011, Frankland-Searby 2012].

W niektórych rodzajach nowotworów zahamowanie aktywności proteasomów indukuje apoptozę w sposób bezpośredni poprzez zmiany poziomu białek proapoptotycznych i antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2. Wśród białek proapoptotycznych najczęściej dochodzi do wzrostu poziomu Noxa, co stwierdzono między innymi w czerniaku, białaczkę, raku prostaty i raku jelita grubego [Baou 2010, Fernandez 2005, Qin 2005, Qin 2006, Naumann 2012, Chen S 2010]. W czerniaku oraz raku jelita grubego obserwuje się też akumulację Bax, Puma i Bid [Seeger 2010, Nencioni 2006, Ding 2007]. Badania czerniaka i glejaka dowodzą z kolei, że IP mogą także powodować spadek poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-XL i Bcl-2 [Fernandez 2005, Yin 2005, Armstrong 2010].

W innych przypadkach inhibitory proteasomów prowadzą do akumulacji białek pośrednio indukujących apoptozę, w tym najważniejszego supresora nowotworów – p53. Pod wpływem IP poziom p53 rośnie między innymi w czerniaku, raku jelita grubego i raku nerki [Fernandez 2005, Qin 2005, Ding 2007, Vaziri 2009]. Kolejnym i najwcześniej odkrytym mechanizmem indukcji apoptozy przez IP, ważnym szczególnie w nowotworach układu krwiotwórczego, jest obniżanie aktywności prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NFκB [Adams 2004¹, Hideshima 2002, Satou 2004]. Obniżenie aktywacji NFκB stwierdzono także w wielu nowotworach niezwiązanych z układem krwionośnym, w tym w czerniaku [Amschler 2010, Amiri 2004, Młynarczuk-Biały 2006].

Wiadomo także, że inhibitory proteasomów mogą uruchamiać drogę mitochondrialną apoptozy w odpowiedzi na nagromadzenie źle zwiniętych białek w siateczce wewnątrzplazmatycznej, które to zjawisko określa się jako stres siateczki wewnątrzplazmatycznej (stres ER) [Nawrocki 2005, Obeng 2006, Armstrong 2010, Morgillo 2011, Park 2011] lub w wyniku akumulacji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) i stresu oksydacyjnego [Fribley 2004, Perez-Alvarez 2009].

1.5.2. Wpływ inhibitorów proteasomów na cykl komórkowy komórek nowotworowych

Utrata kontroli nad cyklem komórkowym i niekontrolowana proliferacja są jednymi z podstawowych cech komórek nowotworowych. W większości rodzajów nowotworów stwierdza się mutacje genów białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, takich jak kinazy cyklinozależne (ang. *cyclin-dependent kinases*, CDK), cykliny oraz inhibitory CDK [Vermeulen 2003, Williams 2012]. Niektóre z inhibitorów CDK np. p27 lub p21 są ważnymi supresorami nowotworów [Williams 2012]. Mutacje ich genów najczęściej przełamują stan końcowego zróżnicowania komórki w fazie G0 lub G1 i prowadzą do wzmożonej proliferacji. W czerniaku skóry genem najczęściej ulegającym uszkodzeniom jest rejon *CDKN2A* kodujący inhibitory CDK p16 i ARF (p14). Jego uszkodzenia lub delecję stwierdza się w 80-90% przypadków [Bennett 2008, Dahl 2007, Kyrgidis 2010].

W prawidłowych warunkach obecność różnych białek regulatorowych jest wymagana tylko w krótkich okresach cyklu, potem są one szybko ubikwitynowane i kierowane do degradacji proteasomalnej. Ponieważ przechodzenie do kolejnych faz cyklu komórkowego zależy w ogromnym stopniu od działania układu UPS, apoptozie wywołanej zahamowaniem aktywności proteasomów często towarzyszy lub ją poprzedza spowolnienie tempa proliferacji komórek i zatrzymanie cyklu komórkowego. Szczególną rolę odgrywa tu białko Skp2 (ang. *S-phase kinase protein 2*) odpowiadające za ubikwitynację i degradację niektórych cyklin i inhibitorów CDK, między innymi p21 i p27 [Abukhdeir 2008, Lu 2010]. Skp-2 przyspiesza cykl komórkowy, gdyż obniżenie poziomu p21 i p27 umożliwia przejście z fazy G1 do S i ostatecznie podział komórki [Benanti 2012]. Zmniejszenie poziomu p27 obserwowano w wielu rodzajach nowotworów takich jak białaczki, rak piersi, płuc, jelita grubego, prostaty lub jajnika [Chu 2008]. Uważa się, że do zwiększonej degradacji p27 przyczynia się stwierdzona w niektórych nowotworach nadekspresja Skp-2. W podobny sposób podwyższony poziom Skp-2 powoduje obniżenie poziomu drugiego ważnego inhibitora CDK, białka p21 [Inui 2003, Crawford 2011].

Zahamowanie aktywności proteasomów w przypadku wielu nowotworów takich jak glejak, rak jajnika, rak wątrobowokomórkowy a także czerniak, prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2 lub M [Sorolla 2008, Fernandez 2005; Crawford 2011, Mayer 2005, Adams J 2004¹]. Szczegółowe badania dowiodły, że często jest to wynik spadku poziomu Skp-2 oraz nagromadzenia p27 i p21, które przy braku aktywnych

proteasomów nie mogą ulec ubikwitynozależnej degradacji [Zanotto-Filho 2012; Baiz 2009; Lu 2008, Bazzaro 2006].

1.6. Mechanizmy oporności na działanie inhibitorów proteasomów

W wielu przypadkach wykazano, że komórki nowotworowe, również czerniaka, są bardziej wrażliwe na działanie cytotoksyczne IP niż komórki prawidłowe [Fernandez 2005, Qin 2005, Nikiforov 2007, Bazzaro 2006, Zanotto-Filho 2012].

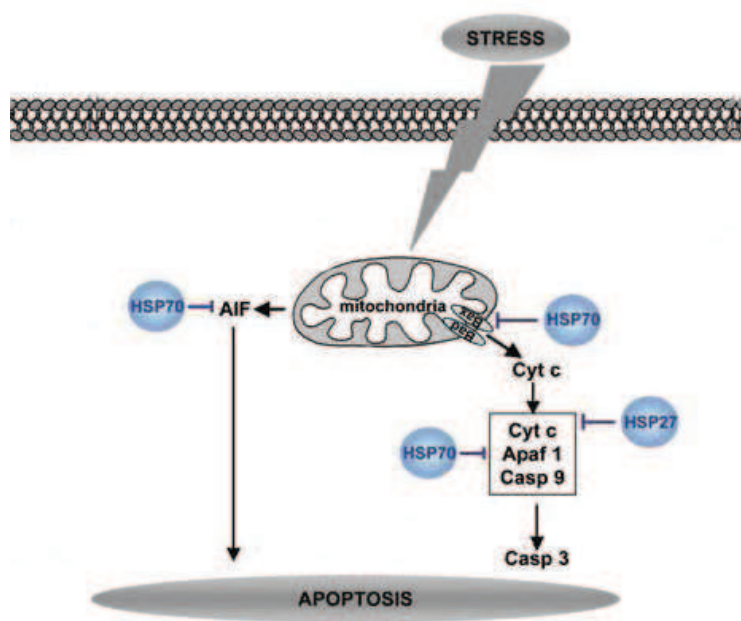
Jednak wrażliwość komórek nowotworowych na zahamowanie aktywności proteasomów bywa bardzo zróżnicowana. Różne rodzaje nowotworów wykazują odmienną wrażliwość na działanie tego samego inhibitora [Kisselev 2001; Kisselev 2006; Keyomarsi 2010; de Bettignies 2010]. Co więcej, ponieważ IP o różnej strukturze chemicznej mogą mieć odmienne mechanizmy działania, wywierają odmienny efekt cytotoksyczny na ten sam typ nowotworu. W niektórych przypadkach stwierdza się synergistyczne działanie IP [Shirley 2005; Chauhan 2008]. Zdarzają się również komórki nowotworowe niemal całkowicie odporne na działanie niektórych z tych związków, wśród nich komórki izolowane z niektórych czerniaków [Fernandez 2005; Sorolla 2008].

Powszechnie przyjmuje się, że podstawowym parametrem determinującym wrażliwość komórek nowotworowych na zahamowanie aktywności proteasomów jest szybkość podziałów komórkowych [McConkey 2008, Frankland-Searby 2012]. Im szybsze podziały, tym silniejszy efekt cytotoksyczny. Inną istotną kwestią jest aktywność translacyjna komórek. Zazwyczaj wysoką wrażliwość na zahamowanie aktywności proteasomów obserwuje się w nowotworach, które syntetyzują i wydzielają duże ilości białek, jak szpiczak mnogi [McConkey 2008, Nawrocki ST 2008].

Jednak z pewnością cytotoksyczność IP determinowana jest również innymi cechami. Oporność danego nowotworu może wynikać z braku indukcji apoptozy, co najczęściej spowodowane jest zaburzeniami poziomu białek z rodziny Bcl-2 [Nawrocki ST 2002; Fernandez 2005, Balsas 2012, Wolter 2007], bywa też związana ze wzrostem aktywności proteolitycznej proteasomu [Magill 2004] lub nadekspresją podjednostek β , szczególnie $\beta 5$ [Bazzaro 2006, Balsas 2012]. Większą oporność wykazują również komórki ze zwiększonym poziomem białek szoku termicznego [McConkey 2008].

1.6.1. Rola białek HSP w oporności na inhibitory proteasomów

Ponieważ IP powodują nagromadzenie nieprawidłowo zwiniętych białek, na szczególną uwagę w zjawisku oporności na te związki zasługuje rola białek szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*, HSP). Po raz pierwszy opisano je u muszki *Drosophila* w 1962 r jako grupę białek, która gromadzi się w komórkach poddanych szokowi cieplnemu i zwiększa odporność na podwyższoną temperaturę. Późniejsze badania dowiodły, że białka HSP znajdują się w komórkach wszystkich organizmów i są najbardziej konserwatywną rodziną białek. Obecnie uważa się je za białka indukowane stresem, ponieważ ich ekspresja rośnie w odpowiedzi na wiele różnych czynników stresowych zarówno endogennych jak i pochodzących ze środowiska zewnętrznego. HSP mają działanie cytoprotekcyjne i pełnią rolę białek opiekuńczych (chaperonowych), które pomagają w zwijaniu nowosyntetyzowanych lub nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów. Ze względu na masę cząsteczkową rodzinę HSP u ssaków podzielono na 5 grup: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 oraz małe HSP (15-30kDa). Każda grupa zawiera zarówno białka stale obecne w komórce (podlegające ekspresji konstytutywnej), jak i indukowane w odpowiedzi na stres. Z powodu zaangażowania w proces nowotworzenia wiele uwagi poświęca się białku HSP70 oraz jednemu z małych HSP, HSP27. W warunkach prawidłowych ich poziom w komórce jest prawie niewykrywalny. Natomiast pod wpływem czynników stresowych ekspresja na pewien czas gwałtownie rośnie [Garrido 2006, Joly 2010, Jego 2013].



Ryc. 6. Antyapoptyczna rola białek HSP70 i HSP27 (na podstawie Garrido C 2006).

HSP biorą udział w zwijaniu nowosyntetyzowanych polipeptydów, składaniu kompleksów białkowych i transporcie białek przez błony. Ponieważ oddziałują z wieloma białkami regulującymi apoptozę, niektóre HSP mają również silne własności anty-apoptotyczne (ryc. 6).

Dowiedziano, że HSP70 wiąże białka z rodziny Bcl-2 (np. Bax) i zapobiega powstawaniu porów w błonie mitochondrialnej [Stankiewicz 2005]. HSP hamują także późne etapy apoptozy. Już po uwolnieniu białek proapoptotycznych z mitochondrium HSP27 może wiązać cytochrom C [Bruey 2000; Concannon 2001, Paul 2002], a HSP70 białko APAF-1 [Beere 2000, Saleh 2000], co zapobiega aktywacji kaspazy 9 i następnie kaspazy 3. Ponadto HSP70 poprzez bezpośrednie wiązanie z AIF blokuje też apoptozę kaspazoniezależną [Ravagnan 2001, Gurbuxani 2003, Matsumori 2005]. Cytoprotekcyjne działanie HSP27 w warunkach stresowych może też wynikać ze zdolności do wybiórczego kierowania niektórych białek do degradacji proteasomalnej. Jednym z takich białek jest I κ B, inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Degradacja inhibitora powoduje wzrost aktywności NF κ B, który hamuje apoptozę [Parcellier 2003]. HSP27 przyspiesza również proteolizę inhibitora CDK, p27, co uniemożliwia zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [Parcellier 2006].

Hamowanie apoptozy przez białka HSP może być niezbędne dla utrzymania przy życiu komórek nowotworowych. Dlatego też często zachodzi w nich konstytutywna nadekspresja HSP70 lub HSP27 [Garrido 2006]. Zwiększoną ekspresję tych białek wykrywa się w wielu nowotworach [Nylandsted 2000, Cornford PA 2000, Ciocca 2005, Parcellier 2005, Calderwood 2010, Vidyasagar 2012], w tym w czerniaku [Park 2000, Missotten 2003, Carta 2005, Schmitt 2006; Yerlikaya 2008, Shipp 2013]. Stwierdzono, że wysoki poziom zarówno HSP70 jak i HSP27 wiąże się ze słabym zróżnicowaniem komórek nowotworowych, a więc dużą złośliwością i złym rokowaniem [Thanner 2005, Ciocca 2005].

Zahamowanie aktywności proteasomów również prowadzi do indukcji ekspresji różnych białek szoku termicznego, włączając HSP70 i HSP27. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy dowodzą, że to właśnie ich geny są najintensywniej aktywowane w odpowiedzi na działanie IP [Mitsiades 2002, Yang 2006]. Wzrost poziomu HSP70 i HSP27 pod wpływem IP obserwowano też w przypadku czerniaka [Fernandez 2005].

Z powodu właściwości anty-apoptotycznych zwiększona ekspresja HSP wiąże się z rozwojem oporności nowotworu na leczenie. Wykazano, że nadekspresja białek HSP70 i HSP27 przynajmniej częściowo odpowiada za oporność niektórych rodzajów komórek na

zahamowanie aktywności proteasomów [Goldbaum 2009, Park 2012]. Chauhan i wsp. w 2003 roku udowodnili, że oporność niektórych białaczek na działanie IP wynika bezpośrednio z nadekspresji HSP27 w tych komórkach. Następnie w badaniach ekspresji genów z użyciem mikromacierzy wykazano, że w białaczkach z opornością związana jest również nadekspresja HSP70 [Shringarpure 2006].

1.7. Leczenie czerniaka

Wysoka oporność na chemioterapię powoduje, że brak jest obecnie skutecznych metod leczenia czerniaka. Postępowaniem z wyboru jest leczenie chirurgiczne. Szczególnie wyniki leczenia czerniaka w uogólnionym stadium, z odległymi przerzutami, są niezadowolające. Średni czas przeżycia wynosi 6–10 miesięcy, a tylko 5-10% chorych przeżywa ponad 5 lat [Ruka 2005, Ruka 2009].

Ze względu na brak skutecznych terapii czerniak zaliczany jest do tak zwanych „nowotworów sygnałowych”, na których w pierwszej kolejności prowadzone są badania kliniczne nowych leków [Ruka 2005]. Między innymi trwają próby leczenia chorych z zaawansowanym stadium czerniaka inhibitorami proteasomów. Badania kliniczne z zastosowaniem najbardziej znanego związku z tej grupy - bortezomibu - nie przyniosły niestety spodziewanych rezultatów [Markovic 2005, Su 2010]. Dlatego też testuje się coraz to nowe związki hamujące aktywność proteasomów. Obiecujące efekty przyniosły próby kliniczne podobnego do laktacystyny inhibitora NPI-0052, który w połączeniu z vorinostatem – inhibitorem deacylazy histonowej (HDAC) powodował zatrzymanie choroby u 60% chorych [Millward 2011].

2. CEL PRACY

Pomimo że cytotoksyczny efekt zahamowania aktywności proteasomów w różnych rodzajach nowotworów został dobrze udokumentowany, stosunkowo mało jest danych dotyczących czerniaka [Fernandez 2005, Qin 2005, Sorolla 2008]. Wykazano, że odmienne formy czerniaka istotnie różnią się opornością na działanie inhibitorów proteasomów. Ponadto, w większości prac wykorzystywano bortezomib, jedyny jak do tej pory inhibitor proteasomów dopuszczony w terapii nowotworów u ludzi. Wiadomo jednak, że bortezomib nie przyniósł spodziewanych efektów w leczeniu czerniaka. Tymczasem w chwili obecnej intensywnie prowadzone są próby kliniczne inhibitorów proteasomów nowej generacji, które są pochodnymi wcześniej znanych związków, jak epoksomycyna lub laktacystyna. Ponadto brak jest w piśmiennictwie prac, które w analizie cytotoksycznego wpływu inhibitorów proteasomów na czerniaka biorą pod uwagę stopień jego melanizacji. Zachodzi pytanie, czy komórki amelanotyczne linii Ab czerniaka przeszczepialnego chomika, ze względu na szybkie tempo podziałów okażą się wrażliwe na zahamowanie aktywności proteasomów, czy też będą odporne w związku z niską aktywnością wydzielniczą.

Ponieważ wciąż jeszcze dane dotyczące mechanizmów działania inhibitorów proteasomów w procesie nowotworowym nie są w pełni poznane, celem mojej pracy było:

1. określenie wrażliwości komórek linii amelanotycznej (Ab) czerniaka przeszczepialnego chomika na cytotoksyczne działanie trzech strukturalnie różnych inhibitorów proteasomów: epoksomycyny, MG-132 oraz laktacystyny,
2. zbadanie drogi śmierci komórek Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów oraz określenie jej charakteru,
3. poznanie mechanizmów ewentualnej oporności komórek Ab związanej z białkami szoku termicznego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Badania wykonano na komórkach izolowanych z guzów linii amelanotycznej (Ab) czerniaka przeszczepialnego chomika. Na badania uzyskano zgodę lokalnej Komisji d/s Etyki (nr 30/2009).

3.1.1. Zwierzęta

Czerniaka pasażowano na samcach chomików syryjskich (*Mesocricetus auratus waterhouse*) odmiany złocistej (*agouti*) w Zakładzie Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Komórki przeszczepiano średnio co 11 dni według metody opisanej przez Bomirskiego [Bomirski 1977].

3.1.2. Komórki linii Ab czerniaka przeszczepialnego chomika

Wykorzystane w badaniach komórki izolowane były z guza nowotworowego w Zakładzie Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zgodnie z procedurą izolacji nieenzymatycznej opracowaną przez Bomirskiego i współpracowników [Bomirski 1975]. Po mechanicznym rozdrobnieniu guza komórki izolowano na mieszaninie 9% fikolu (ICN Biomedicals) i 75% uropoliny (Polfa Starogard) o gęstości 1,072 g/cm³. Żywotność komórek oceniana z użyciem błękitu trypanu wynosiła powyżej 90%.

Po izolacji komórki hodowane były przez 24 godziny w standardowej pożywce hodowlanej: podłoże RPMI 1640 (Biomed Lublin) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (Invitrogen, USA) oraz antybiotyków: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 jedn./ml), w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie komórki wykorzystywano do dalszych badań.

3.1.3. Inhibitory proteasomów

Do badań wybrano inhibitory aktywności ChT-L proteasomów reprezentatywne dla trzech podstawowych grup tych związków różniących się strukturą chemiczną (patrz: Wstęp):

epoksyketony peptydowe:

- **epoksomycyna** (Biomol, USA), rozpuszczalna w DMSO

aldehydowe pochodne peptydów:

- **MG-132** (SIGMA, USA), rozpuszczalny w DMSO

β -laktony:

- **laktacystyna** (SIGMA, USA), rozpuszczalna w wodzie

Komórki inkubowano przez wymagany okres czasu (6, 12, 18, 24, 48 lub 72 godziny) w standardowej pożywce hodowlanej z dodatkiem IP w różnych stężeniach:

- epoksomycyna 0,1 μ M, 0,5 μ M i 1 μ M
- MG-132 1 μ M, 5 μ M i 10 μ M
- laktacystyna 1 μ M, 5 μ M i 10 μ M.

3.1.4. Inhibitor kaspaz

Do oceny udziału apoptozy kaspazoniezależnej w procesie śmierci komórek stosowano ogólny inhibitor kaspaz **Boc-D-FMK (BAF)** (Calbiochem, USA), rozpuszczalny w DMSO. BAF jest inhibitorem o szerokim spektrum działania, który hamuje działanie zarówno kaspaz inicjatorowych jak i efektorowych.

Komórki inkubowano w standardowej pożywce hodowlanej z IP oraz BAF w stężeniu 50 μ M przez 24 godziny. Stosowano 2-godziną preinkubację przed dodaniem inhibitorów proteasomów.

Następnie komórki poddawano testom opisanym poniżej. W badaniach kontrolnych dla próbek z użyciem epoksomycyny, MG-132 oraz BAF stosowano komórki inkubowane z DMSO.

3.2. Metody

3.2.1. Ocena aktywności proteasomów metodą luminescencyjną

Aktywność ChT-L proteasomów w komórkach oznaczano testem luminometrycznym (Promega, USA). Test ten opiera się na hydrolizie peptydu sprzężonego z lucyferyną przez jednostkę 20S proteasomu. Uwolniona lucyferyna staje się substratem dla enzymu lucyferazy w reakcji, w której z udziałem ATP powstaje sygnał świetlny (luminescencyjny). Tak więc natężenie sygnału świetlnego jest proporcjonalne do poziomu aktywności ChT-L.

Badanie wykonywano zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Komórki Ab hodowano na płytkach 96-dołkowych w ilości 1×10^4 /dołek w standardowej pożywce hodowlanej przez 1 godzinę i 45 minut. Na 2 godziny przed pomiarem do hodowli dodawano IP. Wszystkie próbki wykonywane były w duplikatach. 15 minut przed pomiarem do próbek dodawano bufor reakcyjny zawierający substrat Suc-LLVY-aminolucyferynę (stężenie końcowe $20 \mu\text{M}$) oraz enzym lucyferazę. Próbki wytrząsano 2 minuty, 700 rpm i inkubowano w temperaturze pokojowej. Natężenie luminescencji mierzono w luminometrze płytkowym Fluoroscan FC firmy ThermoScientific (USA).

Wyniki badanych próbek wyrażono jako procent aktywności ChT-L proteasomów w komórkach kontrolnych, której wartość przyjęto za 100%.

3.2.2. Badanie żywotności komórek z użyciem XTT

Zmiany żywotności komórek badano przy użyciu testu XTT (Roche, Niemcy). Test ten pozwala z dużą dokładnością oznaczyć aktywność metaboliczną komórek w próbce. Spadek aktywności metabolicznej jest miarą cytotoksycznego działania badanej substancji. Zasada jego działania opiera się na rozkładzie przez aktywne metabolicznie komórki żółtej soli tetrazolowej XTT do pomarańczowego formazanu. Hydroliza soli XTT zachodzi pod wpływem mitochondrialnych dehydrogenaz, tak więc stężenie powstającego formazanu jest bezpośrednim odzwierciedleniem aktywności enzymów mitochondrialnych, co określa się jako żywotność komórek. Stężenie formazanu w badanej próbce jest mierzone za pomocą spektrofotometru płytkowego przy długości fali 450 nm.

Badania wykonano według metodyki opisanej wcześniej [Jost 1992] i zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki inkubowano na płytkach 96-dołkowych w ilości 2×10^4 /dołek w standardowej pożywce hodowlanej w obecności IP oraz inhibitora kaspaz BAF. Czas inkubacji wynosił 6, 12, 18, 24, 48, lub 72 godziny. Wszystkie próbki

wykonywane były w trzech powtórzeniach. 5 godzin przed upływem żądanego czasu do próbek dodawano roztwór XTT (stężenie końcowe 0,3 mg/ml) i ponownie inkubowano. Absorbancję powstałego formazanu odczytywano przy 450 nm przy użyciu spektrofotometru płytkowego Multiscan FC firmy ThermoScientific (USA).

Na wykresach żywotność komórek w badanych próbkach wyrażono jako procent żywotności komórek kontrolnych, których wartość przyjęto za 100%.

Na podstawie pomiaru aktywności proteasomów oraz żywotności komórek w teście XTT do dalszych badań wybrano następujące stężenia inhibitorów proteasomów:

- epoksomycyna 0,5 μ M
- MG-132 5 μ M
- laktacystyna 10 μ M.

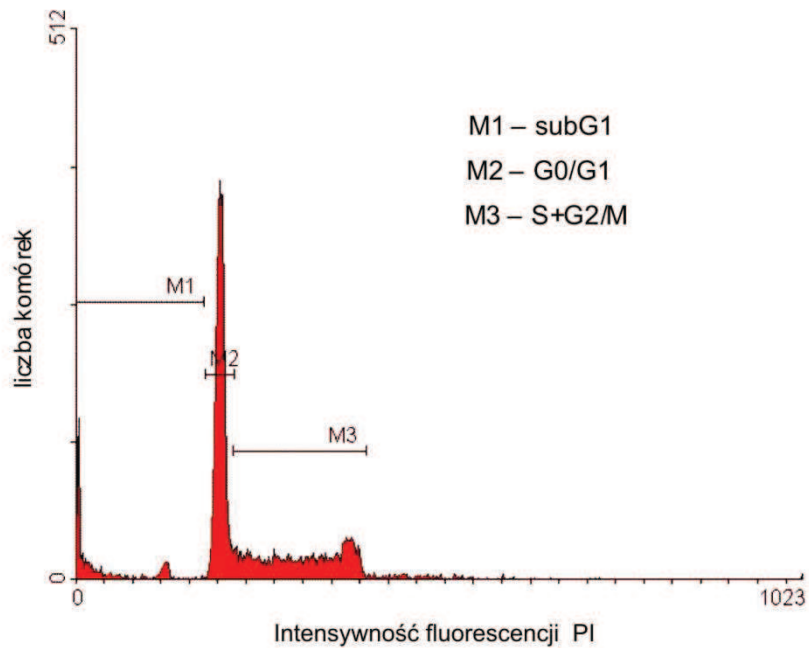
Stężenia te są dla epoksomycyny i MG-132 najniższymi stężeniami pozwalającymi całkowicie zahamować aktywność ChT-L proteasomów, natomiast w przypadku laktacystyny jest to stężenie, które w badanym zakresie najsilniej hamuje aktywność ChT-L proteasomów.

3.2.3. Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny

Ponieważ fazy S, G2 oraz M związane są z podziałem komórki, komórki znajdujące się w tym okresie cyklu przyjęto jako dzielące się, natomiast te w fazach G1 lub G0 za komórki w okresie spoczynkowym.

Odsetek komórek w różnych fazach cyklu oznaczano w cytometrze przepływowym na podstawie zawartości DNA w jądrach komórkowych. Barwienie DNA jodkiem propidyny (PI) pozwala zmierzyć ilość materiału genetycznego w komórce i na tej podstawie odróżnić zawierające więcej DNA komórki dzielące się (faza S+G2/M) od tych w fazie spoczynkowej (G0/G1). Dodatkowo metoda ta pozwala zaobserwować populację komórek o obniżonej zawartości DNA – frakcję sub-G1, w której gromadzą się między innymi ciała apoptotyczne (ryc. 7).

Badania wykonywano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [Darzynkiewicz 1984, Cichorek 2006¹]. W skrócie: komórki hodowano w stężeniu 1×10^6 /ml w standardowej pożywce hodowlanej w obecności IP oraz inhibitora kaspaz BAF. Czas inkubacji wynosił 6, 12, lub 24 godziny. Po upływie wymaganego czasu komórki zawieszano w PBS. 1×10^6



Ryc. 7. Przykładowy histogram analizy cyklu komórkowego komórek wybarwionych jodkiem propidyny (PI). Zakresy M1, M2 i M3 obejmują populacje komórek w odpowiednich fazach cyklu.

komórek w 1 ml PBS utrwalano przez 24 godziny 70% etanolem w temperaturze -20°C , płukano PBS, a następnie barwiono w roztworze PBS zawierającym jodek propidyny w stężeniu $40\ \mu\text{g/ml}$ (SIGMA, USA) i RNazę A w stężeniu $100\ \mu\text{g/ml}$ (SIGMA, USA). Zawiesinę komórek inkubowano 30 minut w ciemności w 37°C . Fluorescencję jodku propidyny analizowano na cytometrze przepływowym FACScan (BectonDickinson Biosciences, USA) w Zakładzie Fizjopatologii GUMed. Z każdej próbki zliczano 10^4 komórek. Uzyskane dane analizowano programem WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, USA).

3.2.4. Ocena zmian apoptotycznych w błonie komórkowej – eksternalizacja fosfatydyloseryny

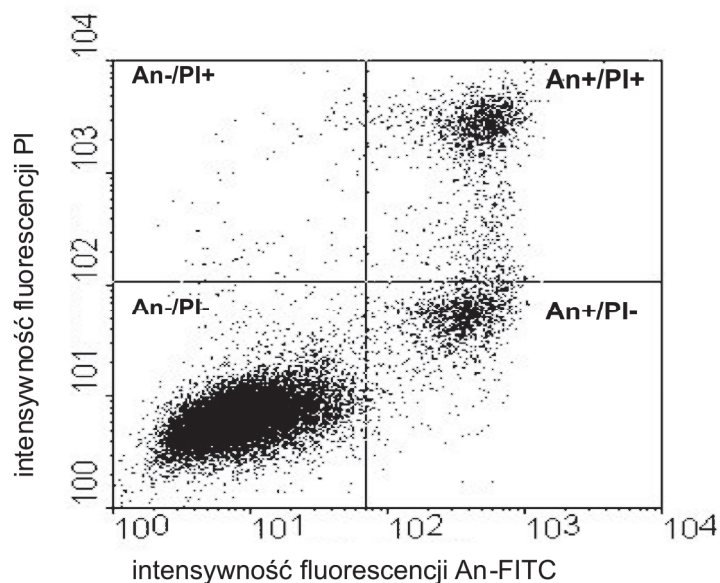
Aby ocenić wczesne zmiany apoptotyczne, analizowano eksternalizację fosfatydyloseryny (PS), to jest jej przemieszczenie z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Aneksyna V, która wiąże się specyficznie z PS obecną na powierzchni komórek, pozwala więc wyznakować komórki apoptotyczne. Jodek propidyny w warunkach prawidłowych nie wnika od wnętrza komórki, barwi więc tylko DNA komórek martwych, z uszkodzoną błoną.

Jednoczesne barwienie aneksyną V (An) oraz jodkiem propidyny (PI) pozwala różnicować komórki na cztery populacje (ryc. 8):

- An-/PI- – nie wiążące aneksyny i nie wiążące jodku propidyny – komórki żywe,
- An+/PI- – wiążące aneksynę, ale nie wiążące jodku propidyny – komórki wczesnoapoptotyczne, z zachowaną integralnością błony komórkowej,
- An+/PI+ – wiążące zarówno aneksynę jak i jodek propidyny – komórki z uszkodzoną błoną komórkową uważane za komórki późnoapoptotyczne (martwe),
- An-/PI+ – wiążące tylko jodek propidyny – komórki nekrotyczne.

Suma populacji komórek (An+/PI-) oraz (An+/PI+), określana czasami jako komórki aneksynododatnie, stanowi liczbę wszystkich komórek przechodzących proces apoptozy.

Zmiany w strukturze błony komórkowej badano z użyciem aneksyny V związanej z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) oraz jodku propidyny (BD Pharmingen, USA) według procedury opisanej wcześniej [Cichorek 2011] i zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki hodowano na płytkach 12-dołkowych w stężeniu 1×10^6 w standardowej pożywce hodowlanej, w obecności IP oraz inhibitora kaspaz BAF. Czas inkubacji wynosił 6, 12, lub 24 godziny. Po płukaniu PBS 1×10^6 komórek zawieszano w 100 μ l buforu (0,1M HEPES/NaOH pH 7,4; 1,4M NaCl; 25mM CaCl₂) zawierającego aneksynę V wyznakowaną FITC i jodek propidyny. Próbkę inkubowano 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej.



Ryc. 8. Przykładowy wykres punktowy typu „dot plot” przedstawiający analizę cytometryczną komórek barwionych aneksyną V wyznakowaną FITC (An-FITC) oraz jodkiem propidyny (PI) z wyróżnionymi populacjami komórek.

Fluorescencję aneksyny V i jodku propidyny analizowano na cytometrze przepływowym FACScan (Becton Dickinson Biosciences, USA) w Zakładzie Fizjopatologii GUMed. Z każdej próbki zliczano 2×10^4 komórek, a uzyskane dane analizowano programem WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, USA).

3.2.5. Analiza zmian morfologicznych chromatyny jądrowej

Zmiany morfologiczne zachodzące w komórce w późnej fazie apoptozy oceniano na podstawie kondensacji chromatyny jądrowej oraz następującej potem fragmentacji jądra. Do analizy tego zjawiska wykorzystano barwnik fluorescencyjny Hoechst 33342. Jest to barwnik DNA, który łatwo przenika przez błony komórkowe, dzięki czemu można go stosować do badania żywych komórek. Fluorescencja Hoechst 33342 jest bardzo wrażliwa na zmiany konformacji DNA i w jądrach apoptotycznych o skondensowanej chromatynie jest dużo bardziej intensywna niż w jądrach niezmiennych.

Komórki hodowano w stężeniu 1×10^6 w standardowej pożywce hodowlanej w obecności IP oraz inhibitora kaspaz BAF. Czas inkubacji wynosił 6, 12, lub 24 godziny. 30 minut przed końcem czasu inkubacji do pożywki hodowlanej dodawano świeżo przygotowany roztwór Hoechst w PBS do stężenia końcowego 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Komórki inkubowano 30 minut w ciemności, w 37°C , 5% CO_2 . Następnie płukano i zawieszano w 10 μl PBS. Zawiesinę komórek naniesioną na szkiełko mikroskopowe analizowano pod mikroskopem odwróconym Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Japonia) wyposażonym w kamerę cyfrową Olympus XC30 (Olympus, Japonia). Do dokumentacji fotograficznej wykorzystano obiektywy 10x i 40x.

3.2.6. Ocena aktywacji kaspazy 9 i 3 oraz ekspresji białek HSP metodą immunoblottingu

Aby potwierdzić indukcję apoptozy w komórkach Ab oraz ocenić aktywację jej szlaku mitochondrialnego, zbadano aktywację kaspazy 3 i 9 metodą immunoblottingu (Western-blot).

Metodą tą badano również poziom białek szoku termicznego HSP70 oraz HSP27.

Komórki hodowano w stężeniu 1×10^6 w standardowej pożywce, w obecności IP oraz inhibitora kaspaz BAF. Czas inkubacji wynosił 6, 12, lub 24 godziny. 3×10^6 komórek płukano PBS, zawieszano w buforze lizującym (10mM Tris-HCl pH 8,0; 140mM NaCl; 2% TX-100) z dodatkiem inhibitorów proteaz (1mM AEBSF; 0,8 μM aprotyniny; 50 μM

bestatyny; 15 μ M E-64; 20 μ M leupeptyny; 10 μ M pepstatyny A) w ilości 10 μ l buforu na 1x10⁶ komórek. Komórki inkubowano w buforze lizującym przez 1 godzinę w 4°C, a następnie wirowano w 4°C, 15 minut, 14 000 rpm. W supernatancie oznaczano białko całkowite metodą Lowry'ego. 60 μ g białka nakładano na żel poliakrylamidowy 13% dla kaspazy 3 lub 10% dla pozostałych białek. Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono z żelu na błonę nitrocelulozową za pomocą transferu półsuchego. Prawidłowość transferu białek sprawdzano poprzez odwracalne barwienie membrany barwnikiem Ponceau S. Następnie błonę blokowano 2 godziny w 4% odtłuszczonym mleku w buforze TBS (10mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl) i inkubowano przez noc w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych w TBS:

- kaspaza 9 (Stressgen, USA), mysie monoklonalne 1:500
- kaspaza 3 (Santa Cruz Biotechnology, USA), królicze poliklonalne 1:250
- HSP70 (StressMarq, USA), mysie monoklonalne 1:5000
- HSP27 (Stressgen, USA), królicze poliklonalne 1:1000
- β -aktyna (SIGMA, USA), mysie monoklonalne 1:30000

β -aktyna służyła jako standard wewnętrzny potwierdzający równomierne nałożenie próbek na żel.

Po przemyciu buforem TBS membranę inkubowano 2 godziny w roztworze odpowiednich przeciwciał drugorzędowych w TBS:

- przeciwciała królicze przeciwko przeciwciałom mysim sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma, USA), 1:50000
- przeciwciała kozie przeciwko przeciwciałom króliczym sprzężone z peroksydazą chrzanową (Pierce, USA), 1:50000

Po płukaniu buforem TBS membranę inkubowano 5 minut w roztworze chemiluminescencyjnego substratu dla peroksydazy chrzanowej (Pierce, USA). Sygnał chemiluminescencyjny uwidaczniano natychmiast na kliszy autoradiograficznej.

3.2.7. Analiza uwalniania cytochromu C i AIF z mitochondriów za pomocą barwień immunofluorescencyjnych

Aby ocenić indukcję mitochondrialnego szlaku apoptozy, analizowano translokację cytochromu C z mitochondriów do cytoplazmy oraz białka AIF z mitochondriów do cytoplazmy i jądra komórkowego.

3.2.7.1. Barwienie cytochromu C

W celu zbadania wpływu cytochromu C z mitochondriów wykonano podwójne barwienie immunofluorescencyjne znakując cytochrom C zielonym barwnikiem Alexa Fluor 488, a mitochondria czerwonym barwnikiem MitoTracker Red CMXRos.

Komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych w stężeniu 1×10^6 /ml w standardowej pożywce hodowlanej w obecności IP. Czas inkubacji wynosił 6, 12, lub 24 godziny. 30 minut przed upływem tego czasu i utwaleniem komórek, do pożywki hodowlanej dodawano roztwór barwnika MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, USA) do stężenia końcowego 250nM i ponownie inkubowano. Barwienie prowadzono według procedury zalecanej przez producenta przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko cytochromowi C. Komórki utrwalano 10 minut 3,7% formaldehydem w 0,01M buforze PBS pH 7,4 i permeabilizowano 5 minut 90% metanolem. Po odpłukaniu metanolu szkiełka nakrywkowe z komórkami blokowano 30 minut 3% płodową surowicą bydlęcą (FBS) w PBS i inkubowano 1 godzinę z przeciwciałami pierwszorzędowymi przeciwko cytochromowi C (mysie monoklonalne, BD Pharmingen, USA) rozcieńczonymi 1:400 w roztworze blokującym. Próbkę ponownie płukano i inkubowano 1 godzinę w ciemności w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z barwnikiem AlexaFluor 488 (przeciwciała kozie przeciwko przeciwciałom mysim, Invitrogen, USA) w stężeniu 1:400 w PBS. Szkiełka z wybarwionymi komórkami płukano PBS, pozostawiano do wyschnięcia i skrywano preparatem PermaFluor (Shanon Lipshaw Co.).

3.2.7.2. Barwienie białka AIF

Aby ocenić translokację czynnika AIF, wykonano podwójne barwienie immunofluorescencyjne, w którym AIF wyznakowano opisanym wcześniej zielonym barwnikiem Alexa Fluor 488, a DNA jądrowe czerwonym jodkiem propidyny.

Komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych w stężeniu 1×10^6 /ml w standardowej pożywce w obecności IP. Czas inkubacji wynosił 6, 12, i 24 godziny. Procedurę barwienia prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko AIF. Komórki utrwalano 10 minut 4% paraformaldehydem w PBS i permeabilizowano 10 minut 0,2% Trytonem X100 w PBS. Następnie komórki na szkiełkach nakrywkowych płukano PBS i blokowano 30 minut 2% albuminą surowicy bydlęcej (BSA) w buforze PBST (bufor PBS z dodatkiem 0,2% Tween20). Po blokowaniu komórki przenoszono do roztworu przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko AIF

(królicze monoklonalne, Abcam, Wielka Brytania) rozcieńczonych 1:500 w 1% BSA w PBST i inkubowano przez noc w 4°C. Szkiełka z komórkami płukano w PBS i inkubowano 1 godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi związanymi z barwnikiem Alexa Fluor 488 (przeciwciała kozie przeciwko przeciwciałom króliczym, Invitrogen, USA) rozcieńczonymi w stosunku 1:400 w 1% BSA w PBS. Aby usunąć RNA przed końcowym barwieniem jodkiem propidyny, próbki traktowano RNazą A (SIGMA, USA) 0,1 mg/ml przez 30 minut w 37°C. Po ponownym płukaniu PBS komórki barwiono 30 minut jodkiem propidyny (Fluka, USA) w stężeniu 2,5 µg/ml w PBS. Szkiełka z wybarwionymi komórkami płukano PBS, pozostawiano do wyschnięcia i skrywano preparatem PermaFluor (Shanon Lipshaw Co.).

3.2.7.3. Analiza jakościowa barwień immunofluorescencyjnych

Preparaty immunofluorescencyjne oceniane były przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse 600 (Nikon, Japonia) współpracującego z systemem konfokalnym Radiance 2100 (BioRad, Wielka Brytania) wyposażonym w laser kryptonowo-argonowy, który emituje światło monochromatyczne o długościach fali 488 nm i 568 nm. Światło długości fali 488 nm służyło do wzbudzenia barwnika Alexa Fluor 488, natomiast światło 568 nm wzbudzało fluorescencję barwników MitoTracker Red i jodek propidyny. Obrazy uzyskiwane były pod obiektywem 60x z imersją olejową i analizowane oprogramowaniem LaserSharp 2000 v.4 (BioRad, Wielka Brytania).

Na preparatach analizowano współwystępowanie (kolokalizację) barwników w różnych organellach lub kompartmentach komórkowych (mitochondria, jądro komórkowe, cytoplazma).

3.2.8. Analiza statystyczna

Analizie statystycznej poddano dane ilościowe uzyskane z pomiarów żywotności komórek, analizy cyklu komórkowego oraz oceny apoptotycznych zmian w błonie komórkowej. Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 2011 (StatSoft. Inc.) oraz arkusza kalkulacyjnego Excel. Istotność różnic pomiędzy dwoma grupami (model zmiennych niepowiązanych) zbadano testami istotności różnic U Manna-Whitneya. Istotność różnic pomiędzy więcej niż dwoma grupami sprawdzono testem Kruskala-Wallisa. W przypadku otrzymania istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami zastosowano testy post hoc (test Dunna).

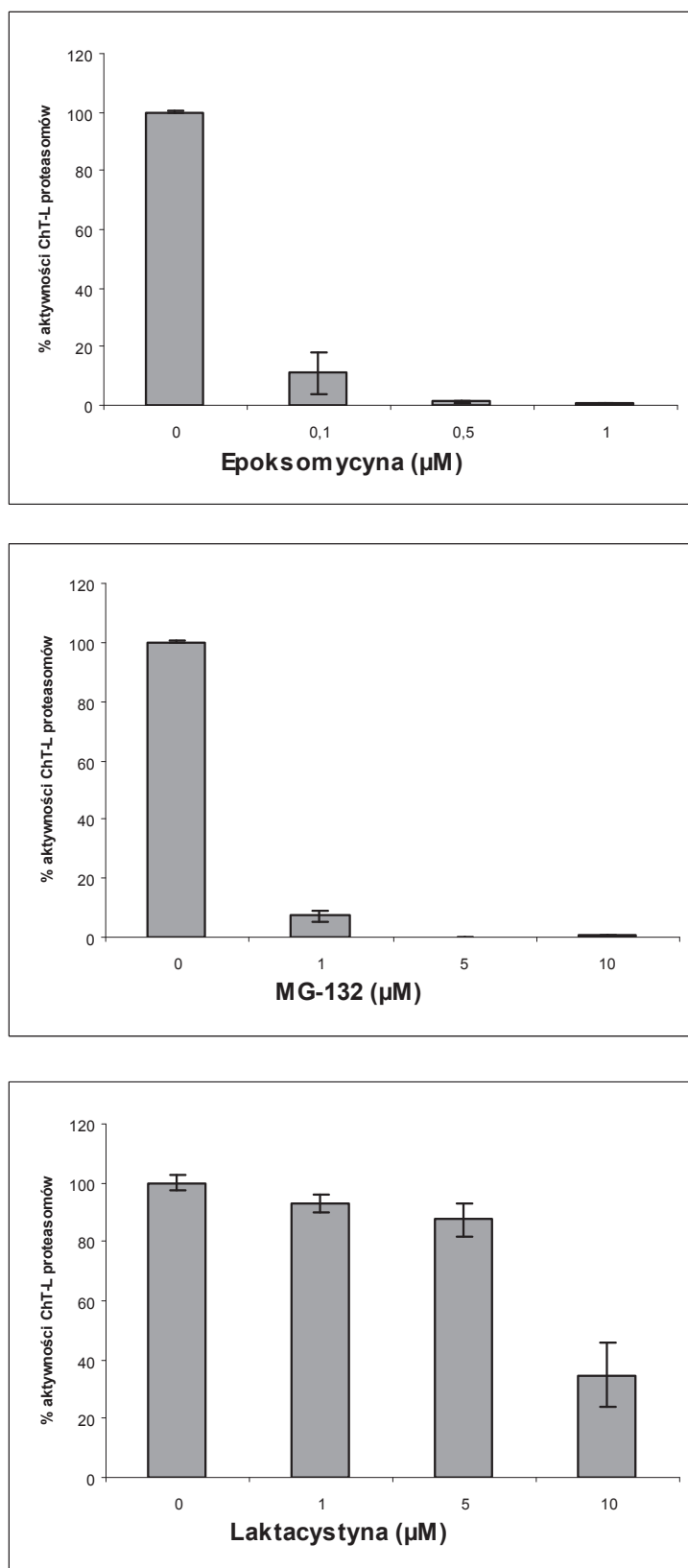
Testy niezależności Chi-kwadrat wykorzystano dla zmiennych jakościowych.
We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto $p=0.05$.
Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe.

4. WYNIKI

4.1. Inhibitory proteasomów hamują aktywność ChT-L proteasomów w komórkach Ab

Ponieważ różne komórki nowotworowe wykazują odmienną wrażliwość na cytotoksyczne działanie IP, na początku pracy zbadano stopień zahamowania aktywności ChT-L proteasomów w komórkach Ab pod wpływem trzech różnych stężeń epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny (ryc. 9).

Najniższe użyte stężenie epoksomycyny (0,1µM) obniżało aktywność ChT-L o około 90%, do poziomu 11% aktywności komórek kontrolnych. Natomiast epoksomycyna w stężeniu 0,5µM i 1,0µM wywoływała niemalże całkowitą inhibicję aktywności ChT-L, zmniejszając ją do około 1% wartości kontrolnej. Podobne wyniki uzyskano poddając komórki działaniu MG-132, który w najniższym badanym stężeniu (1µM) hamował aktywność ChT-L o nieco ponad 90%, pozostawiając ją na poziomie 7% w porównaniu do kontroli. Podobnie jak w przypadku epoksomycyny, wyższe stężenia MG-132 (5µM i 10µM) niemal całkowicie blokowały aktywność ChT-L, która spadała poniżej 1% wartości kontrolnej. Dla laktacystyny nie udało się osiągnąć całkowitego zahamowania aktywności ChT-L nawet w stężeniu 10µM. 1µM i 5µM stężenie inhibitora miało niewielki wpływ na tę aktywność, obniżając ją jedynie o odpowiednio 7% i 13% w stosunku do kontroli. Tylko w stężeniu 10µM laktacystyna w sposób znaczący hamowała aktywność proteasomów zmniejszając ją do 66% wartości w komórkach kontrolnych. Stosowanie większych stężeń laktacystyny byłoby niewskazane ze względu na możliwość wystąpienia działań cytotoksycznych związanych z blokowaniem innych proteaz (np. katepsyny A), co mogłoby rzutować na wyniki następnych doświadczeń.



Ryc. 9. Wpływ wybranych stężeń epoksomycyny, MG-132 oraz laktacystyny na aktywność ChT-L proteasomów komórek Ab. Wyniki wyrażono jako procent aktywności ChT-L w komórkach kontrolnych, których wartość przyjęto za 100%, i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe.

4.2. Inhibitory proteasomów zmniejszają żywotność komórek Ab

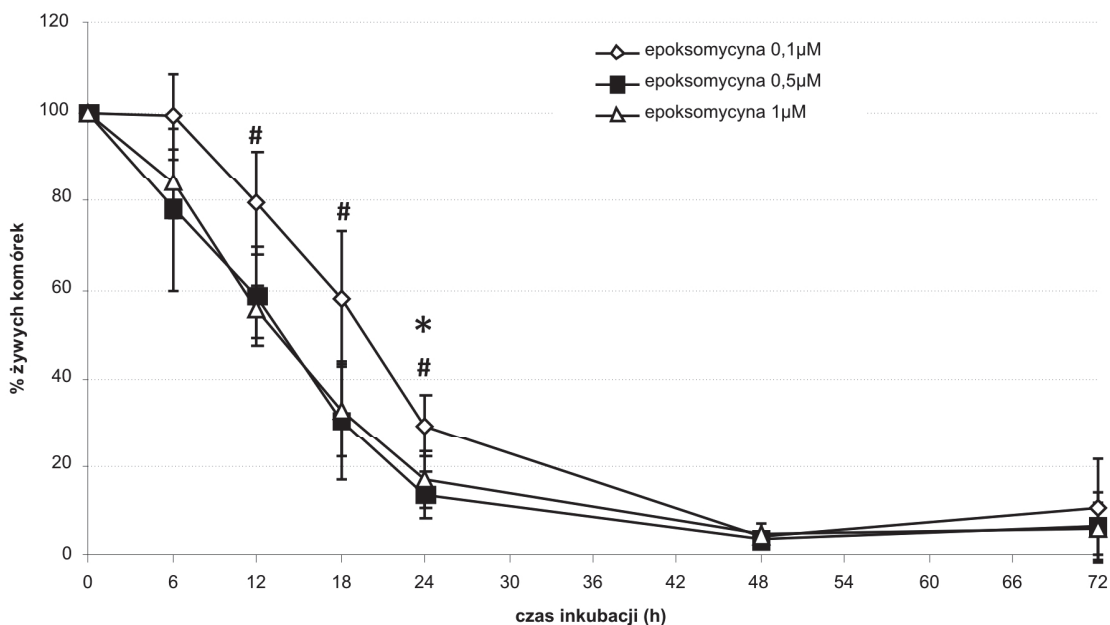
Aby zbadać działanie cytotoksyczne IP w stosunku do komórek linii Ab, oceniano zmiany żywotności komórek po 6, 12, 18, 24, 48, lub 72 godzinach inkubacji z wybranymi stężeniami epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny.

Epoksomycyna i MG-132 w stężeniach, które całkowicie hamowały aktywność Ch-TL proteasomów, wykazywały podobny efekt cytotoksyczny. Natomiast cytotoksyczne działanie najmniejszych testowanych stężeń epoksomycyny ($0,1\mu\text{M}$) i MG-132 ($1\mu\text{M}$), przy którym komórki zachowały około 10% aktywności ChT-L, było opóźnione o około 6 godzin i na początku trwania doświadczenia było w porównaniu z większymi stężeniami znamienne słabsze ($p < 0,05$). Niezależnie od stężenia epoksomycyny lub MG-132 statystycznie istotny spadek żywotności komórek ($p < 0,05$) następował po 24 godzinach, a w 48 godzinie doświadczenia we wszystkich przypadkach notowano zmniejszenie żywotności komórek o ponad 95%.

Epoksomycyna obniżała żywotność komórek w sposób zależny od dawki (ryc. 10). Najniższe z zastosowanych stężeń epoksomycyny ($0,1\mu\text{M}$) przez pierwszych 6 godzin inkubacji nie miało wpływu na żywotność. Pierwsze efekty cytotoksyczne obserwowano po 12 godzinach, kiedy to żywotność komórek spadała o 21% w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Po 24 godzinach spadek ten wynosił 70%. Cytotoksyczne działanie epoksomycyny w większych stężeniach było szybsze. Już po 6 godzinach inkubacji z $0,5\mu\text{M}$ i $1\mu\text{M}$ epoksomycyną żywotność komórek zmniejszała się odpowiednio o 22% i 16% w stosunku do kontroli. W 12 godzinie inkubacji obserwowano spadek żywotności o ponad 40% zarówno dla $0,5\mu\text{M}$ jak i $1\mu\text{M}$ epoksomycyny. 24-godzinne działanie inhibitora w obu tych stężeniach obniżało żywotność komórek o około 85%.

Wpływ $0,1\mu\text{M}$ epoksomycyny na żywotność komórek w 12, 18 i 24 godzinie doświadczenia był istotnie słabszy ($p < 0,05$), niż dwóch większych stężeń. Natomiast nie obserwowano istotnych różnic w działaniu między epoksomycyną w większych stężeniach – $0,5\mu\text{M}$ i $1\mu\text{M}$.

Po 48 godzinach epoksomycyna we wszystkich badanych stężeniach powodowała spadek żywotności o ponad 95% w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

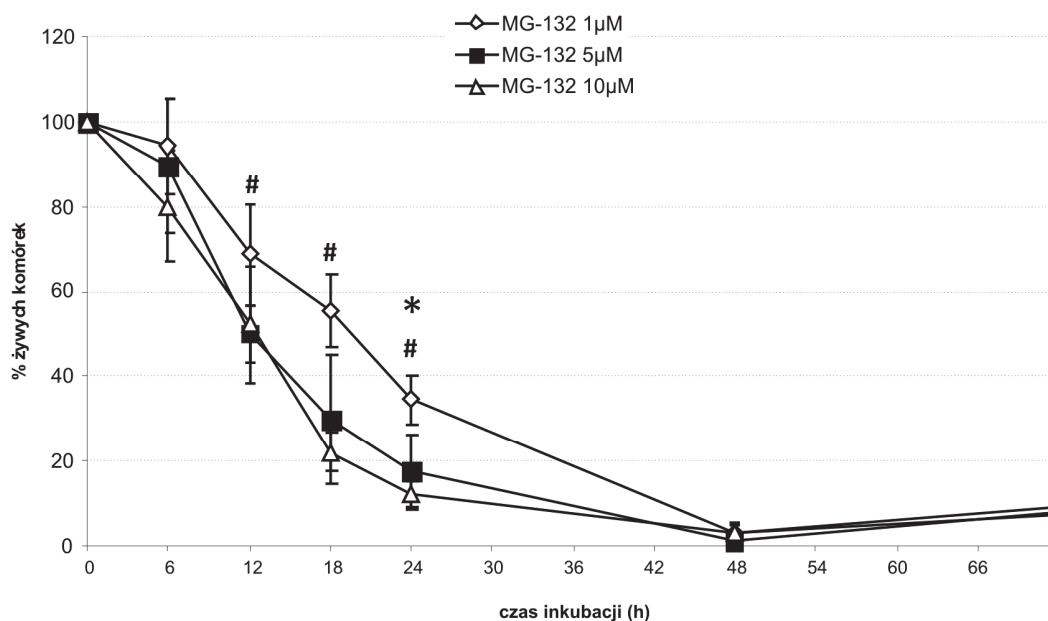


Ryc. 10. Zmiany żywotności komórek Ab pod wpływem wybranych stężeń epoksomycyny. Wyniki przedstawiono jako procent żywotności komórek kontrolnych, których wartość przyjęto za 100%. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

*Statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek żywotności komórek poddanych działaniu epoksomycyny w stosunku do kontroli.

Statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica w spadku żywotności komórek między epoksomycyną w stężeniu 0,1 μ M a 0,5 μ M i 1 μ M.

Podobnie jak w przypadku epoksomycyny, działanie cytotoksyczne MG-132 w stosunku do komórek Ab zależało od dawki i dla najniższego stężenia 1 μ M było znamienne słabsze ($p < 0,05$), niż dla stężeń 5 μ M i 10 μ M (ryc. 11). 6-godzinna inkubacja z 1 μ M MG-132 wywierała niewielki wpływ na żywotność komórek, która zmniejszała się jedynie o 6% w stosunku do komórek kontrolnych. Po 12 godzinach żywotność spadała o 31%, a w 24 godzinie inkubacji spadek wynosił 65% wartości kontrolnej. MG-132 w stężeniu 5 μ M i 10 μ M obniżał żywotność komórek w podobnym stopniu i nie zanotowano statystycznie istotnych różnic między stężeniami. Po 6 godzinach żywotność komórek zmniejszała się w stosunku do kontroli o 11% dla 5 μ M MG-132 i o 19% dla 10 μ M MG-132. W obu przypadkach 12-godzinna inkubacja obniżała żywotność o 50%, a po 24 godzinach spadek ten wynosił 80%.



Ryc. 11. Zmiany żywotności komórek Ab pod wpływem wybranych stężeń MG-132. Wyniki przedstawiono jako procent żywotności komórek kontrolnych, których wartość przyjęto za 100%. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

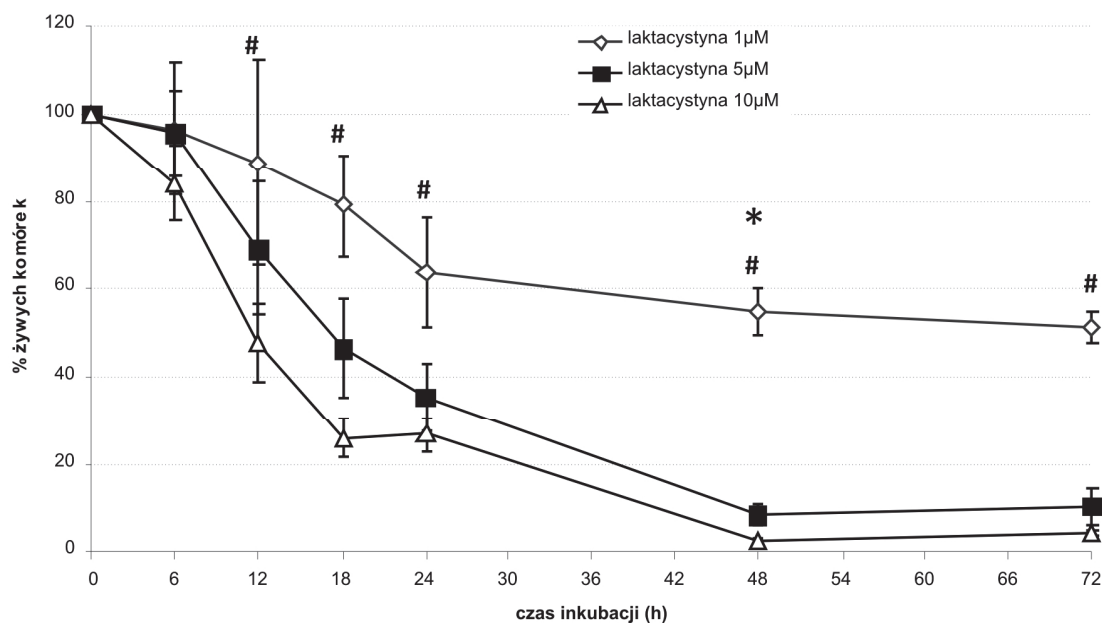
*Statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek żywotności komórek poddanych działaniu MG-132 w stosunku do kontroli.

Statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica w spadku żywotności komórek między MG-132 w stężeniu $1\mu\text{M}$ a $5\mu\text{M}$ i $10\mu\text{M}$.

48-godzinne działanie MG-132 w zakresie badanych stężeń zmniejszało żywotność komórek o ponad 95% w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Dla laktacystyny nie udało się osiągnąć całkowitego zablokowania aktywności proteasomów nawet w stężeniu $10\mu\text{M}$, dlatego też jej cytotoksyczny wpływ na komórki Ab był słabszy, a ich żywotność obniżała się wolniej niż w przypadku pozostałych badanych inhibitorów. Statystycznie istotny spadek żywotności komórek ($p < 0,05$) następował po 48 godzinach inkubacji z laktacystyną (ryc. 12).

Laktacystyna w najniższym stężeniu ($1\mu\text{M}$) po 6 godzinach działania nie wpływała na żywotność komórek. Dopiero 12-godzinna inkubacja z $1\mu\text{M}$ laktacystyną obniżała żywotność o 11%, a 24-godzinna o 36% w stosunku do komórek kontrolnych. Spadek żywotności po 48 godzinach inkubacji wynosił jedynie 45%.



Ryc. 12. Zmiany żywotności komórek Ab pod wpływem wybranych stężeń laktacystyny. Wyniki przedstawiono jako procent żywotności komórek kontrolnych, których wartość przyjęto za 100%. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

*Statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek żywotności komórek poddanych działaniu laktacystyny w stosunku do kontroli.

Statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica w spadku żywotności komórek między laktacystyną w stężeniu 1 μ M a 10 μ M.

Laktacystyna w pięciokrotnie większym stężeniu (5 μ M) powodowała szybszy spadek żywotności komórek. Co prawda zmiany po 6 godzinach inkubacji były jeszcze niewielkie (spadek o 4%), ale już po 12 godzinach zanotowano obniżenie się żywotności o 31%. Po 24 godzinach żywotność zmniejszała się o 65%, a po 48 godzinach o 91% w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Największy efekt cytotoksyczny laktacystyny obserwowano po zastosowaniu stężenia 10 μ M. Przez cały czas trwania doświadczenia 10 μ M laktacystyna zmniejszała żywotność komórek istotnie silniej ($p < 0,05$) niż 1 μ M. Już 6-godzinna inkubacja z laktacystyną w stężeniu 10 μ M skutkowała obniżeniem żywotności komórek o 16%. Po 12 godzinach inkubacji żywotność spadała o 52%, a po 24 godzinach o 73% w porównaniu z kontrolą. Cytotoksyczne działanie 10 μ M laktacystyny w 48 godzinie inkubacji dorównywało epoksomycynie i MG-132 powodując spadek żywotności komórek o ponad 97%.

Powyższe badania posłużyły do określenia najmniejszej dawki inhibitora, która powoduje całkowite zahamowanie aktywności ChT-L proteasomów i zapewnia maksymalny efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek Ab. Stężenie to dla epoksomycyny wyniosło 0,5 μ M a dla MG-132 5 μ M i w takim stężeniu związki te stosowano w dalszej części pracy. W przypadku laktacystyny najwyższe badane stężenie (10 μ M) co prawda nie powodowało całkowitej inhibicji proteasomów, jednak efekt cytotoksyczny po 48 godzinach działania dorównywał epoksomycynie i MG-132. Tak więc w dalszych doświadczeniach stosowano laktacystynę w stężeniu 10 μ M.

Na podstawie zmian żywotności określono również punkty czasowe do dalszych badań nad mechanizmami śmierci komórek Ab pod wpływem IP. Kolejne doświadczenia wykonywano w trzech punktach czasowych:

- 6 godzin – początek zmniejszania się żywotności komórek, spadek o około 20%,
- 12 godzin – spadek żywotności o około połowę,
- 24 godziny – spadek żywotności o około 80%.

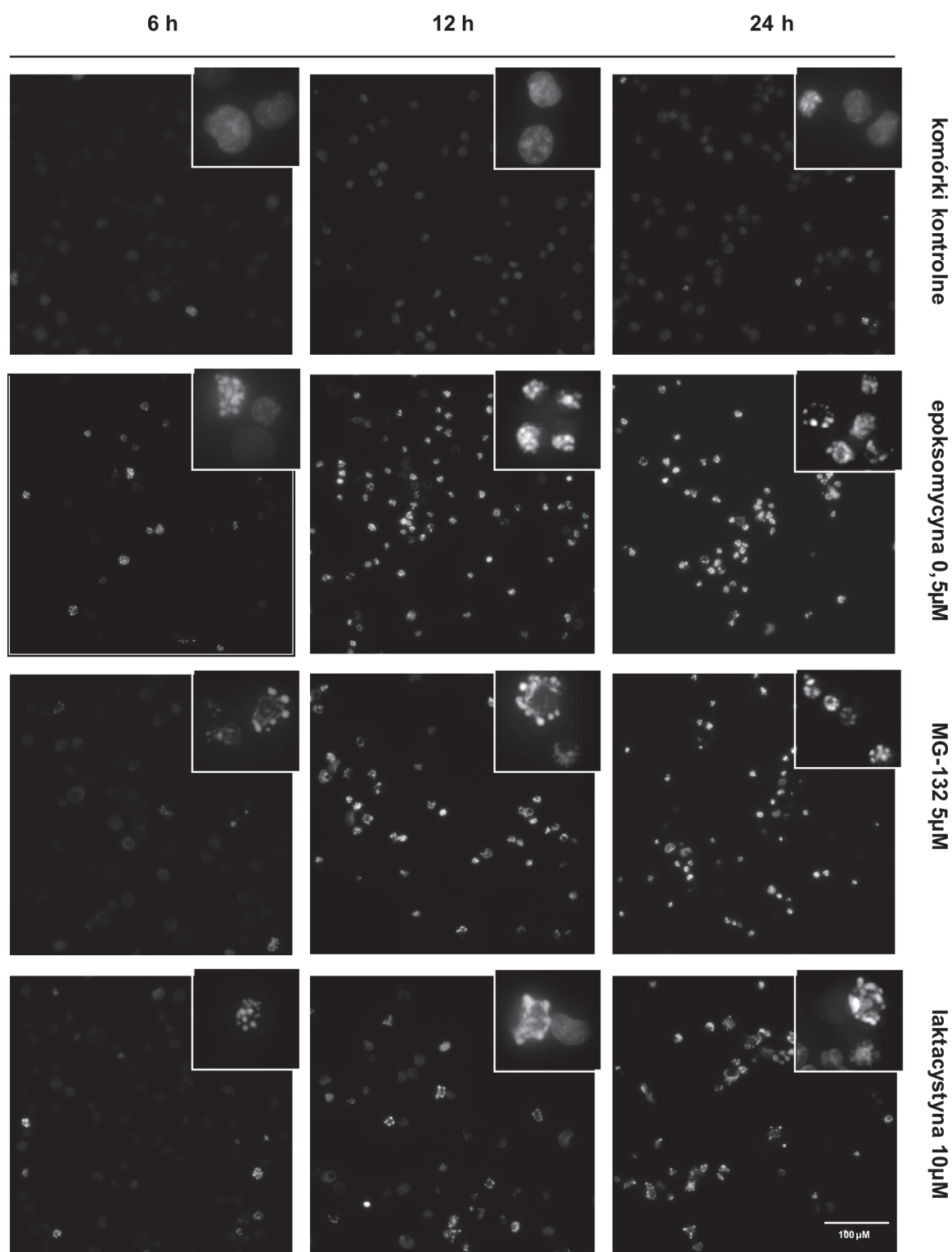
4.3. Inhibitory proteasomów powodują śmierć komórek Ab na drodze apoptozy

4.3.1. Kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jąder komórkowych

Jak wynika z oceny żywotności, działanie IP powodowało w trakcie 24 godzin śmierć znacznej części komórek, której wynikiem był spadek żywotności o około 80%. Aby sprawdzić, czy komórki Ab umierają na drodze apoptozy, oceniano towarzyszące apoptozie zmiany morfologiczne jąder komórkowych.

Jądra komórek kontrolnych przez cały czas trwania doświadczenia były jednolicie wybarwione, kształtu okrągłego lub „nerkowatego”. Epoksomycyna, MG-132 i laktacystyna powodowały zmianę morfologii jąder z prawidłowej na apoptotyczną, z wyraźną kondensacją chromatyny i fragmentacją jądra (ryc. 13).

Pojedyncze jądra apoptotyczne uwidaczniały się na preparatach już po 6 godzinach inkubacji z IP. Liczba komórek wykazujących zmiany jąder komórkowych zwiększała się w czasie i po 24 godzinach w przypadku każdego z badanych IP w większości komórek obserwowano apoptotyczną kondensację chromatyny. W znacznym odsetku komórek stwierdzono również charakterystyczną dla tego procesu fragmentację jądra.



Ryc. 13. Zmiany morfologii jąder komórek Ab poddanych działaniu IP przez 6, 12 lub 24 godziny i barwionych Hoechst 33342. Jądra apoptotyczne wykazują bardziej intensywną fluorescencję niż prawidłowe. Widoczna kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jąder.

4.3.2. Apoptotyczne zmiany w błonie komórkowej

Kolejnym analizowanym parametrem potwierdzającym apoptotyczną śmierć komórek były zmiany w strukturze błony komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny). Reprezentatywne wykresy z analizy cytometrycznej zebrano na ryc. 14.

Komórki linii Ab nawet w warunkach prawidłowych ulegają spontanicznej apoptozie, tak więc już w kontroli obserwowano komórki wczesno- i późnoapoptotyczne, przy czym odsetek obu populacji wynosił po około 10% przez cały czas trwania doświadczenia (tabela1).

Działanie każdego z badanych IP powodowało zwiększenie populacji początkowo komórek wczesnoapoptotycznych, a następnie późnoapoptotycznych, przy czym zmiany te zachodziły wolniej w przypadku laktacystyny niż epoksomycyny i MG-132.

Po 6 godzinach inkubacji z epoksomycyną i MG-132 zanotowano około dwukrotny, istotny ($p < 0,05$) wzrost odsetka komórek zarówno wczesnoapoptotycznych (An+/PI-) jak i późnoapoptotycznych (An+/PI+) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zmiany zachodzące pod wpływem laktacystyny były podobne, choć mniej nasilone. W 12 godzinie doświadczenia wielkość populacji komórek wczesnoapoptotycznych w przypadku epoksomycyny oraz MG-132 nie zmieniła się istotnie i wynosiła nadal około 20%. Jednocześnie nastąpił znamieny ($p < 0,05$) wzrost populacji komórek An+/PI- dla laktacystyny. W tym czasie odnotowano również istotne, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zwiększenie liczby komórek An+/PI+ do 50-60%. Ponownie działanie epoksomycyny i MG-132 było znamienne statystycznie ($p < 0,05$) i silniejsze niż laktacystyny.

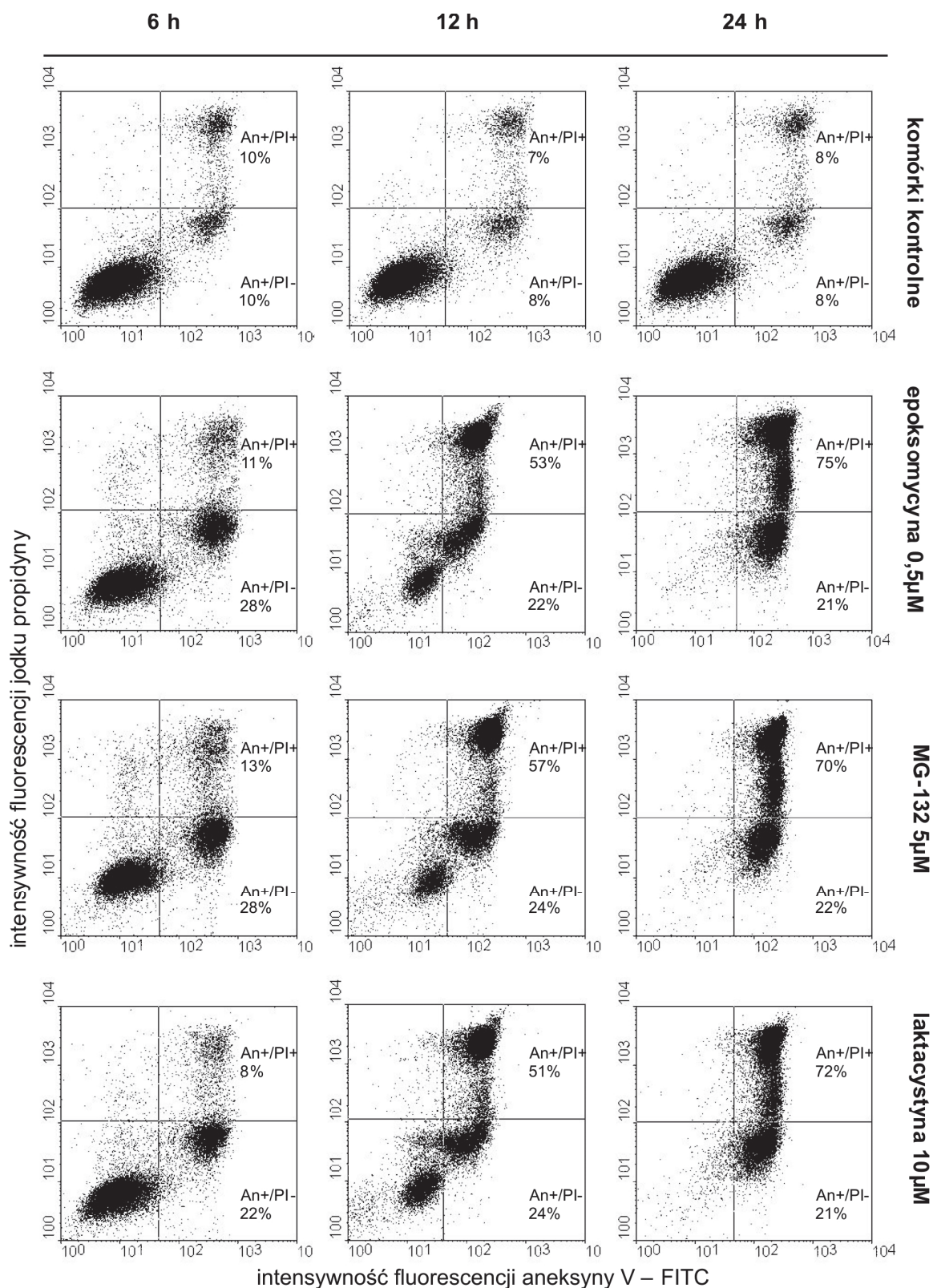
Po 24 godzinach działanie IP powodowało dalszy wzrost populacji zarówno komórek wczesno- jak i późnoapoptotycznych. W przypadku każdego z badanych inhibitorów liczba komórek An+/PI- wzrosła do 27%, An+/PI+ do około 70%. Obie populacje były istotnie większe niż w komórkach kontrolnych ($p < 0,05$).

Tak więc po 24 godzinach działania zarówno epoksomycyny, jak i MG-132 lub laktacystyny, 97% komórek Ab wykazywało cechy wczesnej lub późnej apoptozy (tabela1. 24h; suma populacji (An+/PI-) + (An+/PI+)).

Tabela 1. Zmiany odsetka wczesnoapoptotycznych (An+/PI-) i późnoapoptotycznych (An+/PI+) komórek Ab inkubowanych z IP przez 6, 12 lub 24 godziny. Dane w tabeli podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z czterech niezależnych doświadczeń.

czas inkubacji	Odsetek komórek wykazujących eksternalizację PS (An+)		inhibitor proteasomów
	An+/PI- (wczesnopapoptotyczne)	An+/PI+ (późnoapoptotyczne)	
6h	12,1 (\pm 2,1)	8,7 (\pm 2,1)	brak
	26,7 (\pm 3,3) *	12,7 (\pm 2,8) *	epoksomycyna 0,5μM
	25,0 (\pm 2,6) *	14,1 (\pm 3,7) *	MG-132 5μM
	22,3 (\pm 3,6)	11,1 (\pm 2,2)	laktacystyna 10μM
12h	10,3 (\pm 2,0)	9,1 (\pm 1,9)	brak
	19,0 (\pm 3,8) *	60,5 (\pm 5,8) *	epoksomycyna 0,5μM
	21,0 (\pm 4,4) *	56,8 (\pm 1,3) *	MG-132 5μM
	21,3 (\pm 3,7) *	50,0 (\pm 0,7)	laktacystyna 10μM
24h	9,9 (\pm 1,6)	9,0 (\pm 1,8)	brak
	27,1 (\pm 5,5) *	71,8 (\pm 6,3) *	epoksomycyna 0,5μM
	27,1 (\pm 4,5) *	68,3 (\pm 1,4) *	MG-132 5μM
	27,3 (\pm 5,4) *	68,1 (\pm 4,4) *	laktacystyna 10μM

* Statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica w porównaniu do komórek kontrolnych.



Ryc. 14. Reprezentatywne wykresy typu „dot plot” z analizy cytometrycznej komórek Ab poddanych działaniu IP przez 6, 12 lub 24 godziny i wybarwionych aneksyną V oraz jodkiem propidyny. (An+/PI-) - komórki wczesnoapoptotyczne; (An+/PI+) - komórki późnoapoptotyczne.

4.3.3. Aktywacja kaspazy 3

Indukcję apoptozy pod wpływem IP w komórkach Ab analizowano także na podstawie najważniejszego biochemicznego parametru tego procesu, jakim jest aktywacja kaspazy 3. Aktywację, która zachodzi poprzez proteolityczne cięcie cząsteczki proenzymu na podjednostki aktywne, oceniano po pierwsze na podstawie obecności tychże podjednostek aktywnych, a po drugie na podstawie zmniejszenia ilości białka proenzymu (prokaspazy) (ryc. 15A).

Analiza aktywacji kaspazy 3 wykazała, że w komórkach kontrolnych białko proenzymu (prokaspazy 3) o wielkości 32 kD występuje na stałym poziomie przez cały czas trwania badania. Przez ten czas nie stwierdzono obecności jednostek aktywnych kaspazy 3.

W komórkach inkubowanych w obecności epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny jednostka aktywna o wielkości 17kD była obecna już po 6 godzinach inkubacji i jej ilość rosła z czasem aż do 24 godziny badania. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla prokaspazy 3, która była obecna w komórkach, ale jej ilość spadała w miarę upływu czasu. Po 6 godzinach inkubacji z IP obserwowano jeszcze wysoki poziom prokaspazy 3, porównywalny z poziomem w próbkach kontrolnych. Natomiast w 12 i 24 godzinie badania ilość prokaspazy 3 spadała. Uzyskane wyniki były podobne dla każdego ze stosowanych IP.

4.4. Inhibitory proteasomów indukują w komórkach Ab szlak mitochondrialny apoptozy

Przeprowadzone badania dowodzą, że działanie cytotoksyczne IP w stosunku do linii komórek Ab polega na indukcji śmierci komórki na drodze apoptozy. Udział szlaku mitochondrialnego w tym procesie oceniano na podstawie aktywacji kaspazy 9 oraz wpływu cytochromu C i białka AIF z mitochondriów.

4.4.1. Aktywacja kaspazy 9

Aktywację kaspazy 9 oceniano, tak jak w przypadku kaspazy 3, na podstawie obecności podjednostek aktywnych oraz zmniejszenia ilości białka proenzymu (prokaspazy) (ryc. 15B).

	kontrola	epoksomycyna 0,5µM	MG-132 5µM	laktacystyna 10µM
A kaspaza 3	<p>6h 12h 24h</p> <p>32kD - prokaspaza 17kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>32kD - prokaspaza 17kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>32kD - prokaspaza 17kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>32kD - prokaspaza 17kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>
B kaspaza 9	<p>6h 12h 24h</p> <p>46kD – prokaspaza 35/37kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>46kD – prokaspaza 35/37kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>46kD – prokaspaza 35/37kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>	<p>6h 12h 24h</p> <p>46kD – prokaspaza 35/37kD – jednostka aktywna 42kD – β-aktyna</p>

Ryc. 15. Aktywacja kaspazy 3 (A) oraz kaspazy 9 (B) w komórkach Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji. β-aktynę analizowano jako standard wewnętrzny potwierdzający jednakową ilość białka całkowitego w ocenianych próbkach.

W komórkach kontrolnych, białko proenzymu kaspazy 9 o wielkości 46 kD (prokaspaza-9) było obecne na stałym poziomie przez cały czas trwania doświadczenia. W komórkach tych nie obserwowano ponadto obecności podjednostek aktywnych kaspazy 9, niezależnie od czasu inkubacji.

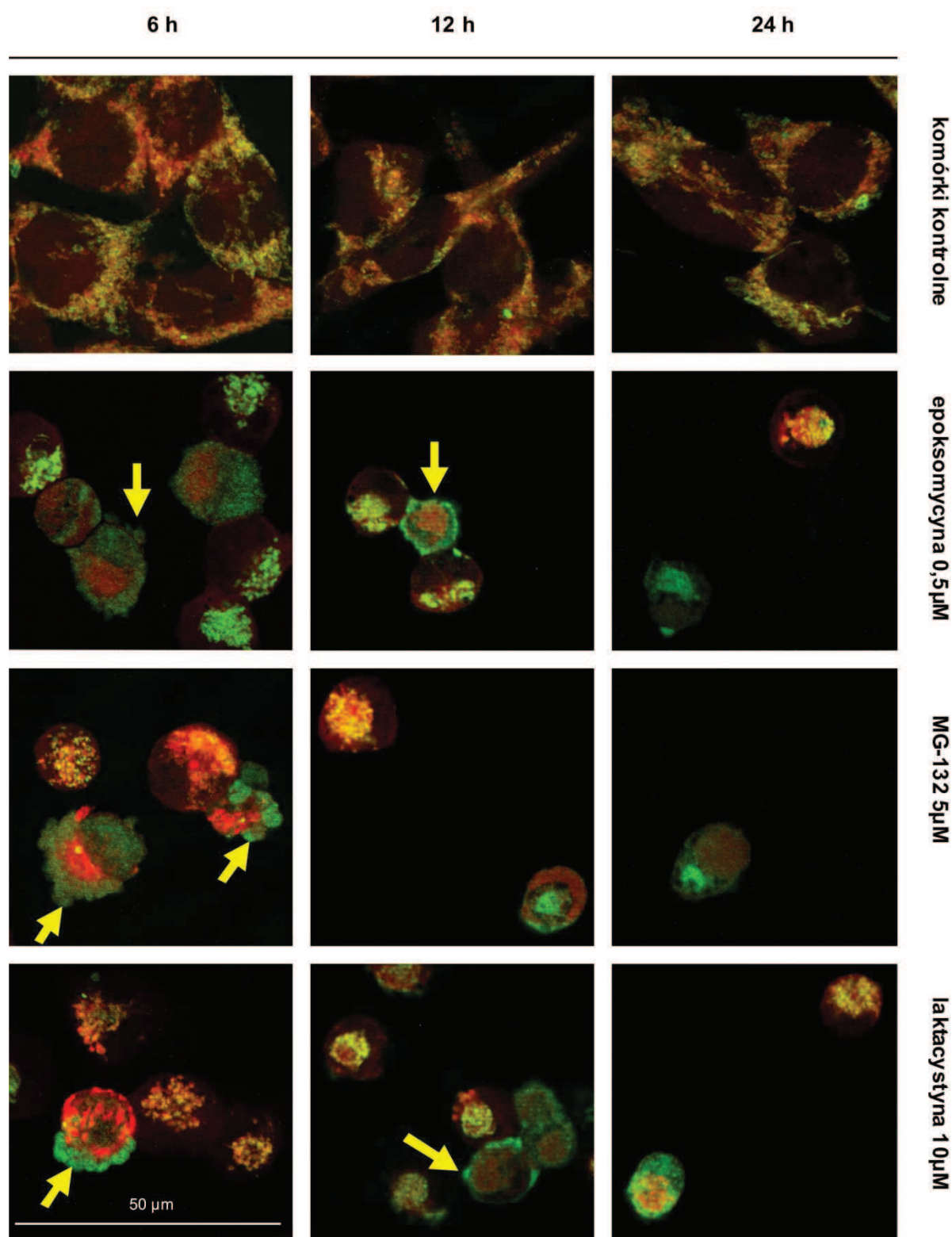
W komórkach inkubowanych z epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną podjednostki aktywne kaspazy 9 (o wielkości 35 i 37 kD) obecne były już po 6 godzinach i utrzymywały się aż do 24 godziny doświadczenia, lecz nie zanotowano znaczących zmian ich poziomu. Przez ten czas zmniejszała się także ilość białka prokaspazy 9. Uzyskane wyniki były podobne dla każdego ze stosowanych IP.

4.4.2. Uwalnianie cytochromu C z mitochondriów

Zmiany lokalizacji cytochromu C w komórkach Ab analizowano w mikroskopie konfokalnym (ryc. 16).

Mitochondria komórek kontrolnych przez cały okres trwania badania zachowywały kształt nitkowaty i były równomiernie rozproszone w cytoplazmie. W komórkach tych stwierdzono niemalże całkowitą lokalizację cytochromu C w mitochondriach.

Po 6 godzinach inkubacji tak z epoksomycyną, jak i MG-132 lub laktacystyną morfologia komórek uległa zmianie przy czym zmiany te były podobne dla każdego z badanych związków. Komórki uległy obkurczeniu, co jest jedną z podstawowych cech apoptozy. Wyraźnym zmianom uległ kształt i dystrybucja mitochondriów. Mitochondria stały się pęcherzykowate i z peryferyjnej części cytoplazmy przesunęły się w kierunku jądra komórkowego. W dużej części komórek stwierdzono obecność cytochromu C w cytoplazmie. W większości wypadków cytochrom C rozłożony był równomiernie w całej cytoplazmie komórkowej, lecz w części komórek dodatkowo obserwowano charakterystyczne dla apoptozy „pączkowanie” błony komórkowej i w tych przypadkach cytochrom C gromadził się przede wszystkim w pączkujących fragmentach błony. W 12 godzinie doświadczenia obserwowano kontynuację zjawisk zauważonych wcześniej, a dodatkowo stwierdzono też wyraźnie słabszą fluorescencję mitochondriów, co świadczy o spadku ich aktywności. Obserwowane mitochondria tworzyły pojedynczy agregat na obwodzie jądra komórkowego. W dalszym ciągu w części komórek obserwowano obecność cytochromu C w cytoplazmie. W niektórych komórkach widoczne było nadal „pączkowanie” błony komórkowej i gromadzenie się cytochromu C w tych obszarach. Po 24 godzinach działania IP na preparatach mikroskopowych obserwowano już tylko nieliczne komórki, o nieaktywnych lub bardzo mało



Ryc. 16. Uwalnianie cytochromu C z mitochondriów komórek Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 lub 24 godzinach. Aktywne mitochondria uwidoczniło kolorem czerwonym. Kolorem zielonym wybarwiono cytochrom C. W komórkach kontrolnych cytochrom C zlokalizowany jest w mitochondriach. W komórkach inkubowanych z IP cytochrom C widoczny jest w cytoplazmie. Strzałkami zaznaczono pęczkowanie błony komórkowej komórek apoptotycznych.

aktywnych mitochondriach zgromadzonych w pobliżu jądra komórkowego. W większości z nich cytochrom C lokalizował się w cytoplazmie.

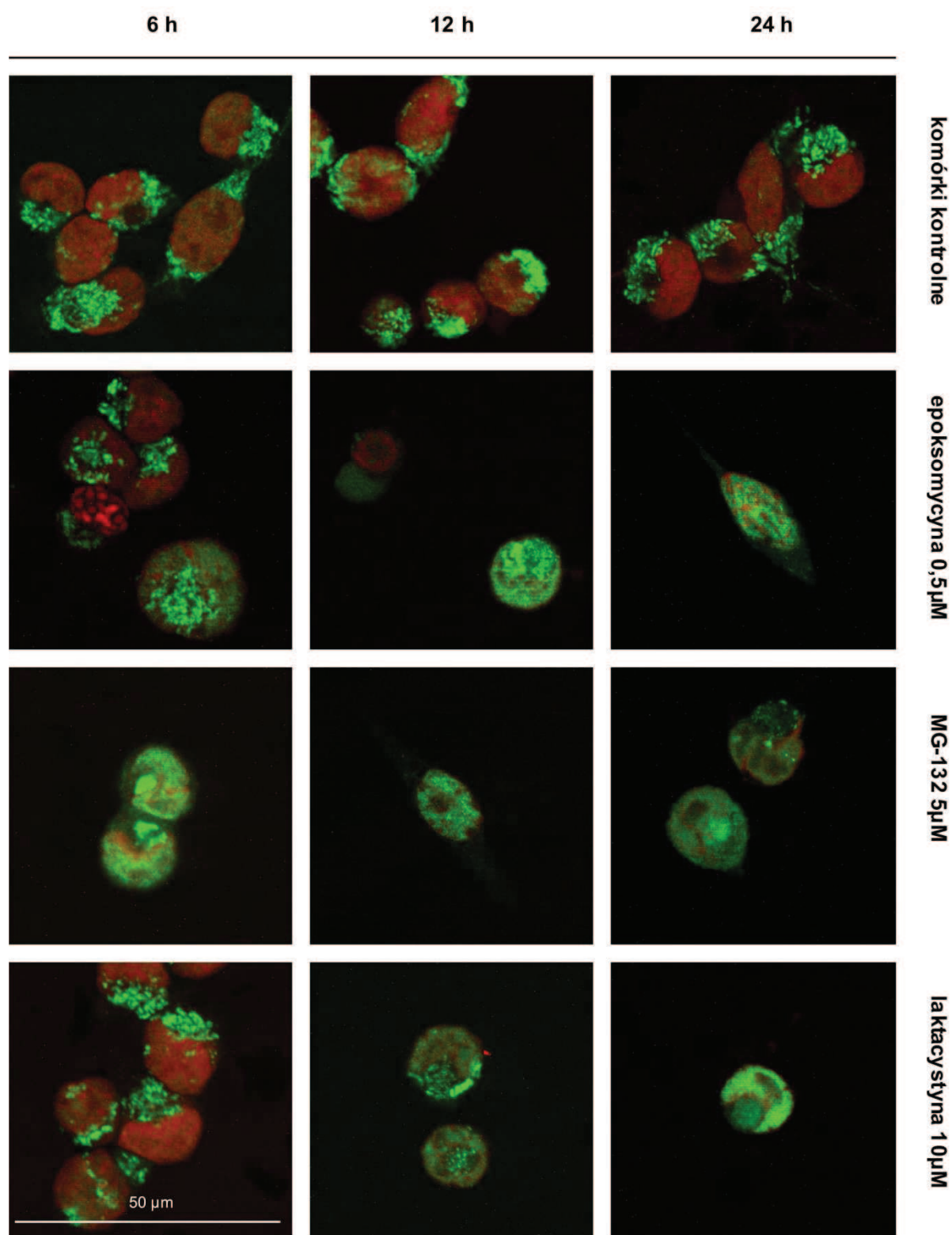
4.4.3. Uwalnianie białka AIF z mitochondriów

Zmiany lokalizacji AIF w komórce analizowano w mikroskopie konfokalnym (ryc. 17).

AIF w komórkach kontrolnych przez cały okres inkubacji zlokalizowany był wyłącznie w mitochondriach, które uwidoczniły się jako nitkowate struktury równomiernie rozproszone w cytoplazmie. Jądra komórkowe, o okrągłym lub nerkowatym kształcie, były wyraźnie odgraniczone od mitochondriów zawierających AIF. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja AIF uległa zmianie po 6 godzinach działania epoksomycyny lub MG-132. W wielu komórkach obserwowano różne fazy translokacji AIF z mitochondriów. W niektórych mitochondria zawierały wciąż znaczne ilości AIF, choć jego część wydostała się już do cytoplazmy. W innych komórkach widoczna była całkowita i prawie równomierna dyfuzja AIF w całej cytoplazmie. Natomiast 6-godzinna inkubacja z laktacystyną nie przyniosła widocznych zmian w rozmieszczeniu AIF, który nadal zlokalizowany był w nitkowatych lub ziarenkowatych mitochondriach.

12-godzinna inkubacja w przypadku każdego stosowanego IP powodowała uwalnianie AIF z mitochondriów we wszystkich komórkach. AIF obecny był zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórkowych. Tylko w nielicznych przypadkach AIF lokalizował się nadal częściowo w mitochondriach. W tym czasie nie obserwowano już znaczących różnic między działaniem laktacystyny a epoksomycyny lub MG-132.

Po 24-godzinach działania każdego z badanych IP na preparatach mikroskopowych widoczne były tylko pojedyncze komórki. We wszystkich obserwowano obecność AIF w cytoplazmie i jądrze komórkowym albo w samym jądrze komórkowym.



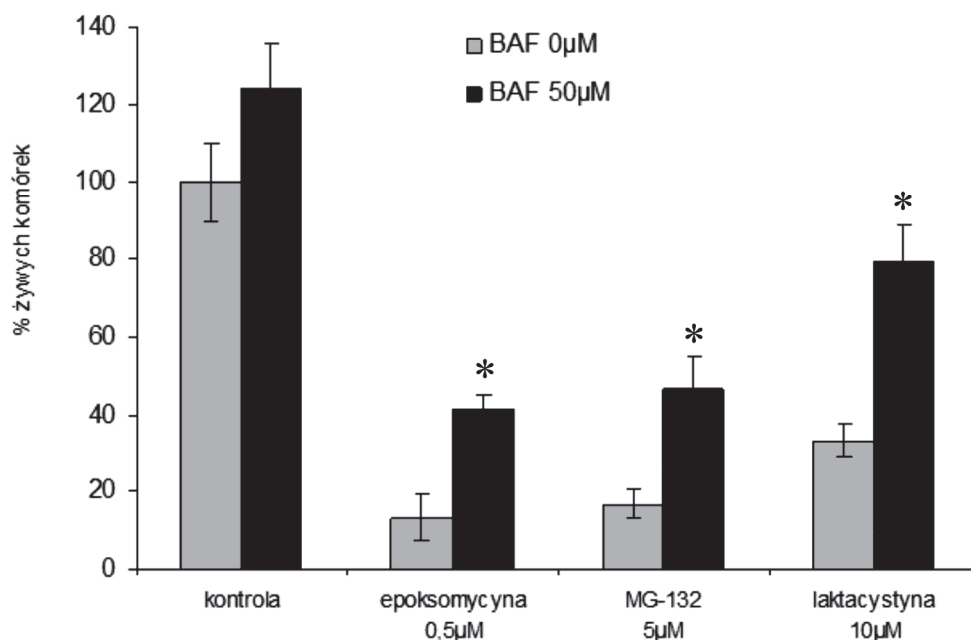
Ryc. 17. Uwalnianie AIF z mitochondriów w komórkach Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 lub 24 godzinach. Kolorem czerwonym wybarwiono jądra komórkowe. Kolorem zielonym wybarwiono AIF. AIF w komórkach kontrolnych zlokalizowany jest w całości w mitochondriach. Widoczna jest translokacja AIF z mitochondriów do cytoplazmy i jądra komórkowego pod wpływem działania IP.

4.5. Śmierć komórek Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów odbywa się częściowo na drodze apoptozy kaspazoniezależnej

Aby ocenić udział apoptozy kaspazoniezależnej w ogólnym procesie śmierci komórek pod wpływem IP zastosowano inhibitor kaspaz Boc-D-FMK (BAF) o szerokim spektrum działania.

4.5.1. Inhibitor kaspaz BAF hamuje spadek żywotności komórek

W komórkach kontrolnych 24-godzinna inkubacja z BAF powodowała niewielki wzrost żywotności (do około 124%) w porównaniu do komórek nie poddanych jego działaniu (ryc. 18). W tym samym czasie, tak jak to stwierdzono wcześniej (patrz: rozdział 4.2), epoksomycyna, MG-132 oraz laktacystyna znacząco obniżały żywotność komórek. Po 24 godzinach spadała ona o ponad 80% w komórkach inkubowanych z epoksomycyną lub MG-132, a w komórkach traktowanych laktacystyną o około 75%.



Ryc. 18. Wpływ inhibitora kaspaz BAF na żywotność komórek Ab po 24 godzinach inkubacji w obecności IP. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

* Statystycznie istotna ($p < 0,01$) różnica między komórkami inkubowanymi z lub bez BAF.

Działanie inhibitora kaspaz BAF częściowo, lecz nie całkowicie, hamowało ten proces. Obecność BAF w środowisku komórek inkubowanych z IP prowadziła po 24 godzinach do około dwu- lub trzykrotnie mniejszego spadku żywotności komórek, a różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,01$). W przypadku epoksomycyny żywotność zmniejszała się jedynie o 59%, dla MG-132 o 53%, a dla laktacystyny jedynie o 20% wartości kontrolnych.

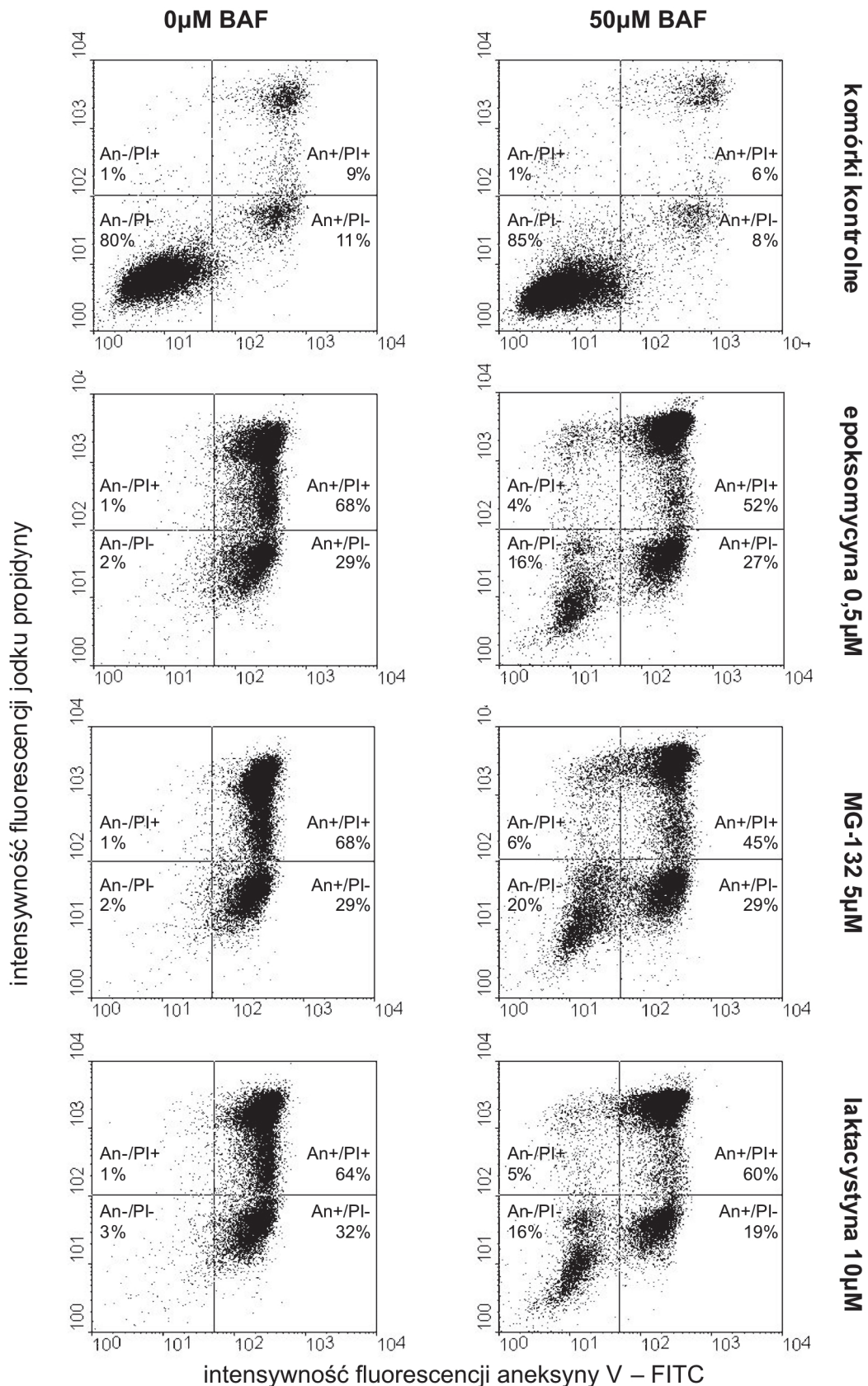
4.5.2. Inhibitor kaspaz BAF hamuje apoptotyczne zmiany w błonie komórkowej

Wcześniejsze badania wykazały (patrz rozdział 4.3.2), że zastosowane IP po 24-godzinach działania powodują istotne zwiększenie puli komórek zarówno wczesno- (An+/PI-) jak i późnoapoptotycznych (An+/PI+), przy równoczesnym spadku liczby żywych komórek (An-/PI-) do kilku procent. W obecności BAF zmiany apoptotyczne w błonie komórkowej i śmierć komórek pod wpływem IP następowały znacząco wolniej (tabela 2). Reprezentatywne wykresy z analizy cytometrycznej zebrano na ryc. 19.

Tabela 2. Wpływ inhibitora kaspaz BAF na zmiany odsetka żywych (An-/PI-), wczesnoapoptotycznych (An+/PI-) i późnoapoptotycznych (An+/PI+) komórek Ab po 24-godzinach inkubacji z IP. Dane w tabeli podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

inhibitor kaspaz		Odsetek komórek An-/PI- (żywe)	Odsetek komórek wykazujących eksternalizację PS (An+)		inhibitor proteasomów
			An+/PI- (wczesno-apoptotyczne)	An+/PI+ (późno-apoptotyczne)	
BAF 50 μ M	-	80,5(\pm 3,1)	9,9 (\pm 1,6)	9,0 (\pm 1,8)	brak
	+	85,7(\pm 2,3)	7,8 (\pm 1,6)	5,2 (\pm 0,2)	
	-	3,6 (\pm 2,5)	27,1(\pm 5,5)	71,8(\pm 6,3)	epoksomycyna 0,5 μ M
	+	12,0(\pm 3,9) *	25,2(\pm 3,4)	57,6(\pm 5,4) *	
	-	3,7 (2,9)	27,1 (\pm 4,5)	68,3 (\pm 1,4)	MG-132 5 μ M
	+	18,8 (\pm 4,2) *	22,4 (\pm 6,6)	54,5 (\pm 6,3) *	
	-	3,5 (\pm 1,7)	27,3 (\pm 5,4)	68,1 (\pm 4,4)	laktacystyna 10 μ M
	+	14,7 (\pm 5,2) *	21,9 (\pm 5,5)	58,8 (\pm 9,1)	

* Statystycznie istotna ($p \leq 0,05$) różnica między komórkami inkubowanymi z lub bez BAF.



Ryc. 19. Reprezentatywne wykresy typu „dot plot” z analizy cytometrycznej komórek Ab wybarwionych aneksyną V oraz jodkiem propidyny po 24 godzinach inkubacji z IP w obecności inhibitora kaspaz BAF. (An-/PI-) – komórki żywe; (An+/PI-) - komórki wczesnoapoptotyczne; (An+/PI+) - komórki późnoapoptotyczne.

Po 24 godzinach w komórkach kontrolnych, nie poddawanych działaniu IP, BAF powodował istotny ($p \leq 0,05$) spadek populacji komórek An+/PI+ z 9% do 5%, oraz jednocześnie wzrost populacji komórek żywych An-/PI- z 80% do 85%. W populacji komórek An+/PI- nie zanotowano istotnych zmian.

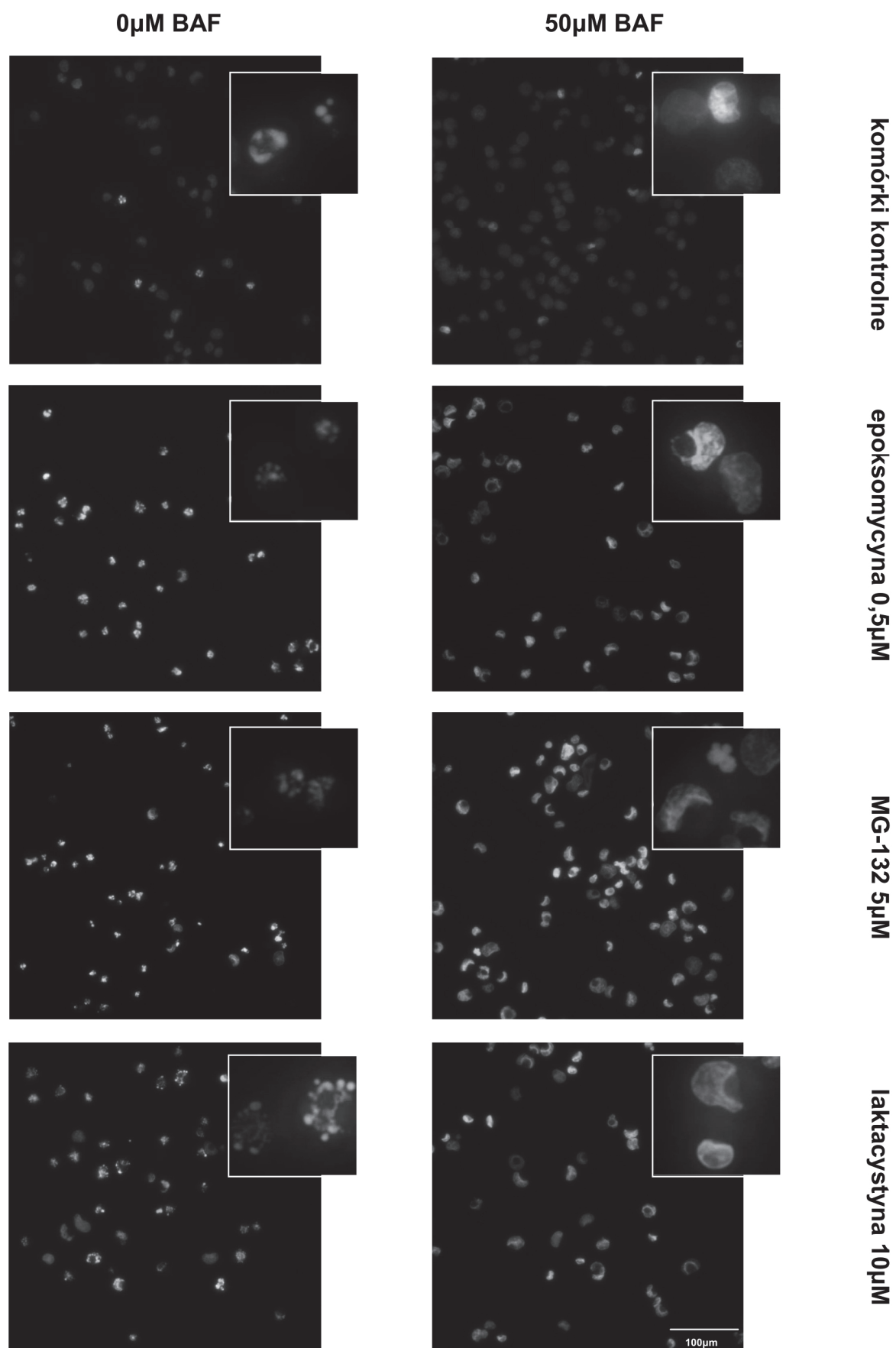
Wśród komórek inkubowanych z IP znamienne więcej ($p \leq 0,05$) komórek pozostawało żywych (An-/PI-) w obecności BAF. Pod wpływem BAF po 24 godzinach działania IP odsetek komórek An-/PI- zwiększył się z około 3,5% do 12 – 20%. W przypadku epoksomycyny i MG-132, lecz nie laktacystyny, w obecności BAF zanotowano także istotnie mniej ($p \leq 0,05$) komórek późnoapoptotycznych (An+/PI+). W przypadku epoksomycyny ich ilość spadła z 72% do 57%. Dla MG-132 odsetek ten zmniejszył się z 68% do 54%, a dla laktacystyny z 68% do 59%. Jednocześnie zastosowanie BAF nie obniżyło istotnie odsetka komórek An+/PI-, utrzymywał się stale na poziomie około 27%.

Dla wszystkich badanych IP w obecności BAF liczba komórek, które po 24-godzinach weszły na drogę apoptozy zmniejszyła się z 97% do około 80% (tabela 2; suma populacji (An+/PI-) oraz (An+/PI+))

4.5.3. Inhibitor kaspaz BAF hamuje fragmentację jąder komórkowych

W komórkach kontrolnych, niezależnie od obecności BAF, po 24 godzinach inkubacji obserwowano tylko pojedyncze jądra o morfologii apoptotycznej (ryc. 20).

We wcześniejszych badaniach (patrz: rozdział 4.3.1) obserwowano duży wzrost liczby jąder apoptotycznych w komórkach poddanych działaniu każdego z IP. Po 24 godzinach działania epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny większość komórek w populacji wykazywała cechy kondensacji i fragmentacji jądra. Obecność BAF hamowała te zmiany. Wśród komórek poddanych działaniu IP w obecności BAF w większości jąder komórkowych stwierdzono kondensację chromatyny, jednak nie dochodziło do fragmentacji jądra.



R

Ryc. 20. Wpływ inhibitora kaspaz BAF na zmiany morfologiczne jąder komórek Ab poddanych 24-godzinnemu działaniu IP. Barwienie Hoechst 33342.

4.6. Inhibitory proteasomów nie zatrzymują cyklu komórkowego komórek Ab

Wpływ zahamowania aktywności proteasomów na cykl komórkowy analizowano poprzez pomiar zawartości DNA w komórkach. Na tej podstawie oceniano odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu w całej populacji. Graficzne wyniki analizy przedstawia ryc. 21. Reprezentatywne histogramy przedstawiające zmiany cyklu komórkowego spowodowane działaniem IP zebrano na ryc. 22.

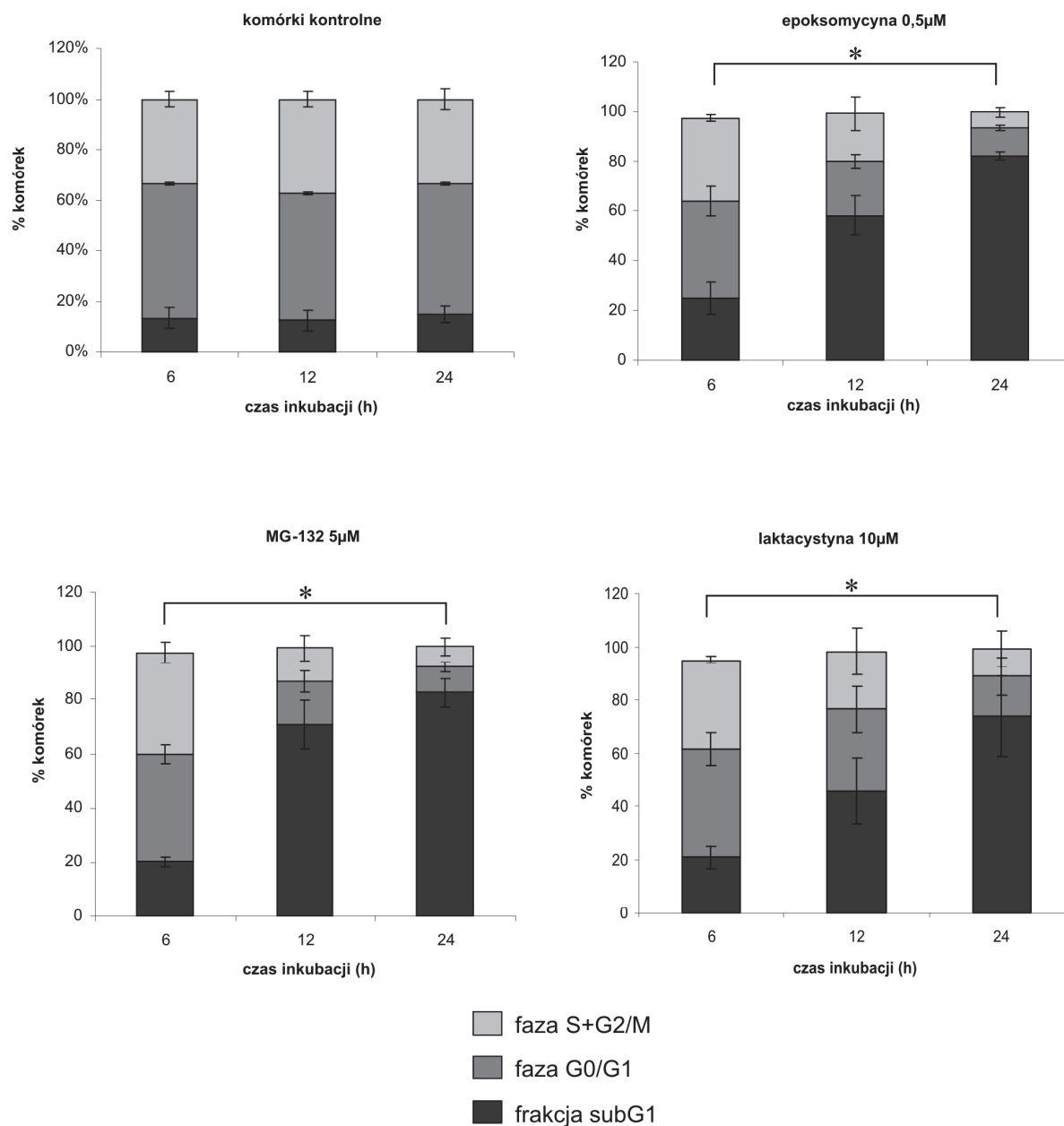
W trakcie całego doświadczenia rozkład komórek kontrolnych w poszczególnych fazach cyklu nie zmieniał się istotnie i wynosił: około 34% w fazie S+G2/M (komórki dzielące się) i około 50% w fazie G0/G1 (faza spoczynkowa). Około 12% komórek lokalizowało się w obszarze subG1, gdzie zgromadzą się komórki o obniżonej zawartości DNA, głównie ciała apoptotyczne.

Działanie wszystkich trzech IP w wybranych stężeniach nie prowadziło do zwiększenia liczby komórek w fazie S+G2/M, co byłoby objawem zatrzymania cyklu komórkowego. Przeciwnie, zahamowanie aktywności proteasomów powodowało istotny spadek odsetka komórek dzielących się ($p < 0,05$). Znacząco zmniejszeniu ($p < 0,05$) ulegała również liczba komórek w fazie G0/G1. Wpływ epoksomycyny, MG-132 i laktacystyny był podobny i nie zanotowano różnic w dynamice ich działania.

Przez pierwszych 6 godzin inkubacji z IP liczba komórek w fazie S+G2/M nie podlegała istotnym zmianom i tak jak w komórkach kontrolnych wynosiła 34%. Jednak po 12 godzinach inkubacji odsetek ten spadał do 19% w przypadku epoksomycyny, 12% dla MG-132 i 23% dla laktacystyny. W 24 godzinie doświadczenia w fazie S+G2/M pozostawało już tylko 6% komórek poddanych działaniu epoksomycyny oraz 10% komórek traktowanych MG-132 lub laktacystyną.

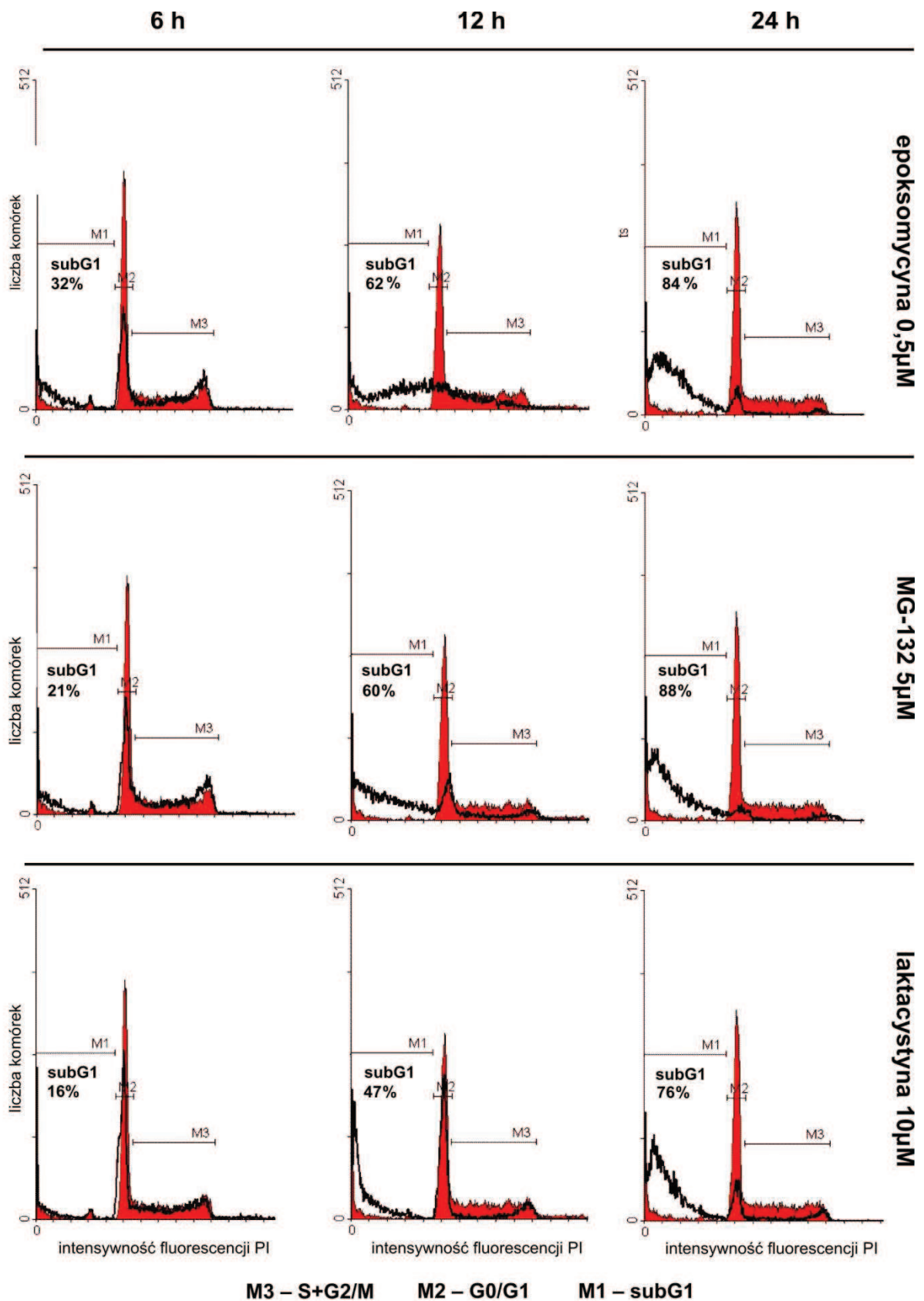
W podobny sposób badane IP powodowały spadek odsetka komórek w fazie spoczynkowej. Liczba komórek w fazie G0/G1 po 6 godzinach inkubacji zmniejszała się z 50% w komórkach kontrolnych do około 40% w przypadku każdego z IP. W 12 godzinie doświadczenia ich odsetek wynosił 22% dla epoksomycyny, 16% dla MG-132 i 35% dla laktacystyny. Po 24 godzinach komórki w fazie G0/G1 stanowiły już tylko 11- 15% populacji.

Działanie epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny prowadziło natomiast w miarę upływu czasu do wzrostu liczby komórek w obszarze subG1, gdzie akumulują się między innymi ciała apoptotyczne. Po 6 godzinach inkubacji w obszarze subG1 zlokalizowanych było 20-25% komórek w przypadku każdego z badanych IP, co jest około dwukrotnym



Ryc. 21. Zmiany cyklu komórkowego komórek Ab pod wpływem działania IP przez 6, 12 lub 24 godziny. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

* Statystycznie istotna ($p < 0,05$) różnica w odsetku komórek w fazach G0/G1 i S+G2/M oraz we frakcji subG1.



Ryc. 22. Reprezentatywne histogramy z analizy zmian cyklu komórkowego komórek Ab poddanych działaniu IP przez 6, 12 lub 24 godziny. Na każdym histogramie czerwonym wypełnieniem oznaczono rozkład komórek kontrolnych, a czarną linią - komórek inkubowanych z badaniem IP.

wzrostem w stosunku do komórek kontrolnych, dla których odsetek ten wynosił 12%. 12-godzinne działanie IP powodowało dalszy wzrost frakcji subG1 do 58% dla epoksomycyny, 70% dla MG-132 oraz 40% dla laktacystyny. Po 24 godzinach większość komórek w populacji znajdowała się już we frakcji subG1: było to 82% dla epoksomycyny i MG-132 oraz 73% dla laktacystyny.

Ponieważ wraz ze wzrostem frakcji subG1 spadał odsetek komórek w fazach S+G2/M oraz G0/G1 należy przyjąć, że komórki gromadzące się w obszarze subG1 pochodziły zarówno z populacji komórek w fazie spoczynkowej, jak i dzielących się.

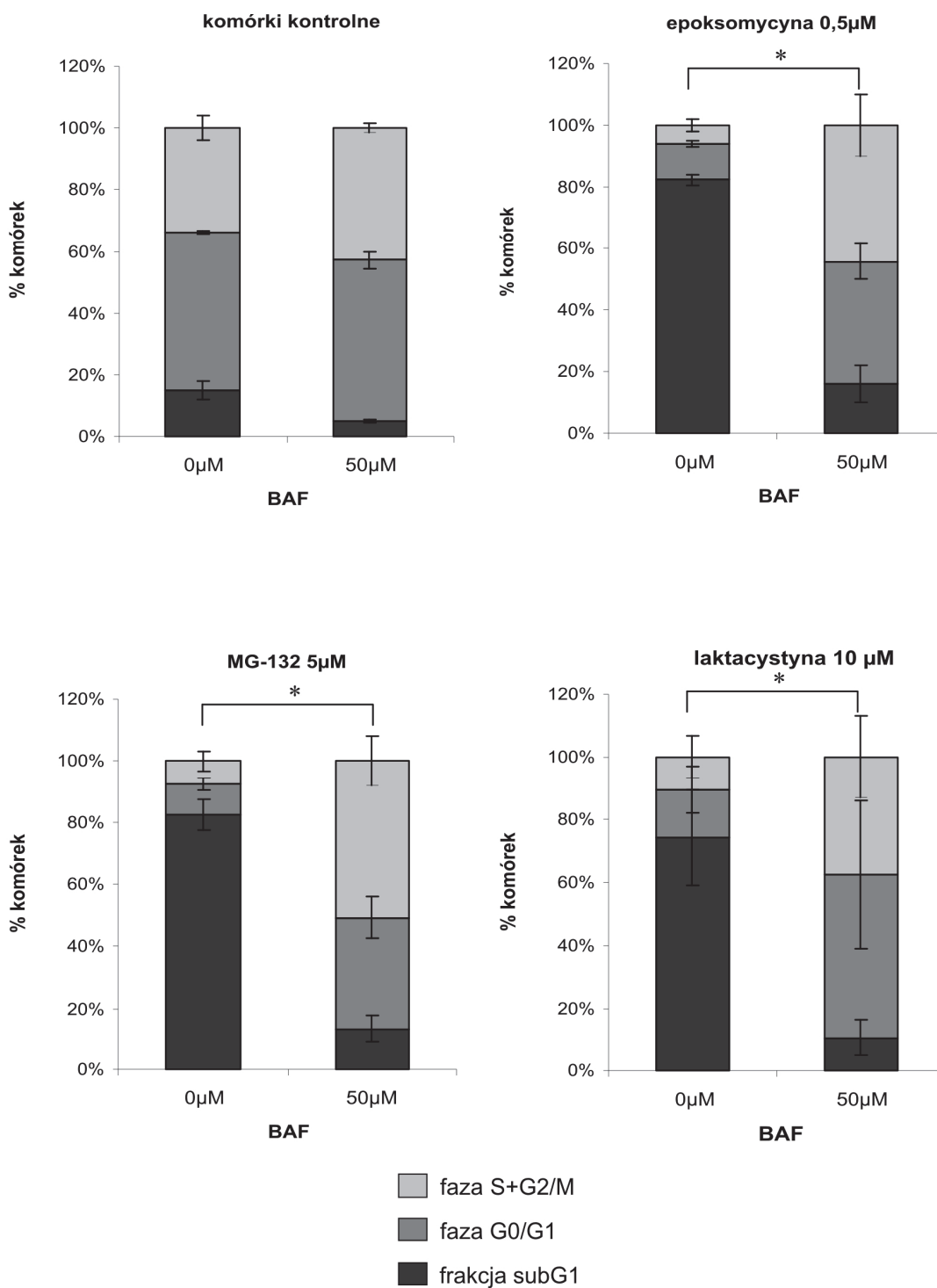
4.6.1. Inhibitor kaspaz BAF hamuje akumulację komórek we frakcji subG1

Na podstawie pomiaru zawartości DNA w komórkach analizowano cykl komórkowy komórek Ab inkubowanych z IP w obecności inhibitora kaspaz BAF. Graficzne wyniki analizy przedstawia ryc. 23. Reprezentatywne histogramy przedstawiające wpływ BAF na zmiany cyklu komórkowego spowodowane działaniem IP przedstawiono na ryc. 24.

Zarówno w kontroli, jak i komórkach poddanych działaniu epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny obserwowano pod wpływem BAF mniejszą akumulację komórek o obniżonej zawartości DNA (frakcja subG1). Dla komórek inkubowanych z IP działanie BAF było znamienne statystycznie ($p < 0.001$). W komórkach inkubowanych z IP stwierdzono również pod wpływem BAF wzrost odsetka komórek w fazie podziału (faza S+G2/M).

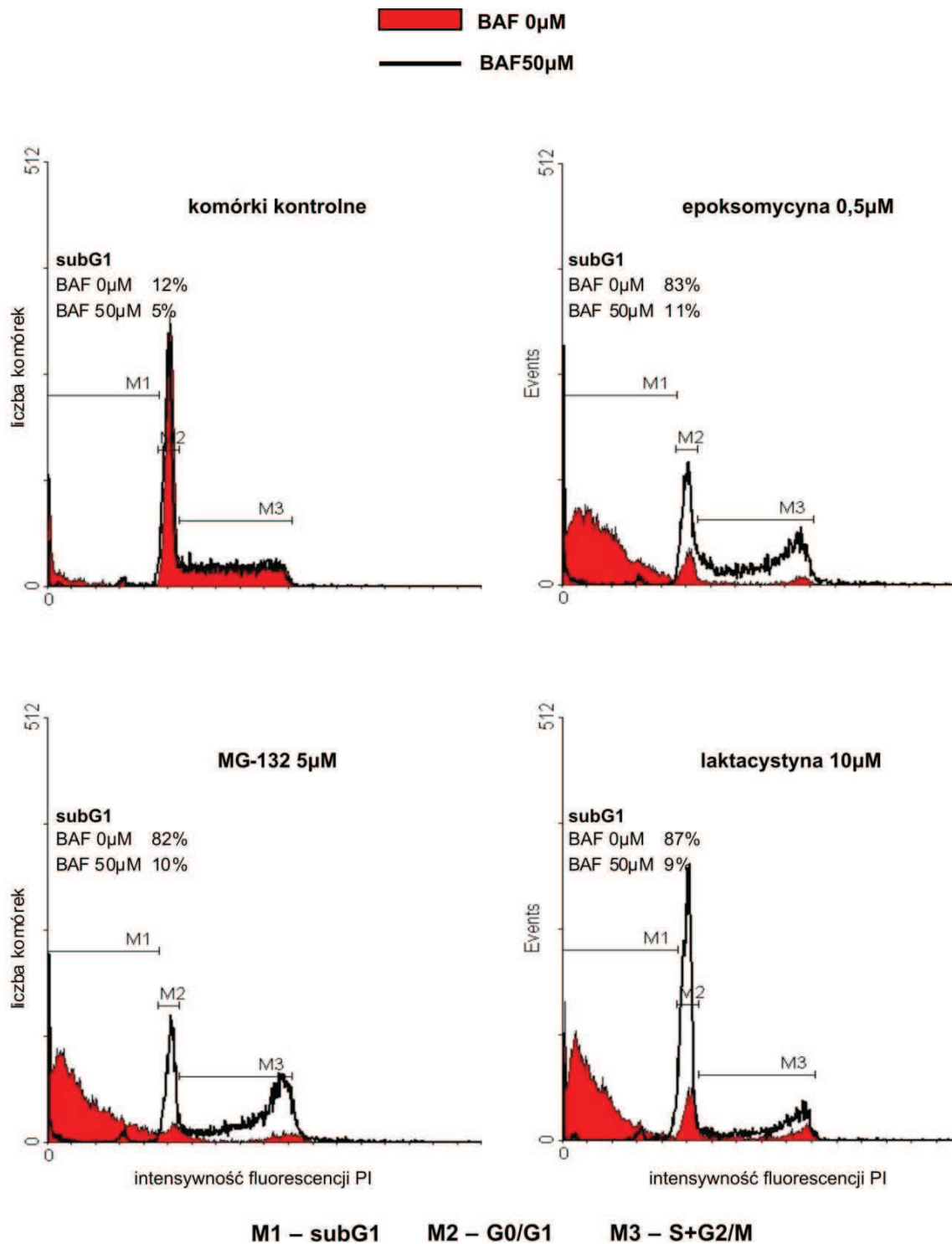
W komórkach kontrolnych, niepoddawanych działaniu IP, obecność BAF po 24 godzinach powodowała wzrost liczby komórek w fazie S+G2/M (komórki dzielące się) z 34% do 42%. Odsetek komórek w fazie spoczynkowej cyklu (G0/G1) nie zmieniał się i w obu przypadkach wynosił 50%, spadała natomiast liczba komórek we frakcji subG1. Dla komórek kontrolnych hodowanych bez BAF wynosiła ona 14%, dla komórek inkubowanych z BAF jedynie 4%.

Jak stwierdzono wcześniej (patrz: rozdział 4.6), IP powodowały gromadzenie się komórek Ab o zmniejszonej zawartości DNA w obszarze subG1. Pod wpływem 24-godzinnego działania epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny frakcja subG1 w populacji zwiększała się z 14% w do 75 – 80%. Obecność BAF hamowała ten proces.



Ryc. 23. Wpływ inhibitora kaspaz BAF na cykl komórkowy komórek Ab po 24 godzinach inkubacji w obecności IP. Dane na wykresach podano jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń.

* Statystycznie istotna ($p < 0,01$) różnica w ilości komórek we frakcji subG1 między komórkami inkubowanymi BAF i bez BAF.



Ryc. 24. Reprezentatywne histogramy z analizy zmian cyklu komórkowego komórek Ab poddanych 24-godzinnemu działaniu IP oraz inhibitora kaspaz BAF.

Po 24 godzinach działania każdego z badanych IP w obecności BAF tylko 10 do 15% komórek znajdowało się we frakcji subG1.

Poprzednio wykazano również (patrz: rozdział 4.6), że badane IP w ciągu 24 godzin zmniejszają liczbę dzielących się komórek Ab (faza S+G2/M) z 34% w populacji kontrolnej do mniej niż 10%. Działanie BAF całkowicie znosiło ten efekt i w obecności epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny prowadziło do wzrostu liczby komórek w fazie S+G2/M w stosunku do komórek kontrolnych (komórek nie traktowanych ani IP, ani BAF). Poziom istotności statystycznej zmian wynosił $p \leq 0,08$. Po 24-godzinach inkubacji z epoksomycyną i BAF odsetek komórek w fazie S+G2/M wynosił 43%, dla MG-132 i BAF liczba ta wynosiła 47%, natomiast w przypadku działania laktacystyny i BAF w fazie S+G2/M znajdowało się 35% komórek.


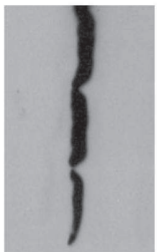
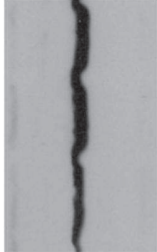
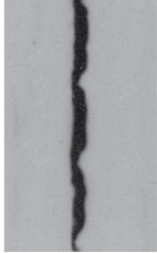

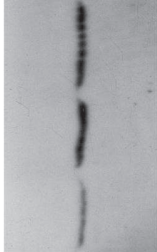
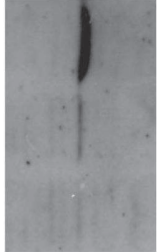
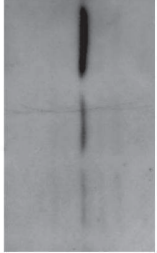
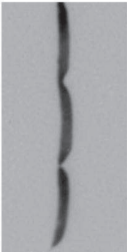
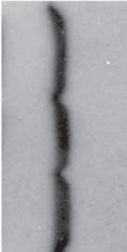
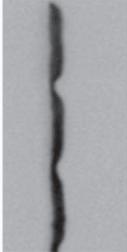

Działanie badanych IP po 24 godzinach obniżało także liczbę komórek Ab w fazie spoczynkowej (G0/G1) z wyjściowych 51% w komórkach kontrolnych do 10-15%. Ponownie proces ten był w znacznym stopniu zahamowany przez BAF. W komórkach inkubowanych z epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną w obecności BAF po 24 godzinach w fazie G0/G1 cyklu znajdowało się nadal od 33% do 48% komórek.

4.7. Inhibitory proteasomów indukują ekspresję białek szoku termicznego (HSP) w komórkach Ab

Aby sprawdzić, czy komórki Ab odpowiadają na działanie inhibitorów proteasomów indukcją ekspresji białek HSP, zbadano ekspresję białka HSP70 oraz HSP27.

W komórkach kontrolnych przez cały czas trwania doświadczenia nie stwierdzono obecności żadnego z badanych białek HSP (ryc. 25).

Inhibitory proteasomów powodowały aktywację ekspresji obu białek: HSP70 i HSP27. Szybkość aktywacji była podobna w przypadku wszystkich badanych IP. Białko HSP70 pojawiało się już po 6 godzinach i jego ilość wzrastała w czasie dalszej inkubacji po 12 i 24 godzinach. Indukcja ekspresji białka HSP27 zachodziła wolniej niż HSP70. Co prawda HSP27 było obecne już po 6 godzinach inkubacji, lecz w bardzo małej ilości. Wyraźny wzrost jego poziomu obserwowano dopiero w 24 godzinie doświadczenia.

	kontrola	epoksomycyna 0,5μM	MG-132 5μM	laktacystyna 10μM
HSP 70	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 
HSP 27	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 	6h 12h 24h 
β-aktyna				

Ryc. 25. Indukcja ekspresji białek HSP 70 i HSP 27 w komórkach Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 i 24 godzinach inkubacji. β-aktynę analizowano jako standard wewnętrzny potwierdzający jednakową ilość białka całkowitego w ocenianych próbkach.

5. DYSKUSJA

5.1. Wpływ inhibitorów proteasomów na żywotność komórek Ab

W ostatnich latach cytotoksyczny wpływ związków hamujących aktywność proteasomów na komórki nowotworowe różnego rodzaju był przedmiotem intensywnej badań [McConkey 2008, Crawford 2011, Frankland-Searby 2012]. Jeden z tych związków – bortezomib – został dopuszczony w USA i Europie do leczenia chorych ze szpiczakiem mnogim i niektórymi chłoniakami. Mimo, że jak dotąd nie udało się uzyskać zadowalającej odpowiedzi terapeutycznej w leczeniu guzów litych takich jak czerniak [Millward 2011; Su 2010; Markovic 2005], próby kliniczne wciąż trwają. Dlatego też dokładne poznanie mechanizmów działania inhibitorów proteasomów na komórkę nowotworową jest niezwykle istotnym zagadnieniem.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że inhibitory proteasomów: epoksomycyna, MG-132 i laktacystyna wywierają zależne od dawki działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek linii amelanotycznej (Ab) czerniaka przeszczepialnego chomika. Istnieje wiele doniesień, które stwierdzają cytotoksyczny wpływ tych związków na różne typy nowotworów, takie jak białaczka, szpiczak, glejak, nerwiak zarodkowy, rak jajnika oraz rak prostaty [Park 2011, Zavrski 2003, Zanotto-Filho 2012, Perez-Alvarez 2009, Bazzaro 2006, Yang 2006]. Dowiedziono również, że na działanie inhibitorów proteasomów wrażliwe są różne formy czerniaka: zarówno linie komórkowe czerniaka myszy (B78, B16F10) i człowieka (MeWo, Sk-Mel-19, -28 -94, -103, -147, WM-35, A375, Mel-2A) [Yerlikaya 2008, Kozłowski 2001, Wolter 2007, Qin 2005], jak i komórki czerniaka człowieka izolowane z przerzutów lub guzów pierwotnych [Sorolla 2008]. Co więcej stwierdzono, że działanie bortezomibu *in vivo* hamuje wzrost komórek czerniaka człowieka wszczepionych myszom z zablokowanym układem immunologicznym [Amiri 2004, Fernandez 2005].

Jednak przytoczone prace oceniały w większości działanie najlepiej znanego i dopuszczonego do stosowania w terapii pacjentów ze szpiczakiem mnogim, inhibitora proteasomów – bortezomibu. Badania kliniczne z zastosowaniem bortezomibu u pacjentów z czerniakiem nie przyniosły jednak spodziewanych wyników [Markovic 2005, Su 2010], dlatego istnieje potrzeba zbadania wpływu na czerniaka inhibitorów proteasomów pochodzących z innych klas chemicznych, np. aldehydowych pochodnych peptydów (MG-132), epoksyketonów (epoksomycyna) lub β -laktonów (laktacystyna).

Do tej pory nie analizowano także związku stopnia melanizacji czerniaka z wrażliwością na zahamowanie aktywności proteasomów.

W moich badaniach cytotoksyczny wpływ 0,1-1 μ M epoksomycyny oraz 1-10 μ M MG-132 na komórki Ab był zbliżony. Mniejsze stężenia inhibitorów wolniej zmniejszały żywotność komórek, lecz po odpowiednio długim czasie (48 godzin) każdy z nich w badanym zakresie stężeń obniżał żywotność komórek o ponad 95%. Tak duży spadek żywotności świadczy o wysokiej wrażliwości amelanotycznej linii Ab na działanie badanych związków.

Epoksomycyna po 24 godzinach inkubacji obniżała żywotność komórek Ab o około 80%, a po 48 godzinach praktycznie wszystkie komórki były martwe. W badaniach Sorolla i wsp. 2008 wykorzystujących komórki melanotycznych czerniaków człowieka izolowane z guzów pierwotnych lub przerzutów podobny efekt po 48 godzinach działania uzyskano w części badanych linii stosując o połowę mniejszą dawkę epoksomycyny. Z pięciu badanych przez autorów rodzajów czerniaka trzy okazały się równie wrażliwe na działanie epoksomycyny jak komórki Ab, natomiast dwie wykazały dużą oporność. Autorzy tłumaczą to zróżnicowanym tempem proliferacji, przy czym komórki szybko proliferujące były znacznie bardziej wrażliwe niż wolno proliferujące. Linie o szybkim tempie proliferacji zawierają większy odsetek komórek dzielących się, a uważa się, że te właśnie komórki są szczególnie wrażliwe na zahamowanie aktywności proteasomów. W badanych przeze mnie komórkach linii Ab odsetek komórek dzielących się był zbliżony do linii o największym tempie proliferacji analizowanych przez Sorollę i wsp. 2008, można więc stwierdzić, że tempo proliferacji linii Ab jest podobne do szybko proliferujących czerniaków ludzkich. Zapewne obecność wysokiego odsetka komórek w trakcie podziału jest przyczyną wysokiej wrażliwości tej linii na działanie inhibitorów proteasomów.

Drugi ze stosowanych przeze mnie inhibitorów proteasomów – MG-132 – działał bardzo podobnie do epoksomycyny. Już po 24 godzinach powodował obniżenie żywotności komórek Ab o 80%, a po 48 godzinach – o ponad 95%. Porównanie tych wyników z badaniami na innych liniach komórek czerniaka pokazuje, że ich wrażliwość na ten związek jest bardzo różna. Amelanotyczna linia czerniaka mysiego B16F10 ma porównywalną z linią Ab wrażliwość na MG-132. 24-godzinna inkubacja komórek B16F10 z takim samym stężeniem MG-132 obniżała ich żywotność również o 80% [Yerlikaya 2008]. Inne badania wskazują natomiast na nieco większą wrażliwość amelanotycznej linii czerniaka człowieka A375 [Miller 2009], gdzie dwukrotnie

mniejsze stężenie MG-132 powodowało śmierć praktycznie wszystkich komórek w trakcie 48 godzin. W przytoczonej wyżej pracy Sorolla i wsp. 2008 te linie komórkowe, które były odporne na działanie epoksomycyny, okazały się również mało wrażliwe na MG-132. Wydaje się więc, że związek wrażliwości czerniaka na zahamowanie aktywności proteasomów z odsetkiem komórek dzielących się jest w znacznym stopniu niezależny od zastosowanego inhibitora.

W moich badaniach działanie cytotoksyczne laktacystyny w stosunku do komórek Ab było słabsze niż epoksomycyny i MG-132. W analizowanym zakresie stężeń nie udało się uzyskać całkowitego zahamowania aktywności ChT-L proteasomów. W obecności 10 μ M laktacystyny komórki Ab nadal zachowywały około 35% aktywności ChT-L proteasomów. W wyniku tego laktacystyna działała wolniej, jednak po odpowiednio długim czasie efekt cytotoksyczny dorównywał epoksomycynie i MG-132. Po 24 godzinach inkubacji obserwowałam zmniejszenie żywotności komórek Ab o 75%, a po 48 godzinach – o ponad 95%. Z powodu braku danych niemożliwe jest porównanie wrażliwości różnych typów czerniaka na działanie laktacystyny, niemniej jednak w niektórych modelach doświadczalnych innych nowotworów, np. w szpiczaku lub raku piersi (linia Hs578T) również zanotowano mniejszą wrażliwość komórek na działanie laktacystyny niż MG-132 lub epoksomycyny [Zavrski 2003; Keyomarsi 2010].

Pomijając kwestię tempa proliferacji, formy melanotyczne czerniaka teoretycznie powinny być bardziej wrażliwe na zahamowanie działania proteasomów niż czerniak amelanotyczny ze względu na zachodzącą w nich intensywną syntezę melaniny. Wiadomo bowiem, że komórki syntetyzujące i wydzielające duże ilości białka (np. limfocyty B) są szczególnie podatne na działanie inhibitorów proteasomów [Obeng 2006, McConkey 2008].

Porównując wyniki mojej pracy z dostępnymi w piśmiennictwie danymi na temat wpływu IP na czerniaki melanotyczne i amelanotyczne należy stwierdzić, że stopień melanizacji nie ma wpływu na wrażliwość czerniaka na zahamowanie aktywności proteasomów. W badaniach Miller 2009 niektóre z badanych linii czerniaka melanotycznego (WM852) były bardziej, inne zaś (HS294T) mniej wrażliwe na działanie cytotoksyczne MG-132 w porównaniu z linią amelanotyczną Ab. Również ocena panelu 16 linii czerniaka ludzkiego nie wykazała związku między wrażliwością na bortezomib a stopniem melanizacji czerniaków [Fernandez 2005].

Można więc wnioskować, że amelanotyczna linia Ab jest wysoce wrażliwa na zahamowanie aktywności proteasomów nie dzięki mniejszej syntezie białka związanej z obniżoną melanogenezą, lecz z powodu dużego odsetka komórek dzielących się w populacji. Związek szybkości proliferacji z odpowiedzią na epoksomycynę, MG-132 lub bortezomib stwierdzono też w innych rodzajach nowotworów, takich jak na przykład rak jajnika [Bazzaro 2006] oraz szpiczak [Nawrocki 2008].

Co istotne, szybkość proliferacji jest też jednym z czynników odpowiadających za selektywność IP w kierunku komórek nowotworowych. Zahamowanie aktywności proteasomów w niewielkim tylko stopniu zmniejsza żywotność prawidłowych komórek, takich jak melanocyty, fibroblasty, czy komórki nabłonkowe jajnika [Qin 2005, Wolter 2007, Młynarczuk-Biały 2006, Bazzaro 2006], co jest wielką zaletą zmniejszającą działania uboczne i umożliwiającą stosowanie niektórych z tych związków w terapii nowotworów u ludzi [Testa U 2009, Nikiforov 2007, McConkey 2008].

5.2. Indukcja apoptozy w komórkach Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów

Na apoptotyczną śmierć komórek Ab wywołaną zahamowaniem aktywności proteasomów wskazują obserwowane przeze mnie zaburzenia struktury błony komórkowej (eksternalizacja PS), zmiany morfologiczne jąder komórkowych, aktywacja kaspaz efektorowych, a także pośrednio stwierdzony wzrost liczby komórek o obniżonej zawartości DNA (frakcja subG1).

Zmiany morfologiczne dotyczące całych komórek lub wybranych organelli są jednym z podstawowych wyznaczników apoptozy, choć zachodzą w późnym jej stadium. Przeprowadzona przeze mnie ocena jąder komórkowych wykazała, że pod wpływem wszystkich badanych IP w jądrach komórek Ab zachodzą podobne zmiany. Pojedyncze komórki ze skondensowaną chromatyną obserwowałam już po 6 godzinach inkubacji z epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną. Ponieważ jednak struktura jąder ulega zaburzeniu dopiero na późnym etapie apoptozy, wyraźne zwiększenie odsetka jąder o morfologii apoptotycznej stwierdziłam po 24 godzinach działania inhibitorów, kiedy to widoczna większość komórek Ab wykazywała cechy kondensacji chromatyny i fragmentacji jądra.

Podobne wyniki uzyskał Sorolla i wsp. 2008, gdzie już dziesięciokrotnie mniejsze stężenie MG-132 wywoływało po 48 godzinach inkubacji apoptotyczne zmiany w

jądrach komórek czerniaka ludzkiego izolowanych z przerzutów. Także prace analizujące śmierć komórek czerniaka indukowaną bortezomibem potwierdzają te obserwacje. Kondensację chromatyny i fragmentację jąder wykazano po 24 godzinach inkubacji w ustalonych liniach czerniaka ludzkiego SK-Mel-19 oraz SK-Mel-103 [Fernandez 2005].

Kondensację chromatyny, a szczególnie fragmentację jądra można odnosić do obserwowanej w badaniach cyklu komórkowego akumulacji komórek o obniżonej zawartości DNA (frakcja subG1). Oba te wskaźniki apoptozy opierają się na zmianach struktury materiału genetycznego. Analiza morfologii jąder komórkowych komórek Ab, gdzie większość z nich wykazywała apoptotyczne zmiany po 24 godzinach zahamowania aktywności proteasomów, znajduje potwierdzenie w badaniach zawartości DNA, ponieważ z tym samym czasie komórki o zmniejszonej zawartości DNA stanowiły około 80% populacji. Podobną zależność wykazał Sorolla i wsp. 2008 w badaniu wpływu bortezomibu na komórki czerniaka ludzkiego izolowane bezpośrednio z guzów pierwotnych, gdzie po 48 godzinach zanotowano wzrost liczby komórek z jądrami o morfologii apoptotycznej, a jednocześnie akumulację komórek we frakcji subG1.

Rozpad komórki a także jej jądra jest ostatnim etapem śmierci apoptotycznej. Do poznania dynamiki tego procesu przydatne są jednak wczesne wskaźniki apoptozy, takie jak eksternalizacja fosfatydyloseryny lub aktywacja kaspaz.

Zgodnie z oczekiwaniami w mojej pracy apoptotyczne zmiany błony komórkowej pojawiały się dużo wcześniej niż kondensacja chromatyny. Epoksomycyna, MG-132 i laktacystyna w podobnym stopniu wywoływały eksternalizację PS w komórkach linii Ab, przy czym działanie laktacystyny było wolniejsze niż pozostałych badanych inhibitorów. Jako że zmiany w błonie komórkowej zachodzą na bardzo wczesnym etapie apoptozy, już po 6 godzinach od zahamowania aktywności proteasomów obserwowałam dwukrotny wzrost liczby komórek wykazujących eksternalizację PS (komórki aneksynododatnie, zarówno wczesno- jak i późnoapoptotyczne). Po 12 godzinach ich liczba wzrastała trzykrotnie, a po 24 godzinach, niezależnie od stosowanego inhibitora, apoptotyczne zmiany w błonie komórkowej dotyczyły już niemal wszystkich komórek. Choć laktacystyna działała wolniej niż epoksomycyna i MG-132, jednak po 24 godzinach inkubacji wpływ wszystkich badanych IP był podobny.

Eksternalizację PS pod wpływem IP w komórkach czerniaka stwierdzano już poprzednio, lecz nie tak dużą jak w badanej przeze mnie linii Ab. W pracy Qin i wsp. 2005 autorzy analizowali wpływ takiego samego stężenia laktacystyny i dwukrotnie większego stężenia MG-132 na pięć ustalonych linii czerniaka ludzkiego [RJ002L, MG012, C8161, MUM2B, SK-Mel-28]. Najbardziej wrażliwa z badanych linia RJ002L wykazywała około 45% komórek aneksynododatnich po 24 godzinach inkubacji z laktacystyną i 65% po inkubacji z MG-132. Najbardziej oporna okazała się linia amelanotyczna SK-Mel-28, gdzie po tym samym czasie działania obu inhibitorów stwierdzono jedynie około 20-25% komórek aneksynododatnich. Tak jak w przypadku moich badań, efekt działania laktacystyny był słabszy niż MG-132.

Porównując wczesny wskaźnik apoptozy, jakim są zaburzenia w błonie komórkowej, z analizą żywotności komórek dla badanych IP początkowo (po 6 godzinach) zauważa się, że żywotność obniża się mniej (20%) niżby na to wskazywała liczba komórek wykazujących eksternalizację PS (40%). Dzieje się tak, ponieważ zmiany w błonie komórkowej zachodzą na wczesnym etapie apoptozy, kiedy komórka jest jeszcze aktywna metabolicznie. W późniejszym czasie, po 24 godzinach, oba parametry przybierają zbliżone wartości.

Wzrost liczby komórek wykazujących eksternalizację PS oraz apoptotyczne zmiany w jądrach komórkowych pod wpływem laktacystyny i MG12 wykazano również w innych rodzajach nowotworów: glejaku, raku jajnika, szpiczaku lub białaczce (komórki Jurkat) [Zanotto-Filho 2012, Bazzaro 2006, Zavrski 2003, Park 2011].

Oprócz apoptotycznych zmian w jądrze oraz błonie komórkowej, w mojej pracy oceniałam też aktywację głównej kaspazy efektorowej apoptozy – kaspazy 3. W każdym wypadku aktywacja kaspazy 3 zachodziła dość wcześnie, bo już w 6 godzinie inkubacji, kiedy żywotność komórek kształtowała się jeszcze na poziomie 80% wartości kontrolnej. Podjednostkę aktywną kaspazy obserwowałam nadal po 12 i 24 godzinach. Nie zanotowałam różnicy w szybkości aktywacji kaspazy 3 pomiędzy stosowanymi inhibitorami. Początek aktywacji kaspazy 3 odpowiadał obniżaniu się żywotności komórek Ab, która zaczynała spadać niezależnie od stosowanego IP po 6 godzinie inkubacji, czyli po aktywacji kaspazy 3.

Na podstawie dostępnych w piśmiennictwie badań można stwierdzić, że aktywacja kaspazy 3 po zahamowaniu aktywności proteasomów zachodzi w komórkach czerniaka w różnym czasie. W badaniach linii RJ002L czerniaka ludzkiego dwukrotnie większe

stężenie MG-132 powodowało pojawienie się podjednostki aktywnej kaspazy 3 już po 3 godzinach, natomiast odpowiedź na działanie takiego samego stężenia laktacystyny była opóźniona i aktywacja kaspazy 3 zachodziła dopiero po 18 godzinach [Qin 2005]. Aktywną podjednostkę kaspazy 3 obserwowano też w komórkach dwóch czerniaków ludzkich izolowanych z przerzutów w odpowiedzi na nawet dziesięciokrotnie mniejsze stężenie MG-132 i epoksomycyny, lecz dopiero po 24 godzinach [Sorolla 2008]. Do aktywacji kaspazy 3 dochodziło również w wielu liniach czerniaka ludzkiego (SK-Mel-19, -29, -103, -147, WM-1366) pod wpływem bortezomibu [Wolter 2007; Nikiforov 2007; Fernandez 2005].

5.3. Indukcja szlaku mitochondrialnego apoptozy w komórkach Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów

Jak wiadomo, wiele substancji stosowanych w terapii nowotworów wywiera efekt cytotoksyczny poprzez indukcję szlaku mitochondrialnego apoptozy. W moich badaniach stwierdziłam zmiany, takie jak translokacja cytochromu C i białka AIF z mitochondriów do cytoplazmy oraz aktywacja kaspazy 9, potwierdzające, że także w tym przypadku apoptoza zachodzi na drodze mitochondrialnej.

Po zahamowaniu aktywności proteasomów w komórkach Ab aktywacji kaspazy 3 towarzyszyła aktywacja kaspazy 9. Nie stwierdziłam różnic w szybkości aktywacji kaspazy 9 pod wpływem badanych inhibitorów. Aktywna podjednostka kaspazy 9, tak jak i kaspazy 3 obecna była już w pierwszych 6 godzinach od zahamowania aktywności proteasomów, kiedy obserwuje się spadek żywotności komórek o zaledwie 10-20%. Aktywacja kaspazy 9 utrzymywała się nadal po 12 i 24 godzinach.

W komórkach czerniaka aktywacja kaspazy 9 pod wpływem IP może zachodzić w różnym czasie. Qin i wsp. 2005 w badaniu linii RJ002L czerniaka ludzkiego stwierdzili aktywację kaspazy 9 już po 1 godzinie inkubacji z dwukrotnie większym stężeniem MG-132. W tej samej linii komórkowej odpowiedź na działanie takiego samego stężenia laktacystyny była opóźniona względem działania MG-132 i, podobnie jak w mojej pracy, podjednostka aktywna wykrywana była po 6 godzinach. Inne wyniki uzyskali Sorolla i wsp. 2008, gdzie w komórkach dwóch czerniaków ludzkich izolowanych z przerzutów aktywną kaspazę 9 obserwowano dopiero po 24 godzinach inkubacji z MG-132 lub epoksomycyną. Jednak stosowane stężenia inhibitorów były dziesięciokrotnie mniejsze.

Aktywną kaspazę 9 obserwowano również w liniach czerniaka ludzkiego SK-Mel-19, -29, -103, -147, WM-1366 w wyniku działania bortezomibu [Wolter 2007; Nikiforov 2007; Fernandez 2005].

Istotnym wskaźnikiem indukcji drogi mitochondrialnej apoptozy jest wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwalnianie cytochromu C i białka AIF z mitochondrium do cytoplazmy. W moich badaniach translokacja cytochromu C widoczna była w części komórek już po 6 godzinach działania badanych IP. Po 24 godzinach w praktycznie wszystkich widocznych komórkach cytochrom C obserwowany był w cytoplazmie. Uwalnianie AIF zaczynało się podobnym czasie, z wyjątkiem laktacystyny, gdzie translokację AIF obserwowano dopiero po 12 godzinach. Po 24 godzinach we wszystkich przypadkach obserwowano już AIF w samym jądrze lub w cytoplazmie i w jądrze komórkowym. Badanie lokalizacji cytochromu C w komórce pozwoliło również zaobserwować charakterystyczne dla apoptozy pączkowanie błony komórkowej, ponieważ uwolniony z mitochondriów cytochrom C preferencyjnie wiąże się do pączkujących fragmentów.

Choć brak jest badań z użyciem epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny to jednak analiza prac opisujących działanie bortezomibu dowodzi, że w czerniaku zahamowanie aktywności proteasomów często prowadzi do uwalniania cytochromu C i białka AIF, choć zwykle dzieje się to później niż w komórkach linii Ab. W komórkach izolowanych z przerzutów czerniaka ludzkiego uwolnienie cytochromu C do cytoplazmy następowało po 12 godzinach inkubacji [Sorolla 2008] z bortezomibem. W ustalonych liniach czerniaka ludzkiego RJ002L oraz C8161 obserwowano translokację zarówno cytochromu C jak i AIF do cytoplazmy po 18 godzinach [Qin 2005], a w komórkach SK-Mel-103 po 20 godzinach [Fernandez 2005]. Natomiast w amelanotycznej linii A375 nie zaobserwowano uwalniania cytochromu C do 24 godzin pod wpływem bortezomibu [Amschler 2010].

Uwalnianie cytochromu C pod wpływem epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny obserwowano również w nowotworach innych typów takich jak białaczki, nerwiak zarodkowy lub rak okrężnicy [Baou 2010, Park 2011, Perez-Alvarez 2009, Nagy 2006, Cheng 2011].

W moich badaniach nie stwierdziłam ani znaczącego opóźnienia aktywacji kaspazy efektorowej (kaspazy 3) względem inicjatorowej (kaspazy 9), ani też opóźnienia aktywacji tej ostatniej względem uwolnienia cytochromu C do cytoplazmy. Wskazuje

to, że mechanizmy drogi wewnętrznej apoptozy są w komórkach Ab włączane bardzo szybko, już po 6 godzinach po zahamowaniu aktywności proteasomów.

5.4. Udział apoptozy kaspazoniezależnej w śmierci komórek Ab wywołanej inhibitorami proteasomów

Jak wspomniano wcześniej, zahamowanie aktywności proteasomów powodowało uwolnienie z mitochondriów do cytoplazmy białka AIF, które jest zaangażowane w proces apoptozy niezależnej od kaspaz.

W mojej pracy zahamowanie aktywności kaspaz w czasie 24-godzinnej inkubacji z epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną prowadziło do dwu i pół- lub trzykrotnie mniejszego obniżenia żywotności komórek. Po tym czasie żywotność komórek nie zmniejszała się do 20-30%, lecz utrzymywała na poziomie ponad 40% dla epoksomycyny i MG-132, oraz ponad 70% dla laktacystyny. Może to oznaczać, że choć działanie kaspaz jest ważnym elementem apoptozy wywołanej zahamowaniem aktywności proteasomów, to jednak przynajmniej częściowo śmierć komórek zachodzi na drodze kaspazoniezależnej. Może odpowiadać za to AIF, którego uwalnianie z mitochondriów stwierdzono w komórkach Ab pod wpływem IP. Wyniki uzyskane w badaniach nad działaniem bortezomibu na czerniaka wydają się potwierdzać te przypuszczenia. W liniach komórkowych czerniaka RJ002L, C8161 i MUM2B oraz komórkach izolowanych z przerzutów czerniaka ludzkiego zablokowanie aktywności kaspaz podczas 24-godzinnej inkubacji z bortezomibem powodowało dwukrotnie mniejsze obniżenie żywotności komórek [Qin 2005, Sorolla 2008]. W badaniach Fernandez i wsp. 2005 analogiczny efekt obserwowano w dwóch liniach czerniaka ludzkiego Sk-Mel-103 i -147 po 24 godzinach, w dwóch innych liniach natomiast (Sk-Mel-19 oraz WM-1366) po 36 i 48 godzinach działania bortezomibu. Zablokowanie kaspaz po 24 godzinach hamowało też dwukrotnie spadek żywotności ludzkich komórek dendrytycznych, komórek chłoniaka oraz raka prostaty wywołany MG-132 [Nencioni 2006, Hussain 2009, Yang 2006]. Z drugiej strony na modelu szpiczaka Zavrski 2003 wykazał, że zablokowanie kaspaz tylko w niewielkim stopniu (5-10%) zapobiega śmierci komórek pod wpływem laktacystyny.

Przytoczone wyżej prace potwierdzają, że zahamowanie aktywności kaspaz tylko częściowo chroni komórki przed cytotoksycznym działaniem inhibitorów proteasomów

i że ani w czerniaku, ani w innych rodzajach nowotworów zablokowanie kaspaz nie zapobiega całkowicie śmierci komórek indukowanej IP.

Wolniejszemu spadkowi żywotności komórek Ab po zahamowaniu aktywności kaspaz towarzyszyła zmiana morfologii jąder komórkowych. Zablokowanie kaspaz prawie całkowicie hamowało fragmentację jąder w komórkach linii Ab wywołaną epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną. Kondensacja chromatyny zachodziła nadal, natomiast fragmentację jądra obserwowano tylko w pojedynczych komórkach. Podobne zaburzenie przebiegu apoptozy wywołane zahamowaniem aktywności kaspaz wykazał Sorolla i wsp. 2008 w badaniach działania bortezomibu na komórki czerniaka ludzkiego.

Natomiast zahamowanie aktywności kaspaz miało stosunkowo niewielki wpływ na eksternalizację fosfatydyloseryny w komórkach Ab. Po 24 godzinach liczba komórek aneksynododatnich zmniejszyła się zaledwie o około 15% (z 95% do 80%).

Jak widać, zablokowanie kaspaz zaburza późne etapy apoptozy (degradacja DNA, fragmentacja jąder komórkowych). Natomiast w niewielkim tylko stopniu wpływa na wczesne etapy tego procesu (zmiana struktury błony komórkowej), które nie wymagają działania kaspaz.

5.5. Zmiany cyklu komórkowego komórek Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów

Zahamowanie cyklu komórkowego i wzrost liczby komórek dzielących się w populacji często poprzedzają apoptozę wywołaną zahamowaniem aktywności proteasomów. W moich badaniach nie stwierdziłam zahamowania cyklu komórkowego linii Ab po zastosowaniu żadnego z badanych inhibitorów. Obserwowałam natomiast gromadzenie się komórek we frakcji subG1, gdzie znajdują się komórki o obniżonej zawartości DNA, a więc głównie ciała apoptotyczne.

W różnych rodzajach nowotworów zahamowanie aktywności proteasomów wpływa na cykl komórkowy w odmienny sposób. Wydaje się, że zatrzymanie cyklu komórkowego zależy nie od rodzaju zastosowanego związku inhibitorowego, lecz od typu komórek nowotworowych. Spośród badanych przeze mnie IP poprzednio wykazano, że działanie MG-132 może prowadzić do zatrzymania cyklu i gromadzenia się komórek w fazie podziału (faza S+G2/M) w komórkach glejaka, raka jajnika, białaczki (komórki Jurkat) oraz szpiczaka [Zanotto-Filho 2012, Bazzaro 2006, Park

2011, Zavrski 2003]. W innych modelach MG-132 powodował początkowo zatrzymanie cyklu, a następnie śmierć komórek i w konsekwencji wzrost populacji komórek o zmniejszonej zawartości DNA (frakcja subG1). Takie działanie opisano dla białaczki oraz glejaka [Park 2011; Fan 2011].

Wpływ epoksomycyny, MG-132 i laktacystyny na cykl komórkowy czerniaka nie był dotychczas badany. Dane pochodzące z prac oceniających działanie bortezomibu są niejednoznaczne. Ocena cyklu komórkowego linii Ab wskazuje, że pod wpływem epoksomycyny, MG-132 lub laktacystyny obniżeniu ulega liczba komórek zarówno w fazie spoczynkowej G0/G1, jak i odsetek komórek dzielących się (faza S+G2/M). Wszystkie badane związki działały bardzo podobnie powodując po 12 godzinach zmniejszenie liczby komórek w fazie G0/G1 oraz S+G2/M o ponad połowę. Po 24 godzinach nadal nie dochodziło do zatrzymania cyklu, a liczba komórek w fazie G0/G1 oraz S+G2/M zmniejszała się cztero- lub pięciokrotnie. Obserwacje te są zgodne z badaniami wpływu bortezomibu na komórki czerniaka ludzkiego izolowane z przerzutów, gdzie także nie dochodziło do zatrzymania cyklu komórkowego [Sorolla 2008]. Natomiast inne wyniki uzyskali Amschler i wsp. 2010 analizując wpływ bortezomibu na linię czerniaka ludzkiego A375. Stwierdzili bowiem po 12 godzinach wyraźne zahamowanie cyklu komórkowego i prawie trzykrotne zwiększenie odsetka komórek w fazie S+G2/M, czemu towarzyszyło zmniejszenie liczby komórek w fazie G0/G1. Również w ustalonych liniach czerniaka ludzkiego SK-Mel-19 oraz SK-Mel-103 bortezomib powodował zatrzymanie cyklu i wzrost liczby komórek w fazie S+G2/M z jednoczesnym spadkiem liczebności fazy G0/G1 [Fernandez 2005].

Wydaje się, że odmienny wpływ IP na cykl komórkowy może wynikać ze specyficznych mutacji białek związanych z progresją cyklu komórkowego obecnych w różnych rodzajach nowotworów [Zanotto-Filho 2012, Baiz 2009, Lu G 2008]. Ponieważ do zatrzymania cyklu komórkowego nie dochodziło w badanych przede mnie komórkach Ab oraz analizowanych przez Sorollę i wsp. komórkach czerniaka ludzkiego pochodzących z przerzutów, być może znaczenie ma fakt, że nie są to ustalone linie komórkowe, lecz komórki izolowane bezpośrednio z masy guza.

Jak wspomniałam wcześniej, epoksomycyna, MG-132 ani laktacystyna nie zatrzymywały cyklu komórkowego linii Ab, obserwowałam natomiast gromadzenie się komórek we frakcji subG1, gdzie lokalizują się komórki o zmniejszonej zawartości DNA. Mogą to być zarówno fragmenty uszkodzonych komórek jak również cała

apoptotyczne [Kajstura 2007]. Akumulacja takich komórek jest często traktowana jako pośredni objaw apoptozy.

W moich badaniach w warunkach prawidłowych komórki o obniżonej zawartości DNA stanowiły około 10% populacji komórek Ab. Ich liczba gwałtownie rosła pod wpływem wszystkich stosowanych IP. Po 12 godzinach inkubacji z epoksomycyną lub MG-132 we frakcji subG1 znajdowała się ponad połowa komórek. Dla laktacystyny odsetek ten był mniejszy i wynosił 40%. Natomiast po 24 godzinach inkubacji działanie laktacystyny dorównywało pozostałym inhibitorom i w każdym przypadku obserwowaliśmy wzrost populacji subG1 do około 70-80%.

Dromadzenie się komórek o zmniejszonej zawartości DNA wykazano także w badaniach z użyciem bortezomibeu. W komórkach izolowanych z przerzutów czerniaka ludzkiego po 24 godzinach liczebność frakcji subG1 wzrosła z 16 do 65% [Sorolla 2008]. Również w ustalonej linii czerniaka ludzkiego SK-Mel-103 zanotowano wzrost z 3% do prawie 40% [Fernandez 2005]. Istnieją dane opisujące podobne działanie MG-132 w innych rodzajach nowotworów. W komórkach Jurkat takie samo stężenie MG-132 po 12 godzinach inkubacji powodowało zwiększenie frakcji subG1 do 55% [Park 2011]. W glejaku również obserwowano zwiększenie tej populacji komórek, ale dopiero po 48 godzinach [Zanotto-Filho 2012].

Gromadzenie się komórek o obniżonej zawartości DNA (subG1) po zahamowaniu aktywności proteasomów potwierdza indukcję apoptozy IP w komórkach Ab. Ponieważ wraz ze wzrostem populacji subG1 zmniejsza się liczba komórek w fazie G0/G1 oraz S+G2/M, można wnioskować, że komórki gromadzące się w obszarze subG1 pochodzą z obu faz cyklu. Analiza zmian cyklu komórkowego dobrze odpowiada omawianym wcześniej zmianom żywotności komórek. Po 24 godzinach inkubacji z epoksomycyną i MG-132 żywotność zmniejszyła się do około 10-15% i tyle samo komórek pozostawało w fazie G0/G1 oraz S+G2/M cyklu komórkowego. W przypadku laktacystyny wielkości te były nieznacznie wyższe i wynosiły około 25%.

Na uwagę zasługuje fakt, że zablokowanie aktywności kaspaz w komórkach Ab inkubowanych z epoksomycyną, MG-132 lub laktacystyną nie tylko zwiększa ich żywotność, ale też prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie podziału (faza S+G2/M). Liczba komórek Ab w tej fazie wzrosła pod wpływem BAF po 24 godzinach inkubacji o jedną trzecią. Sorolla i wsp. 2008 po zablokowaniu kaspaz również obserwowali zahamowanie cyklu komórkowego w hodowli pierwotnej komórek czerniaka ludzkiego inkubowanych z bortezomibem, jednak efekt ten był silniejszy,

ponieważ doszło do aż trzykrotnego wzrostu liczby takich komórek. Odmienne wyniki uzyskali natomiast Park i wsp. 2011, którzy badali wpływ zablokowania aktywności kaspaz w komórkach Jurkat inkubowanych z MG-132 i nie stwierdzili zatrzymania cyklu oraz wzrostu liczby komórek w fazie S+G2/M.

W mojej pracy wzrostowi liczby komórek dzielących się pod wpływem BAF towarzyszył jednocześnie spadek odsetka komórek o obniżonej zawartości DNA. Liczba komórek we frakcji subG1 po 24 godzinach inkubacji z IP w obecności BAF była ponad sześciokrotnie mniejsza (10-15%) niż w komórkach hodowanych z samymi IP (80%). Mniejszy, bo tylko dwuipółkrotny spadek obserwowano po zahamowaniu aktywności kaspaz w hodowli pierwotnej komórek czerniaka ludzkiego inkubowanych 24 godziny z bortezomibem [Sorolla 2008]. Natomiast w komórkach Jurkat poddanych działaniu MG-132 w dwukrotnie mniejszym stężeniu zablokowanie kaspaz spowodowało po 12 godzinach aż dziesięciokrotnie zmniejszenie się frakcji subG1 [Park 2011]. Wiadomo, że zahamowanie aktywności kaspaz w znacznym stopniu blokuje końcowy etap apoptozy, jakim jest rozpad komórki. Przypuszczalnie to jest przyczyną cytoprotekcyjnego działania inhibitora kaspaz, który zapobiega gromadzeniu się komórek w obszarze subG1.

5.6. Indukcja ekspresji białek HSP w komórkach Ab pod wpływem inhibitorów proteasomów

W moich badaniach nie obserwowałam konstytutywnej ekspresji białek HSP27 oraz HSP70 w komórkach linii Ab, mimo że podwyższony poziom tych białek związany z transformacją nowotworową komórek wykrywa się w większości nowotworów, np. w wielu rodzajach raka piersi, prostaty, wątroby, żołądka, płuc oraz glioblastoma [Nylandsted 2000, Ciocca 2005, Calderwood 2010, Vidyasagar 2012]. W przypadku czerniaka poziom ekspresji białek szoku termicznego w stosunku do prawidłowych melanocytów bywa bardzo różny. Shipp i wsp. 2013 analizując ekspresję HSP70 w czerniakach ludzkich obserwował wyższy jego poziom we wszystkich 8 badanych guzach w porównaniu do otaczającej tkanki. Natomiast w badaniu 20 przypadków czerniaków siatkówki oka stwierdzono bardzo niską ekspresję HSP70 [Missotten 2003]. Wśród ustalonych linii komórkowych czerniaka konstytutywnej ekspresji HSP70 nie wykazano w liniach komórkowych człowieka SK-Mel-19 i SK-Mel-103 [Fernandez 2005], wysoką zawartość tego białka obserwowano natomiast w

linii czerniaka ludzkiego G361 [Park 2000] oraz mysiego B16F10 [Schmitt 2006, Yerlikaya 2008].

Zwiększona ekspresja HSP27 cechowała większość (30 spośród 38 badanych próbek) ludzkich czerniaków siatkówki oka [Missotten 2003]. Wyższy poziom HSP27 w porównaniu do prawidłowych melanocytów wykazano również w badaniu komórek izolowanych z guzów pierwotnych oraz przerzutów ludzkich czerniaków skóry [Carta 2005]. Nadekspresji tego białka nie stwierdzono natomiast w ustalonej linii czerniaka człowieka A375 [Aldrian S 2003].

Przeprowadzone przeze mnie badania dowodzą, że zahamowanie aktywności proteasomów powoduje indukcję ekspresji HSP70 i HSP27 w komórkach Ab. Wzrost ekspresji HSP70 był gwałtowny. Obecność białka HSP70 obserwowałam już po 6 godzinach inkubacji z każdym ze stosowanych IP, a jego poziom nadal rósł po 12 i 24 godzinach. Indukcja ekspresji drugiego z badanych białek zachodziła wolniej. Obecność HSP27 stwierdzałam dopiero po 12 godzinach od zahamowania aktywności proteasomów, a wyraźne zwiększenie poziomu HSP27 następowało dopiero po 24 godzinach. Nie obserwowałam różnic w indukcji ekspresji HSP70 i HSP27 związanych z inhibitorem proteasomów.

Indukcja ekspresji białek szoku termicznego w odpowiedzi na zahamowanie aktywności proteasomów i nagromadzenie źle zwiniętych białek była wielokrotnie opisywana. W badaniach z zastosowaniem mikromacierzy dowiedziono, że w komórkach raka prostaty poddanych działaniu MG-132 spośród wszystkich genów najbardziej rośnie ekspresja genów białek HSP, w tym HSP70 i HSP27 [Yang 2006]. Wzrost poziomu białka HSP70 i HSP27 indukowany MG-132 lub laktacystyną obserwowano w komórkach włókniamięsa [Kim 2011¹]. Brak jest doniesień o zmianach ekspresji HSP27 w czerniaku po zahamowaniu aktywacji proteasomów. Do tej pory w czerniaku analizowano jedynie wpływ bortezomibu na ekspresję HSP70. Wykazano indukcję tego białka pod wpływem bortezomibu w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego SK-Mel-19 i SK-Mel-103 oraz czerniaka mysiego B16F10 [Fernandez 2005, Yerlikaya 2008].

Wiele badań wskazuje na cytoprotekcyjną rolę białek szoku termicznego w komórkach nowotworowych, a ich wysoki poziom często wiąże się z opornością na działanie inhibitorów proteasomów. Analizując zmiany ekspresji genów w liniach komórkowych chłoniaka po zahamowaniu aktywności proteasomów udowodniono, że odporne na bortezomib są te linie, w których zachodzi nadekspresja HSP27 oraz HSP 70

[Chauhan 2003, Shringarpure 2006]. Rola poszczególnych białek HSP w oporności komórek na inhibitory proteasomów nie jest jednak oczywista. W badaniu 12 linii nerwiaka zarodkowego nie stwierdzono związku między poziomem ekspresji HSP70 a wrażliwością na bortezomib [Combaret 2008]. Można więc wnioskować, że stosunkowo wysoka wrażliwość komórek Ab na zahamowanie aktywności proteasomów jest związana nie tylko z dużą liczbą komórek dzielących się w populacji, lecz również z brakiem konstytutywnej ekspresji białek HSP70 i HSP27.

Cytoprotekcyjny efekt białek szoku termicznego nie ogranicza się jedynie do komórek nowotworowych. Wysoka konstytutywna ekspresja HSP27 chroni również astrocyty przed działaniem MG132 [Goldbaum 2009]. W badaniach mysich embrionalnych komórek pnia wykazano, że komórki te są około dziesięciokrotnie bardziej wrażliwe na działanie MG132, laktacystyny oraz epoksomycyny od zróżnicowanych komórek somatycznych ze względu na słabszą indukcję ekspresji HSP70 [Park 2012].

6. WNIOSKI

1. Komórki linii amelanotycznej (Ab) czerniaka przeszczepialnego chomika są wysoce wrażliwe na zahamowanie aktywności proteasomów, co prawdopodobnie ma związek z szybkim tempem proliferacji komórek.
2. Działanie cytotoksyczne epoksomycyny i MG-132 jest silniejsze niż laktacystyny, przy podobnym mechanizmie działania badanych związków.
3. Główną drogą śmierci komórek pod wpływem wszystkich badanych inhibitorów proteasomów jest apoptoza indukowana drogą mitochondrialną. Dodatkowo, choć w znacznie mniejszym stopniu, śmierć komórek zachodzi na drodze apoptozy kaspazoniezależnej.
4. Niezależnie od stosowanego związku odpowiedzią komórek na zahamowanie aktywności proteasomów i nagromadzenie nieprawidłowo zwiniętych białek jest wzrost ekspresji białek HSP70 i HSP27, co jednak nie jest wystarczające do uzyskania oporności i nie zapobiega śmierci komórek Ab.

7. STRESZCZENIE

Czerniak jest jednym z tych nowotworów, których wskaźnik zachorowalności stale rośnie. Jednocześnie jego oporność na chemioterapię powoduje, że brak jest obecnie skutecznych metod leczenia. Dlatego też podejmowane są próby leczenia czerniaka innymi niż klasyczne chemioterapeutyki związkami o działaniu przeciwnowotworowym, takimi jak inhibitory proteasomów (IP).

W przedstawianej pracy analizowano wpływ trzech IP: 0,5 μ M epoksomycyny, 5 μ M MG-132 oraz 10 μ M laktacystyny na komórki linii amelanotycznej (Ab) czerniaka Bomirskiego. W badaniach żywotności komórek z użyciem XTT stwierdzono, że wszystkie trzy związki silnie obniżały żywotność komórek, która po 48 godzinach inkubacji wynosiła jedynie 5% wartości wyjściowej, przy czym działanie laktacystyny było wolniejsze niż epoksomycyny i MG-132. Analiza morfologii jąder komórkowych wybarwionych Hoechst wykazała, że już po 6 godzinach inkubacji zaczynały się w nich zmiany apoptotyczne, z wyraźną kondensacją chromatyny i fragmentacją jądra. Cytometryczna ocena zmian błony komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny) dowiodła, że pod wpływem działania każdego z badanych IP po 24 godzinach 97% komórek wykazywało cechy wczesnej lub późnej apoptozy. Zmiany te zachodziły również wolniej w przypadku laktacystyny niż epoksomycyny i MG-132. Apoptotyczną śmierć komórek potwierdziła również stwierdzona z użyciem immunoblottingu aktywacja kaspazy 3.

Aktywacja kaspazy 9 oraz obserwowany w badaniach immunofluorescencyjnych wpływ cytochromu C i białka AIF z mitochondriów wskazuje, że apoptoza w komórkach Ab wywołana wszystkimi badanymi IP zachodziła na drodze mitochondrialnej. Zahamowanie aktywności kaspaz za pomocą inhibitora BAF tylko częściowo chroniło komórki przed cytotoksycznym działaniem IP, co dowodzi, że śmierć komórek następuje zarówno na drodze kaspazozależnej jak i kaspazoniezależnej.

Analiza cytometryczna komórek Ab barwionych jodkiem propidyny wykazała, że działanie IP powodowało istotne zmiany w cyklu komórkowym. Po 24 godzinach obserwowano istotny spadek odsetka komórek dzielących oraz komórek w fazie spoczynkowej, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek o obniżonej zawartości DNA, charakterystycznych dla apoptozy.

W odpowiedzi na cytotoksyczne działanie wszystkich badanych IP w komórkach Ab obserwowano gwałtowną indukcję ekspresji białek szoku termicznego HSP70 i HSP27.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że epoksomycyna, MG-132 oraz laktacystyna wywierały efekt cytotoksyczny na komórki Ab poprzez indukcję szlaku mitochondrialnego apoptozy. Działanie laktacystyny było wolniejsze niż epoksomycyny i MG-132, jednak mechanizm śmierci komórki pozostawał podobny. Uruchamiane procesy obronne, w postaci wzrostu ekspresji białek HSP70 i HSP27, nie były wystarczające do przetrwania komórki.

8. PIŚMIENNICTWO

Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e19.

¹Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):417-21.

²Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest*. 2004;22(2):304-11.

Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. 2002;7(1):9-16.

Adams J, Palombella VJ, Elliott PJ. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs*. 2000 May;18(2):109-21.

Adler MJ, White CR. Amelanotic malignant melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Jun;16(2):122-30.

Aldrian S, Kindas-Mügge I, Trautinger F, Fröhlich I, Gsur A, Herbacek I, et al. Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(3):249-57.

Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Wiśniowski Za, Czerwińska M. Phenotype of patients with malignant melanoma and dysplastic and common nevi. *Przegl Dermatol*: Warszawa; 2010. p. 370-7.

Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res*. 2004 Jul;64(14):4912-8.

Amschler K, Schön MP, Pletz N, Wallbrecht K, Erpenbeck L, Schön M. NF-kappaB inhibition through proteasome inhibition or IKKbeta blockade increases the susceptibility of melanoma cells to cytostatic treatment through distinct pathways. *J Invest Dermatol*. 2010 Apr;130(4):1073-86.

An WG, Hwang SG, Trepel JB, Blagosklonny MV. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*. 2000 Jul;14(7):1276-83.

Armstrong JL, Flockhart R, Veal GJ, Lovat PE, Redfern CP. Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *J Biol Chem*. 2010 Feb;285(9):6091-100.

Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*. 1988 Jan;331(6152):192-4.

Baiz D, Pozzato G, Dapas B, Farra R, Scaggiante B, Grassi M, et al. Bortezomib arrests the proliferation of hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6 by differentially affecting E2F1, p21 and p27 levels. *Biochimie*. 2009 Mar;91(3):373-82.

Balsas P, Galán-Malo P, Marzo I, Naval J. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSMβ5 overexpression and polyploidy. *Leuk Res*. 2012 Feb;36(2):212-8.

- Baou M, Kohlhaas SL, Butterworth M, Vogler M, Dinsdale D, Walewska R, et al. Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2010 Sep;95(9):1510-8.
- Bazzaro M, Lee MK, Zoso A, Stirling WL, Santillan A, Shih IM, et al. Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2006 Apr;66(7):3754-63.
- Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA. Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol*. 2010 Feb;19(2):157-64.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug;2(8):469-75.
- Benanti JA. Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Jul;23(5):492-8.
- Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Feb;21(1):27-38.
- Bomirski A, Słominski A, Bigda J. The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. *Cancer Metastasis Rev*. 1988 Jun;7(2):95-118.
- Bomirski A. Biological properties of transplantable melanomas in the Syrian hamster during 16 years of maintenance by several passages. *Akademia Medyczna w Gdańsku*. Gdańsk 1977.
- Bomirski A, Kozłowska K, Żurawska-Czupa B. An attempt to prepare nonenzymatically a single cell suspension from solid transplantable melanomas. In: IXth International conference of Pigment Cell. Huston, Texas.; 1975.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):645-52.
- Bubko I, Gruber BM, Anuszevska EL. [The role of the proteasome for therapy of incurable diseases]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2010;64:314-25.
- Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia*. 2010;26(7):681-5.
- Carta F, Demuro PP, Zanini C, Santona A, Castiglia D, D'Atri S, et al. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. *Melanoma Res*. 2005 Aug;15(4):235-44.
- Chauhan D, Bianchi G, Anderson KC. Targeting the UPS as therapy in multiple myeloma. *BMC Biochem*. 2008;9 Suppl 1:S1.
- Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, et al. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*. 2003 Oct;63(19):6174-7.
- Chen S, Blank JL, Peters T, Liu XJ, Rappoli DM, Pickard MD, et al. Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Res*. 2010 Jun;70(11):4318-26.

- Cheng B, Maffi SK, Martinez AA, Acosta YP, Morales LD, Roberts JL. Insulin-like growth factor-I mediates neuroprotection in proteasome inhibition-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Mol Cell Neurosci*. 2011 Jul;47(3):181-90.
- Cheung WL, Patel RR, Leonard A, Firoz B, Meehan SA. Amelanotic melanoma: a detailed morphologic analysis with clinicopathologic correlation of 75 cases. *J Cutan Pathol*. 2012 Jan;39(1):33-9.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010 Feb;37(3):299-310.
- Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):253-67.
- Cichorek M. Camptothecin-induced death of amelanotic and melanotic melanoma cells in different phases of cell cycle. *Neoplasma*. 2011;58(3):227-34.
- Cichorek M, Kozłowska K, Bryl E. Mitochondrial transmembrane potential in spontaneous and camptothecin-induced apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells. *Neoplasma*. 2007;54(1):29-36.
- ¹Cichorek M, Kozłowska K, Wachulska M, Zielińska K. Spontaneous apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells in different phases of cell cycle: relation to tumor growth. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(1):31-6.
- ²Cichorek M. Apoptoza spontaniczna i indukowana komórek dwóch linii czerniaka przeszczepialnego chomika różniących się cechami biologicznymi. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*: Gdańsk 2006.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1365-8.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;81(4):1100-5.
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
- Combaret V, Boyault S, Iacono I, Brejon S, Rousseau R, Puisieux A. Effect of bortezomib on human neuroblastoma: analysis of molecular mechanisms involved in cytotoxicity. *Mol Cancer*. 2008;7:50.
- Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr*. 2001;9(4-5):195-201.
- Corey EJ, Li WD. Total synthesis and biological activity of lactacystin, omuralide and analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1999 Jan;47(1):1-10.
- Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res*. 2000 Dec;60(24):7099-105.
- Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal*. 2011 Jun;5(2):101-10.

- Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*. 2007 Oct;115(10):1161-76.
- Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell EA, Old LJ. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res*. 1984 Jan;44(1):83-90.
- de Bettignies G, Coux O. Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie*. 2010 Nov;92(11):1530-45.
- Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem*. 1996 Mar;271(13):7273-6.
- Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku. Warszawa: Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie; 2011.
- Ding WX, Ni HM, Chen X, Yu J, Zhang L, Yin XM. A coordinated action of Bax, PUMA, and p53 promotes MG132-induced mitochondria activation and apoptosis in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007 Mar;6(3):1062-9.
- Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb;94(3):855-60.
- Fan WH, Hou Y, Meng FK, Wang XF, Luo YN, Ge PF. Proteasome inhibitor MG-132 induces C6 glioma cell apoptosis via oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 May;32(5):619-25.
- Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003 Jan;42(3):355-7.
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*. 1995 May;268(5211):726-31.
- Fernández Y, Miller TP, Denoyelle C, Esteban JA, Tang WH, Bengston AL, et al. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem*. 2006 Jan;281(2):1107-18.
- Fernández Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opipari AW, et al. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*. 2005 Jul;65(14):6294-304.
- Frankland-Searby S, Bhaumik SR. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):64-76.
- 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*. 2004 Nov;24(22):9695-704.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006 Nov;5(22):2592-601.
- Gartel AL. Mechanisms of apoptosis induced by anticancer compounds in melanoma cells. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(1):50-2.

- Genin E, Reboud-Ravaux M, Vidal J. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem*. 2010;10(3):232-56.
- Goldbaum O, Riedel M, Stahnke T, Richter-Landsberg C. The small heat shock protein HSP25 protects astrocytes against stress induced by proteasomal inhibition. *Glia*. 2009 Nov;57(14):1566-77.
- Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*. 2003 Oct;22(43):6669-78.
- Halaban R. Pigmentation in melanomas: changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. *Oncol Res*. 2002;13(1):3-8.
- Halaban R, Cheng E, Zhang Y, Moellmann G, Hanlon D, Michalak M, et al. Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun;94(12):6210-5.
- Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, et al. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1992 Nov;45(11):1746-52.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646-74.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):1783-6.
- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002 May;277(19):16639-47.
- Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*. 1986 Feb;261(5):2400-8.
- Huang J, Tsvetkov L, Qu K, Daniel-Issakani S, Payan DG. Approaches to discovering drugs that regulate E3 ubiquitin ligases. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2008(1):153-70.
- Hussain AR, Ahmed M, Ahmed SO, Al-Thari S, Khan AS, Razack S, et al. Proteasome inhibitor MG-132 mediated expression of p27Kip1 via S-phase kinase protein 2 degradation induces cell cycle coupled apoptosis in primary effusion lymphoma cells. *Leuk Lymphoma*. 2009 Jul;50(7):1204-13.
- Imajoh-Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S, Tanaka K, Omura S, Kikuchi H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Dec;217(3):1070-7.
- Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H, et al. High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr;303(3):978-84.
- Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett*. 2013 May;332(2):275-85.

Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun.* 2010;2(3):238-47.

Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods.* 1992 Mar;147(2):153-65.

Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A.* 2007 Mar;71(3):125-31.

Kapila K, Kharbanda K, Verma K. Cytomorphology of metastatic melanoma--use of S-100 protein in the diagnosis of amelanotic melanoma. *Cytopathology.* 1991;2(5):229-37.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.

Keyomarsi K, Efuet ET, Bui TN. Semi-high throughput method of measuring proteasome inhibition in vitro and in cultured cells. *Cell Biol Toxicol.* 2011 Apr;27(2):123-31.

¹Kim HJ, Joo HJ, Kim YH, Ahn S, Chang J, Hwang KB, et al. Systemic analysis of heat shock response induced by heat shock and a proteasome inhibitor MG132. *PLoS One.* 2011;6(6):e20252.

²Kim HM, Yu Y, Cheng Y. Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Feb;1809(2):67-79.

Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006 Mar;281(13):8582-90.

Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001 Aug;8(8):739-58.

Ko JM, Velez NF, Tsao H. Pathways to melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2010 Dec;29(4):210-7.

Kozłowski L, Stokłosa T, Omura S, Wójcik C, Wojtukiewicz MZ, Worowski K, et al. Lactacystin inhibits cathepsin A activity in melanoma cell lines. *Tumour Biol.* 2001 Jul-Aug;22(4):211-5.

Kozłowska K, Cichorek M, Zarzeczna M, Brozek J, Witkowski JM. Heterogeneous susceptibility to spontaneous and induced apoptosis characterizes two related transplantable melanomas with different biological properties. *Pigment Cell Res.* 2002 Jun;15(3):233-8.

Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://epid.coi.waw.pl/krn/>: Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów, Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163.

Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005 Jul;11(7):725-30.

Krzakowski M. *Onkologia kliniczna.* Wydawnictwo medyczne Borgis: Warszawa 2006.

- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):32-43.
- Kyrgidis A, Tzellos TG, Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. *J Carcinog.* 2010;9:3.
- Laennec R. Sur les melanoses. *Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris.* 1806;1:24-6.
- Lartigue L, Kushnareva Y, Seong Y, Lin H, Faustin B, Newmeyer DD. Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol Biol Cell.* 2009 Dec;20(23):4871-84.
- Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008 Jul;4(5):600-6.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008 Oct;27(48):6194-206.
- Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):12-20.
- Lu G, Punj V, Chaudhary PM. Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biol Ther.* 2008 Apr;7(4):603-8.
- Lu Z, Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle.* 2010 Jun;9(12):2342-52.
- Magill L, Lynas J, Morris TC, Walker B, Irvine AE. Proteasome proteolytic activity in hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia and multiple myeloma. *Haematologica.* 2004 Dec;89(12):1428-33.
- Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, et al. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer.* 2005 Jun;103(12):2584-9.
- Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, Fan Y, Kayama T, Sheldon RA, et al. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jul;25(7):899-910.
- Mayer R, Ciechanover A, Rechsteiner M. *Protein Degradation.* Wiley-VCH Verlag: Weinheim 2005.
- McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2008 Aug-Oct;11(4-5):164-79.
- McCormack PL. Carfilzomib: in relapsed, or relapsed and refractory, multiple myeloma. *Drugs.* 2012 Oct;72(15):2023-32.
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug;96(18):10403-8.
- Miller LA, Goldstein NB, Johannes WU, Walton CH, Fujita M, Norris DA, et al. BH3 mimetic ABT-737 and a proteasome inhibitor synergistically kill melanomas through Noxa-dependent apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2009 Apr;129(4):964-71.
- Millward M, Price T, Townsend A, Sweeney C, Spencer A, Sukumaran S, et al. Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase

- inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. *Invest New Drugs*. 2012 Dec;30(6):2303-17.
- Missotten GS, Journée-de Korver JG, de Wolff-Rouendaal D, Keunen JE, Schlingemann RO, Jager MJ. Heat shock protein expression in the eye and in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jul;44(7):3059-65.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct;99(22):14374-9.
- Młynarczuk-Biały I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, Schmidt B, Umbreen S, Gołab J, et al. Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Res*. 2006 Aug;66(15):7598-605.
- Moloney FJ, Menzies SW. Key points in the dermoscopic diagnosis of hypomelanotic melanoma and nodular melanoma. *J Dermatol*. 2011 Jan;38(1):10-5.
- 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*. 2011 Mar;71(3):283-90.
- Nagy K, Székely-Szüts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, Barti-Juhász H, et al. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(3):133-42.
- Nagy V, Dikic I. Ubiquitin ligase complexes: from substrate selectivity to conjugational specificity. *Biol Chem*. 2010 Feb-Mar;391(2-3):163-9.
- Naumann I, Kappler R, von Schweinitz D, Debatin KM, Fulda S. Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. *Clin Cancer Res*. 2011 May;17(10):3204-18.
- Naumann K, Schmich K, Jaeger C, Kratz F, Merfort I. Noxa/Mcl-1 balance influences the effect of the proteasome inhibitor MG-132 in combination with anticancer agents in pancreatic cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 2012 Jul;23(6):614-26.
- Nawrocki ST, Carew JS, Maclean KH, Courage JF, Huang P, Houghton JA, et al. Myc regulates aggresome formation, the induction of Noxa, and apoptosis in response to the combination of bortezomib and SAHA. *Blood*. 2008 Oct;112(7):2917-26.
- Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Huang P, et al. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res*. 2005 Dec;65(24):11658-66.
- Nawrocki ST, Bruns CJ, Harbison MT, Bold RJ, Gotsch BS, Abbruzzese JL, et al. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2002 Dec;1(14):1243-53.
- Nencioni A, Garuti A, Schwarzenberg K, Cirmena G, Dal Bello G, Rocco I, et al. Proteasome inhibitor-induced apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2006 Mar;36(3):681-9.
- Nikiforov MA, Riblett M, Tang WH, Gratchouck V, Zhuang D, Fernandez Y, et al. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec;104(49):19488-93.

- Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther.* 2005 Mar;4(3):443-9.
- Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:122-5.
- Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 2006 Jun;107(12):4907-16.
- Omura S, Fujimoto T, Otaguro K, Matsuzaki K, Moriguchi R, Tanaka H, et al. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo).* 1991 Jan;44(1):113-6.
- Omura S, Matsuzaki K, Fujimoto T, Kosuge K, Furuya T, Fujita S, et al. Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo).* 1991 Jan;44(1):117-8.
- Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M, Dang CV. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* 1998 Oct;58(19):4342-8.
- Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, et al. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1179-81.
- Parcellier A, Schmitt E, Brunet M, Hammann A, Solary E, Garrido C. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. *Antioxid Redox Signal.* 2005 2005 Mar-Apr;7(3-4):404-13.
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5790-802.
- Park HS, Jun dY, Han CR, Woo HJ, Kim YH. Proteasome inhibitor MG132-induced apoptosis via ER stress-mediated apoptotic pathway and its potentiation by protein tyrosine kinase p56lck in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol.* 2011 Nov;82(9):1110-25.
- Park JA, Kim YE, Ha YH, Kwon HJ, Lee Y. High sensitivity of embryonic stem cells to proteasome inhibitors correlates with low expression of heat shock protein and decrease of pluripotent cell marker expression. *BMB Rep.* 2012 May;45(5):299-304.
- Park KC, Kim DS, Choi HO, Kim KH, Chung JH, Eun HC, et al. Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line. *Arch Dermatol Res.* 2000 Oct;292(10):482-7.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):816-34.
- Perez-Alvarez S, Solesio ME, Manzanares J, Jordán J, Galindo MF. Lactacystin requires reactive oxygen species and Bax redistribution to induce mitochondria-mediated cell death. *Br J Pharmacol.* 2009 Oct;158(4):1121-30.
- Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2010 May;67(10):1589-97.

Qin JZ, Xin H, Sitailo LA, Denning MF, Nickoloff BJ. Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Res.* 2006 Oct;66(19):9636-45.

Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res.* 2005 Jul;65(14):6282-93.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):839-43.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994 Sep;78(5):761-71.

Rockel B, Baumeister W. A tale of two giant proteases. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2008(1):17-40.

Ruka W, Krzakowski M, Placek W, Rutkowski P, Nowecki Z, Fijuth J, et al. Cutaneous melanoma — diagnostic and therapeutic guidelines. *Onkol Prak Klin.* 2009;5(1):20-32.

Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P. Czerniaki skóry u dorosłych. *Medipage Sp. z o.o.:* Warszawa 2005

Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* 2000 Aug;2(8):476-83.

Satou Y, Matsuoka M. [Proteasome inhibitor, bortezomib (Vercade), potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells]. *Nihon Rinsho.* 2004 Jul;62(7):1363-7.

Schmitt E, Maingret L, Puig PE, Rerole AL, Ghiringhelli F, Hammann A, et al. Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2006 Apr;66(8):4191-7.

Seeger JM, Schmidt P, Brinkmann K, Hombach AA, Coutelle O, Zigrino P, et al. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes melanoma cells toward adoptive CTL attack. *Cancer Res.* 2010 Mar;70(5):1825-34.

Seol DW. p53-Independent up-regulation of a TRAIL receptor DR5 by proteasome inhibitors: a mechanism for proteasome inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Dec;416(1-2):222-5.

Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther.* 2010 Oct;10(8):737-47.

Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, Toné S, Ito H, Kawashima S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J.* 1996 Jul;317 (Pt 2):385-8.

Shipp C, Weide B, Derhovanessian E, Pawelec G. Hsps are up-regulated in melanoma tissue and correlate with patient clinical parameters. *Cell Stress Chaperones.* 2013 Mar;18(2):145-54.

Shirley RB, Kaddour-Djebbar I, Patel DM, Lakshmikanthan V, Lewis RW, Kumar MV. Combination of proteasomal inhibitors lactacystin and MG132 induced synergistic apoptosis in prostate cancer cells. *Neoplasia.* 2005 Dec;7(12):1104-11.

- Shringarpure R, Catley L, Bhole D, Burger R, Podar K, Tai YT, et al. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br J Haematol*. 2006 Jul;134(2):145-56.
- Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Pérez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol*. 2008 Mar;158(3):496-504.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 2005 Nov;280(46):38729-39.
- Su Y, Amiri KI, Horton LW, Yu Y, Ayers GD, Koehler E, et al. A phase I trial of bortezomib with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan;16(1):348-57.
- Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Feb;23(1):64-71.
- Testa U. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2009 Oct;10(10):968-81.
- Thanner F, Sütterlin MW, Kapp M, Rieger L, Morr AK, Kristen P, et al. Heat shock protein 27 is associated with decreased survival in node-negative breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3A):1649-53.
- Tsubuki S, Kawasaki H, Saito Y, Miyashita N, Inomata M, Kawashima S. Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Nov;196(3):1195-201.
- Vaziri SA, Grabowski DR, Hill J, Rybicki LR, Burk R, Bukowski RM, et al. Inhibition of proteasome activity by bortezomib in renal cancer cells is p53 dependent and VHL independent. *Anticancer Res*. 2009 Aug;29(8):2961-9.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131-49.
- Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasmemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology*. 2008;54(2):92-9.
- Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):7.
- Vinitsky A, Michaud C, Powers JC, Orlowski M. Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry*. 1992 Oct;31(39):9421-8.
- von Thaler AK, Kamenisch Y, Berneburg M. The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol*. 2010 Feb;19(2):81-8.
- Wachulska M, Kozłowska K, Cichorek M. The DNA ploidy and proliferative activity of transplantable melanoma cells in regard to their secretory function. *Neoplasma*. 2005;52(4):280-6.

- Wain EM, Stefanato CM, Barlow RJ. A clinicopathological surprise: amelanotic malignant melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2008 May;33(3):365-6.
- Waxman L, Fagan J, Goldberg A. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 1987;262(6):2451-7.
- Williams G, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):52–364.
- Wolnicka-Głubisz A, Płonka P. Rola promieniowania UV w etiopatogenezie czerniaka skóry. *Współcz Onkol*. 2007;11(9):419-29.
- Wolter KG, Verhaegen M, Fernández Y, Nikolovska-Coleska Z, Riblett M, de la Vega CM, et al. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ*. 2007 Sep;14(9):1605-16.
- Yang W, Monroe J, Zhang Y, George D, Bremer E, Li H. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 2006 Nov;243(2):217-27.
- Yerlikaya A, Erin N. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int J Mol Med*. 2008 Dec;22(6):817-23.
- Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, et al. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene*. 2005 Jan;24(3):344-54.
- Zanotto-Filho A, Braganhol E, Battastini AM, Moreira JC. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. *Invest New Drugs*. 2012 Dec;30(6):2252-62.
- Zavrski I, Naujokat C, Niemöller K, Jakob C, Heider U, Langelotz C, et al. Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Jul;129(7):383-91.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. *Exp Cell Res*. 2010 May;316(8):1374-83.
- Zhu H, Guo W, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, et al. Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biol Ther*. 2005 Jul;4(7):781-6.