



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**«Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hsp70 στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική
μετάπτωση (EMT)»**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΤΖΙΜΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΜΣ ΒΒΕ,
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**«Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hsp70 στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική
μετάπτωση (EMT)»**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΤΖΙΜΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΙΜΣ ΒΒΕ,
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Όνομα : Χριστίνα Τζίμα

Τίτλος : Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hsp70 στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT).

Ημερομηνία παρουσίασης : Ιουνίου 2021

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Αξιολόγησης:

1. ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΜΣ ΒΒΕ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
2. ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΩΝΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΜΕΛΟΣ
3. ΣΥΡΡΟΥ ΜΑΡΙΚΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ/ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΜΕΛΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» με κατεύθυνση «Γενετική-Κυτταρογενετική-Γενετική Επιδημιολογία» του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Επιβλέπων ήταν ο κ. Αγγελίδης Χαράλαμπος Καθηγητής του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας και Διευθυντής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών ΒΒΕ, του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες για την ανάθεση του θέματος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, καθώς και για την δυνατότητα-ευκαιρία που μου προσέφερε με την επιλογή συμμετοχής μου σ' αυτό το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, για να συμπληρώσω τις γνώσεις μου στο συγκεκριμένο γνωστικό αντικείμενο, για τις τόσο σημαντικές και απλόχερες συμβουλές του καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής και της μακρόχρονης επαγγελματικής μας συνεργασίας, για τις πολύτιμες πληροφορίες και την πολυεπίπεδη βοήθεια που μου παρείχε, αλλά και για την παρότρυνση να συνεχίσω με θάρρος σε ότι και αν καταπιάνομαι. Οι κατευθυντήριες γραμμές του ήταν αρωγός στο, σωστά και με ασφάλεια, επιστημονικά τεκμηριωμένο αποτέλεσμα όλης αυτής της εργασίας που τόσο πολύ συνδέεται με τη δουλειά μου.

Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω και στα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, στην κ. Βεζυράκη Πατρόνα Καθηγήτρια Φυσιολογίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανεκτίμητη υποστήριξη της, για το ενδιαφέρον της, τον συντονισμό και τις χρήσιμες συμβουλές που μου έδωσε σε όλη αυτή την προσπάθεια με τις εύστοχες παρεμβάσεις της, την ηθική υποστήριξη, την αδιάλειπτη αρωγή αλλά και επίσης για την επιλογή συμμετοχής μου στο συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, καθώς και την κ. Σύρρου Μαρίκα Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας/Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξε από την αρχή αυτής της προσπάθειας, καθώς και για τις τόσο σημαντικές παρεμβάσεις της κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω, μαζί με τον Διευθυντή αυτού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κ. Χαράλαμφο Αγγελίδη, και τη Συντονιστική επιτροπή, που με επέλεξαν να συμμετέχω στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες», ώστε να αυξήσω τις γνώσεις μου στο συγκεκριμένο γνωστικό αντικείμενο που συνδέεται άμεσα με τις προπτυχιακές μου σπουδές αλλά και να μου δώσει και επιπλέον εφόδια για να ανταπεξέλθω με περισσότερη ευκολία στην εργασία μου.

Ευχαριστώ επίσης τον τέως Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπόπουλο, που μου επέτρεψε να συμμετέχω στο

Μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα, καθώς και όλα τα μέλη ΔΕΠ –εν ενεργεία και συνταξιοδοτηθέντα-, ΕΔΙΠ, μεταδιδακτορικούς ερευνητές, μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την κατανόηση που έδειξαν από την αρχή της εποικοδομητικής μας συνεργασίας και για τη βοήθεια σε κάθε επίπεδο όλων αυτών των ετών που συνεργαζόμαστε άψογα, αλλά και την κ. Παναγιώτα Κασιούμη, βιολόγο-διδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογίας του Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η οποία – παρά τον ελάχιστο ελεύθερο χρόνο που είχε- διέθεσε αρκετό από αυτόν για να μου λύσει απορίες πάντα με θετική διάθεση και στοχευμένες και επεξηγηματικές απαντήσεις. Δράττομαι της ευκαιρίας και ευχαριστώ τους συναδέλφους και συνεργάτες, μέλη ΔΕΠ και Διοικητικούς Υπαλλήλους του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την μακροχρόνια άψογη επαγγελματική μας σχέση, που μόνο θετικά αποτελέσματα έχει επιφέρει.

Τέλος θα ήθελα ξεχωριστά να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και να αφιερώσω αυτή την εργασία, στα λατρεμένα μου παιδιά Ευάγγελο και Ζωή, γιατί με τον ερχομό τους έδωσαν μεγαλύτερο νόημα στη ζωή μου, στον πολυαγαπημένο μου σύζυγο, Κωνσταντίνο, για την συμπαράσταση που έδειξε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος, καθώς και στους στοργικούς μου γονείς Κωνσταντίνο και Ζωίτσα, ιδιαίτερα δε τη μητέρα μου για την ανιδιοτελή και μακρόχρονη βοήθειά της, αλλά και την αφοσιωμένη μου κι έμπιστη αδερφή Ελένη για την πολύπλευρη συμπαράσταση και την συνεχόμενη αρωγή καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του εγχειρήματος, γιατί πάντα με στηρίζει και με παροτρύνει να συνεχίσω σε οποιαδήποτε δυσκολία βρεθεί στο δρόμο μου.

Ιωάννινα 2021

Χριστίνα Τζίμα

Αφιερωμένο στους ανθρώπους της ζωής μου: Ευάγγελο, Ζωή, Κωνσταντίνο, Κωνσταντίνο, Ζωίτσα και Ελένη

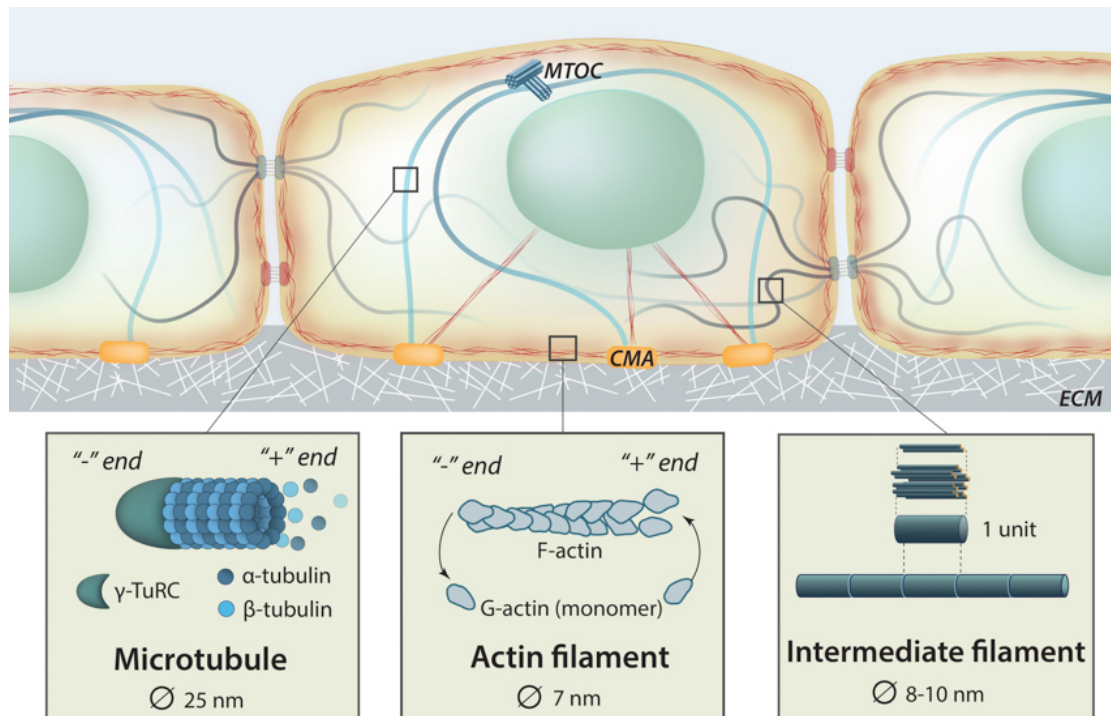
Περιεχόμενα

| | |
|---|-----------|
| Ευχαριστίες..... | 5 |
| Περιεχόμενα | 7 |
| Κεφάλαιο 1^ο: Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (Epithelial mesenchymal transition, EMT)..... | 8 |
| 1.1. Κυτταρικός σκελετός | 8 |
| 1.2. Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) | 14 |
| 1.3. Κυτταρική σηματοδότηση στην EMT..... | 19 |
| 1.4. Καντερίνες..... | 25 |
| 1.4.1. E-καντερίνη..... | 26 |
| 1.4.2. N-καντερίνες..... | 26 |
| 1.4.3. Β-κατενίνη..... | 27 |
| Κεφάλαιο 2^ο: Πρωτεΐνες απόκρισης θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins,HSPs) | 31 |
| 2.1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση..... | 31 |
| 2.2. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί..... | 33 |
| 2.3. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs)..... | 33 |
| 2.4. Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa (HSP70) | 36 |
| 2.4.1. Ρόλος των HSP70..... | 39 |
| Κεφάλαιο 3^ο: Ο ρόλος της HSP70 στον καρκίνο | 40 |
| 3.1. Ο ρόλος της HSP70 στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι καρκινικών κυττάρων..... | 40 |
| 3.2. Ο ρόλος της HSP70 στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στον κυτταρικό θάνατο..... | 42 |
| Κεφάλαιο 4^ο: Ο ρόλος της HSP70 στη μετάσταση | 47 |
| Κεφάλαιο 5^ο: Η HSP70 ως φαρμακευτικός στόχος | 57 |
| 5.1. Προκλινικές μελέτες..... | 63 |
| 5.2. Κλινικές μελέτες | 66 |
| Κεφάλαιο 6^ο: Συζήτηση | 68 |
| Ο ρόλος της Hsp70 στην Επιθήλιο-μεσεγχυματική Μετάπτωση | 72 |
| Περίληψη..... | 72 |
| The role of Hsp70 in Epithelial-mesenchymal Transition | 73 |
| Abstract | 73 |
| Βιβλιογραφία..... | 74 |

Κεφάλαιο 1^ο: Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (Epithelial mesenchymal transition, EMT)

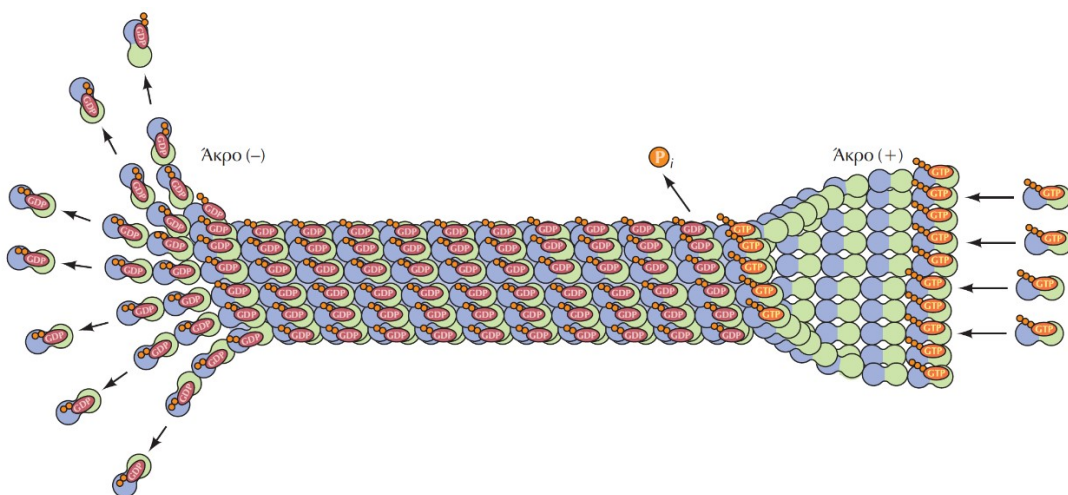
1.1. Κυτταρικός σκελετός

Ο κυτταρικός σκελετός αποτελείται από ένα δίκτυο δομικών πρωτεϊνών, το οποίο βρίσκεται σε όλο το κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το δίκτυο αυτό αποτελεί το ικρίωμα που καθορίζει το κυτταρικό σχήμα, την οργάνωση του κυτταροπλάσματος και την κυτταρική εντόπιση των οργανιδίων. Εκτός από τη δομή όμως ο κυτταροσκελετός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην κυτταρική κίνηση, είτε ολόκληρου του κυττάρου είτε οργανιδίων. Χαρακτηρίζεται από δυναμικότητα και μπορεί να αναδιοργανώνεται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε κίνηση ή αλλάζουν σχήμα. Οι κυριότεροι τύποι πρωτεϊνικών ινιδίων είναι τα ινίδια ακτίνης, τα ενδιάμεσα ινίδια και οι μικροσωληνίσκοι (Εικόνα 1) ("Chapter 3 - Cytoskeleton," 2008).



Εικόνα 1: Τα τρία είδη πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι μικροσωληνίσκοι έχουν διάμετρο περίπου ίση με 25 nm και αποτελούνται από τουμπούληνη, τα ινίδια ακτίνης έχουν διάμετρο 6-7 nm και αποτελούνται από ακτίνη και τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν διάμετρο περίπου 8-10 nm.

Οι μικροσωληνίσκοι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των ευκαρυωτικών κυττάρων. Είναι σωληνοειδείς δομές με διάμετρο περίπου 24 nm και αρκετά μακριές. Αποτελούνται από τουμπουλίνη, σχηματίζουν τη μιτωτική άτρακτο και αποτελούν τη βασική οργάνωση του κυτταροπλάσματος. Ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης (πρόσθεση και αφαίρεση διμερών τουμπουλίνης) στα άκρα των νηματίων οδηγούν σε μια συνεχόμενη μεταβολή της δομής των μικροσωληνίσκων. Το ένα άκρο, καλείται άκρο (+), μεγαλώνει πιο γρήγορα από το άλλο, το οποίο καλείται άκρο (-). Στο (-) άκρο βρίσκονται αγκυροβολημένα τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (Microtubule organizing centers-MTOCs) (Εικόνα 2) ("Chapter 3 - Cytoskeleton," 2008; Draber & Dráberová, 2012)

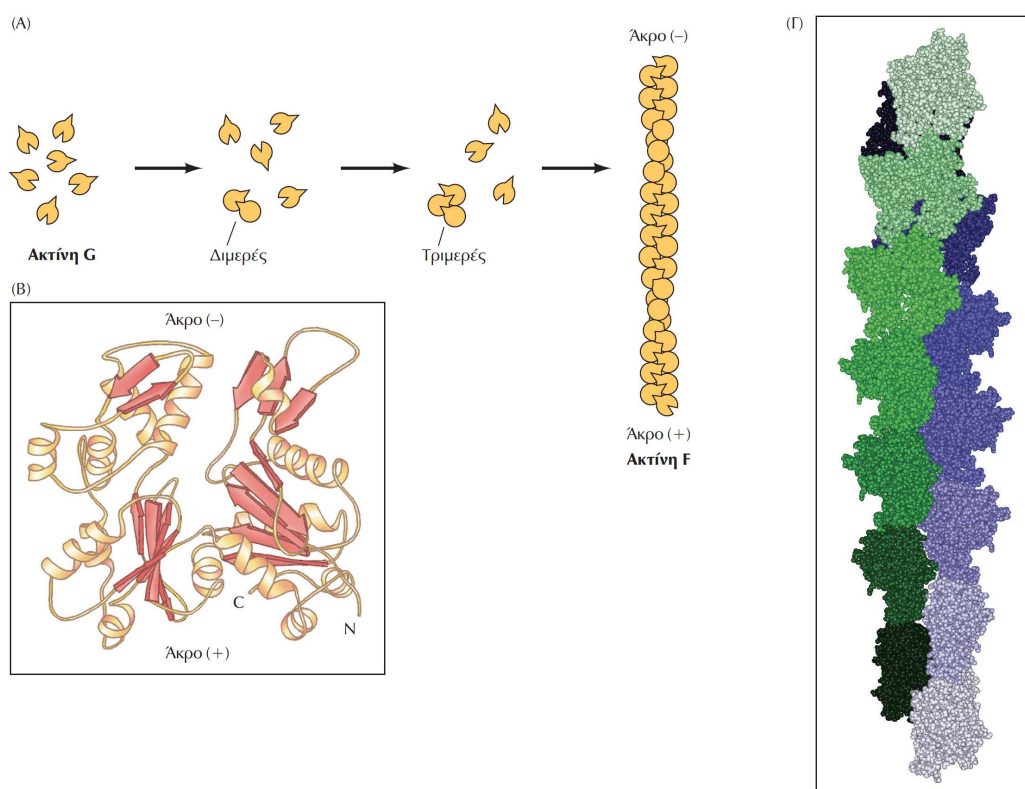


Εικόνα 2: Η κίνηση με ανασχηματισμό και ο ρόλος του GTP στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Τα άκρα (-) των μικροσωληνίσκων αναπτύσσονται πιο αργά απ' ό,τι τα άκρα (+). Η διαφορά αυτή στον ρυθμό αύξησης αντανακλάται στη διαφορά της κρίσιμης συγκέντρωσης που απαιτείται για την προσθήκη διμερών τουμπουλίνης από το ένα ή από το άλλο άκρο του μικροσωληνίσκου.

Συγκεκριμένα, οι δυο μορφές τουμπουλίνης, η α- και β- τουμπουλίνη, σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές, το οποίο αποτελεί την υπομονάδα αυτοσυγκρότησης και πολυμερίζεται δημιουργώντας τη δυναμική δομή των μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι συμβάλλουν στη διατήρηση της μορφής ορισμένων ειδών

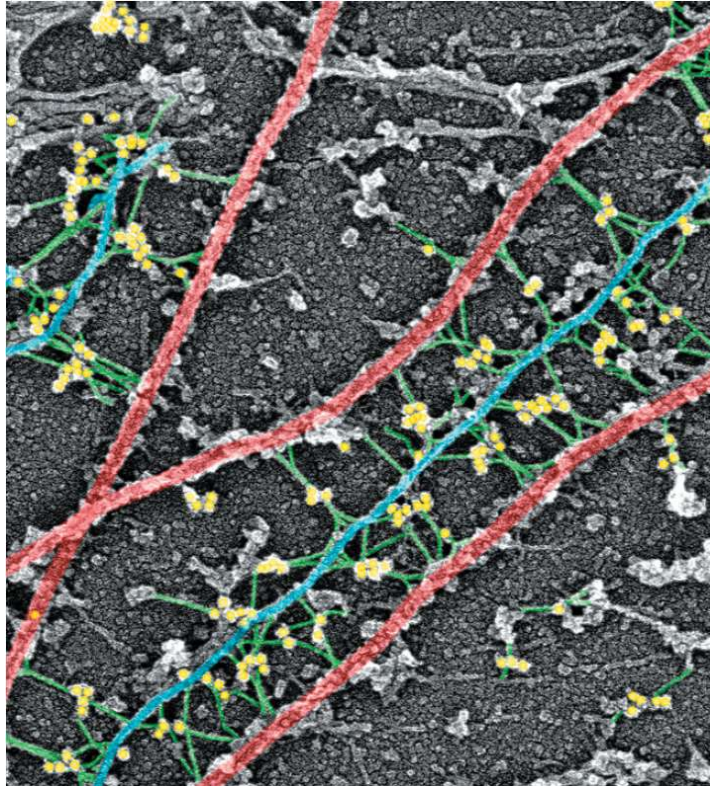
κυττάρων και στην διατήρηση της εσωτερικής οργάνωσης των κυττάρων δεδομένου ότι μπορούν να καθορίσουν τη θέση του ενδοπλασματικού δικτύου και του συστήματος Golgi. Επίσης είναι υπεύθυνοι για την ισοκατανομή των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση (μίτωση και μείωση), συμβάλλουν στην κίνηση των κυττάρων και των οργανιδίων τους και τέλος συμμετέχουν στη μεταφορά κυστιδίων, μορίων και κοκκίων στο εσωτερικό των κυττάρων (Brouhard & Rice, 2018). Ο ρόλος αυτός στην κινητικότητα και την κυτταρική διαίρεση, καθιστούν τους μικροσωληνίσκους στόχο πολλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων προκαλώντας τον αποπολυμερισμό τους ή τη σταθεροποίησή τους (Jordan & Wilson, 2004).

Η δεύτερη δομή που υπάρχει στον κυτταροσκελετό είναι τα νημάτια ακτίνης, τα οποία αποτελούνται από την πρωτεΐνη ακτίνη και έχουν διάμετρο περίπου 6 nm. Τα νημάτια ακτίνης αποτελούνται από μόρια σφαιρικής ακτίνης (G-ακτίνη), τα οποία σχηματίζουν τη νηματοειδή ακτίνη (F-ακτίνη) και πολυμερίζονται στο (+) άκρο ύστερα από την προσθήκη μονομερών ακτίνης (Εικόνα 3). Τα νημάτια ακτίνης έχουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση φαγοκυττάρων, στη δημιουργία μικρολαχνών, την κυτταρική κίνηση και την κυτταρική μετανάστευση. Είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό μόνιμων δομών στην επιφάνεια των κυττάρων (μικρολάχνες), είτε παροδικών δομών (περιφερικός δακτύλιος, ελασματοπόδια ή φιλοπόδια για τη μετακίνηση των κυττάρων (Paul & Pollard, 2009).



Εικόνα 3: Συναρμολόγηση και δομή των ινιδίων ακτίνης. Τα μονομερή ακτίνης (G) πολυμερίζονται και σχηματίζουν ινίδια ακτίνης (F). Το πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός διμερών και τριμερών, τα οποία αυξάνονται στη συνέχεια με προσθήκη μονομερών και στα δύο άκρα.

Τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν διάμετρο περίπου 10 nm με βασική λειτουργία τη μηχανική υποστήριξη σε συνεργασία με τους μικροσωληνίσκους. Δυο είναι οι βασικές κατηγορίες ενδιάμεσων ινιδίων, τα κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια, τα οποία περιλαμβάνουν τις κερατίνες, τα νευροϊνίδια και τη βιμεντίνη και τα πυρηνικά ενδιάμεσα ινίδια, τα οποία περιλαμβάνουν τις πυρηνικές λαμίνες. Τα ενδιάμεσα ινίδια συναντώνται μόνο στα ζωικά κύτταρα και είναι μια ομάδα ινιδίων που χαρακτηρίζεται από ετερογένεια. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από έξι κύριες οικογένειες, οι οποίες κωδικοποιούνται από περίπου 50 διαφορετικά γονίδια, ενώ στον άνθρωπο κωδικοποιούνται τουλάχιστον 67 διαφορετικά γονίδια. Η μεταξύ τους σύνδεση γίνεται με αλυσίδες πλεκτίνης (Εικόνα 4). Η λειτουργικότητά τους στο κύτταρο είναι κυρίως μηχανική. Συγκεκριμένα συμβάλλουν στην κατανομή και διασπορά των δυνάμεων προστατεύοντας τα κύτταρα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη από τη θραύση. (Draber & Dráberová, 2012).

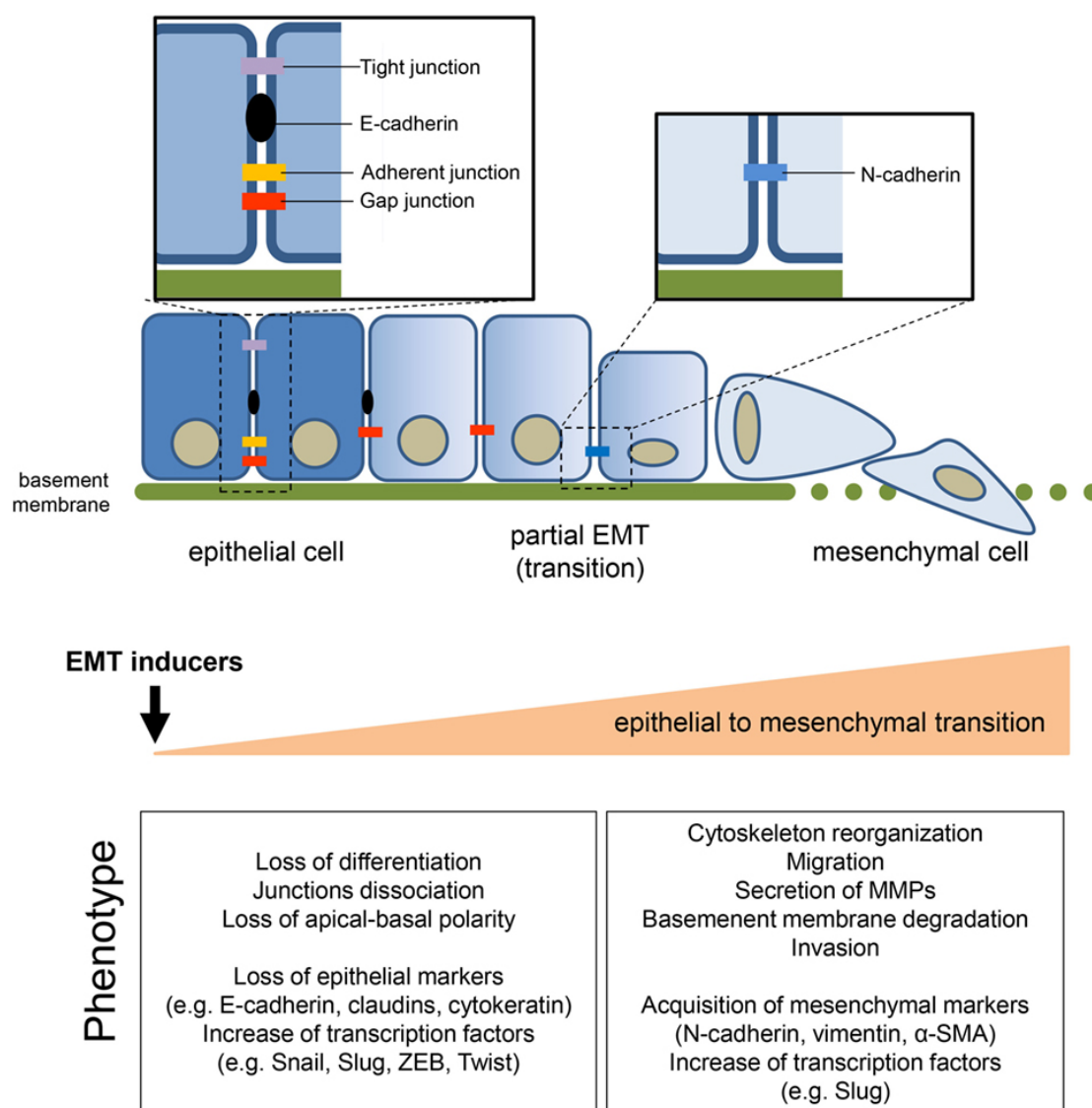


Εικόνα 4: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Με πράσινο απεικονίζονται οι γέφυρες πλεκτίνης ανάμεσα στα μπλε ενδιάμεσα ινίδια και τους κόκκινους μικροσωληνίσκους.

Η αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού είναι βασική διεργασία της κυτταρικής μετανάστευσης, κυτταρικής διήθησης και μετάστασης και αποτελεί και κύρια διαδικασία της μετάβασης των κυττάρων από επιθηλιακά κύτταρα σε μεσεγχυματικά. Η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition, EMT) είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα επιθηλιακό κύτταρο αποκτά μεσεγχυματικό φαινότυπο, χάνει τις κυτταρικές του συνδέσεις, αυξάνεται η ικανότητά του να μεταναστεύει και να κινείται, αποκτά ικανότητα διήθησης, αντιστέκεται σε μηχανισμούς απόπτωσης και παράγει συστατικά εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) (Morandi, Taddei, Chiarugi, & Giannoni, 2017) (Εικόνα 5).

Η διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις και κατηγοριοποιείται βάσει των μορφολογικών αλλαγών που υφίστανται το κύτταρο. Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι πόλωση,

δημιουργία προεξοχών στο άκρο που προπορεύεται, προσκόλληση στο υπόστρωμα, μετατόπιση του σώματος του κυττάρου και οπισθοχώρηση του οπίσθιου τμήματος. Οι φυσιολογικές διεργασίες στις οποίες παρατηρείται κυτταρική μετανάστευση είναι η μετανάστευση κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και η γαστριδίωση κατά την εμβρυογένεση, η ανοσολογική απόκριση και επούλωση τραυμάτων ιστών. Μία από τις παθολογικές διεργασίες όπου παρατηρείται κυτταρική κίνηση είναι ο καρκίνος, όπου γίνεται μετανάστευση σε άλλους υγιείς ιστούς (Brabletz, Kalluri, Nieto, & Weinberg, 2018).



Εικόνα 5: Γενικά χαρακτηριστικά της επιθήλιο-μεσεγγυματικής μετάβασης (EMT). Η μετάβαση των κυττάρων από επιθηλιακό σε μεσεγγυματικό φαινότυπο επάγεται από πολλούς παράγοντες, χάνεται η διακυτταρική αλληλεπίδραση και η κυτταρική πολικότητα. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες (E-cadherin, cytokeratin) οι οποίοι όταν απενεργοποιούνται χάνεται ο επιθηλιακός φαινότυπος και η έκφραση άλλων παραγόντων (Slug, N-cadherin, vimentin) έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεσεγγυματικού φαινοτύπου) (Morandi et al., 2017).

Ανάλογα τον τύπο των κυττάρων η κίνηση είναι διαφορετική, για παράδειγμα οι ινοβλάστες και τα μελανοκύτταρα μεταναστεύουν σαν μεσεγχυματικά ως μονήρη κύτταρα και εμφανίζουν έντονη προσκολλητική ικανότητα. Δημιουργούν προεξοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, δομές που ονομάζονται ελασματοπόδια (αποτελούνται κυρίως από ακτίνη) και αποτελούν το εμπρόσθιο μέρος του κυττάρου.

1.2. Επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT)

Η καρκινογένεση αποτελεί μια διαδικασία πολλών βημάτων μέσω των οποίων τα καρκινικά κύτταρα υφίστανται μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές και έτσι τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης αυτές οι διαδικασίες προσδίδουν και άλλες ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα όπως την αποφυγή ελέγχου από το ανοσοποιητικό σύστημα, αποφυγή μηχανισμών απόπτωσης αλλά και την ικανότητα μετανάστευσης και διήθησης σε άλλους υγιείς ιστούς. Για τη δυνατότητα διήθησης και μετάστασης σε άλλους υγιείς ιστούς, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition, EMT) (Morandi et al., 2017).

Τα επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μηχανισμών πρόσδεσης με τον κυτταροσκελετό γειτονικών κυττάρων αλλά και πρόσδεσης με τη θεμέλια ουσία και έτσι διατηρείται η δομική ακεραιότητα του επιθηλίου. Η δημιουργία αποφρακτικών συνδέσεων, συνδέσεων πρόσδεσης και επικοινωνίας και η έκφραση υψηλών επιπέδων E-καντερίνης (E-cadherin) είναι οι κατεξοχήν υπεύθυνοι λόγοι της εμφάνισης επιθηλιακού φαινοτύπου των κυττάρων. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα εξαιτίας της τάσης για κινητικότητα αλληλοεπιδρούν με άλλα γειτονικά μέσω εστιακών σημείων και εκφράζουν N-καντερίνη (N-cadherin), φιμπρονεκτίνη και βιμεντίνη. Τα βασικά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων φαίνονται στον Πίνακα 1.

Η αρχική θεώρηση ότι τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να χάσουν τον επιθηλιακό τους χαρακτήρα και να αποκτήσουν ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο διατυπώθηκε ύστερα από τις πειραματικές παρατηρήσεις της Hay, στις αρχές της δεκαετίας του 1980.

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων.

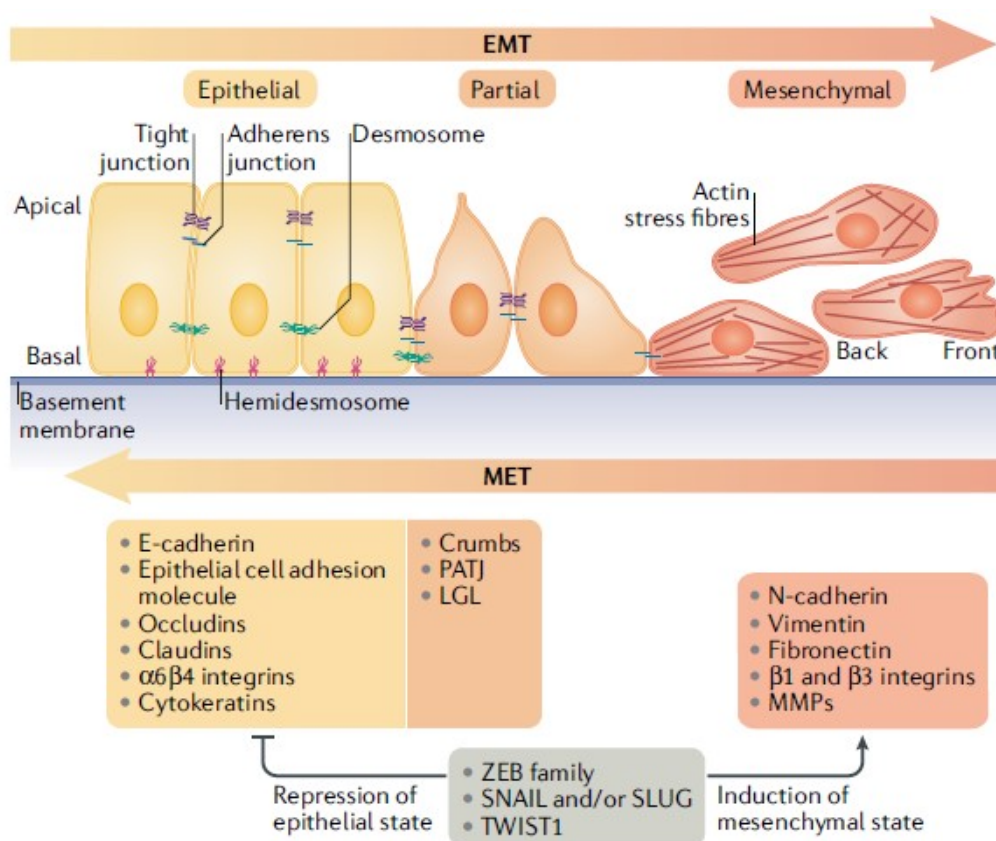
| Επιθηλιακά κύτταρα | Μεσεγχυματικά κύτταρα |
|---|---|
| Η διάταξη είναι σε στρώσεις ή σε στιβάδες | Ατρακτοειδής μορφολογία |
| Οι διακυτταρικές συνδέσεις είναι πολύ στενές | Μικρή συνοχή μεταξύ των κυττάρων |
| Εμφανίζουν πολικότητα | Δεν εμφανίζουν πολικότητα |
| Στερεή προσκόλληση σε ινώδη βασικό υμένα | Ανεξάρτητη κίνηση μεταξύ των κυττάρων |
| Υψηλά επίπεδα έκφρασης επιθηλιακών παραγόντων (E-καντερίνη) | Υψηλά επίπεδα έκφρασης μεσεγχυματικών παραγόντων (N-καντερίνη, φμπρονεκτίνη, βιμεντίνη) |

Η EMT αποτελείται από μια σειρά πολύπλοκων βημάτων που συντονίζεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που εκκινούν τη μετάπτωση. Για την δυνατότητα της μετατροπής σε μεσεγχυματικά κύτταρα και την κίνηση των κυττάρων με σκοπό τη μετανάστευση πρέπει να αναδιοργανωθεί ο κυτταρικός σκελετός. Είναι μια αναστρέψιμη βιολογική διεργασία και παρατηρήθηκε κατά τα στάδια της εμβρυογένεσης, της επιδιόρθωσης λαθών, της κυτταρικής διαφοροποίησης καθώς και της αναδιαμόρφωση ιστών, αλλά εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ίνωση (Brabletz et al., 2018).

Κατά την έναρξη της EMT αρχικά χάνονται οι κυτταρικές συνδέσεις ενώ η πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων μετατρέπεται από κορυφαία-βασεοπλευρική σε πρόσθια-οπίσθια. Ταυτόχρονα καταστέλλεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον επιθηλιακό χαρακτήρα των κυττάρων και αρχίζουν να εκφράζονται γονίδια που σχετίζονται με τον μεσεγχυματικό φαινότυπο. Ο κυτταροσκελετός ακτίνης αναδιοργανώνεται και δημιουργούνται ελασματοπόδια (lamellipodia), νηματοπόδια (filopodia) και πόδια διήθησης που δίνουν στα κύτταρα τη δυνατότητα της κίνησης. Εκφράζεται επίσης μια ομάδα μεταλλοπρωτεϊνών, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και έτσι τα κύτταρα μπορούν να μεταναστεύουν σε νέες απομακρυσμένες θέσεις. Μέσω της

μεσεγχυματικής επιθηλιακής μετάβασης (MET) τα κύτταρα επιστρέφουν στον επιθηλιακό φαινότυπό τους (Kalluri & Weinberg, 2009) (Εικόνα 6).

Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι ZEB (zinc-finger E-box-binding), bHLH (basic helix-loop-helix), SNAIL και Twist καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που αποτελούν επιθηλιακούς δείκτες και ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με το μεσεγχυματικό φαινότυπο. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της EMT και η ρύθμιση της ενεργότητάς τους, η εντόπιση στα κυτταρικά οργανίδια και η σταθερότητά τους εξαρτώνται από μετά μεταγραφικές τροποποιήσεις (Miyoshi et al., 2005; Miyoshi et al., 2004).



Εικόνα 6: Διαδικασίες επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πολωμένα, δημιουργούν συνδέσεις με τα διπλανά, γειτονικά κύτταρα και με τη βασική μεμβράνη. Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ZEB, SNAIL, SLUG, TWIST αναστέλλει την έκφραση των επιθηλιακών γονιδίων και ενεργοποιεί την έκφραση των μεσεγχυματικών γονιδίων. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων και επάγεται η κινητικότητα των κυττάρων (Dongre & Weinberg, 2018).

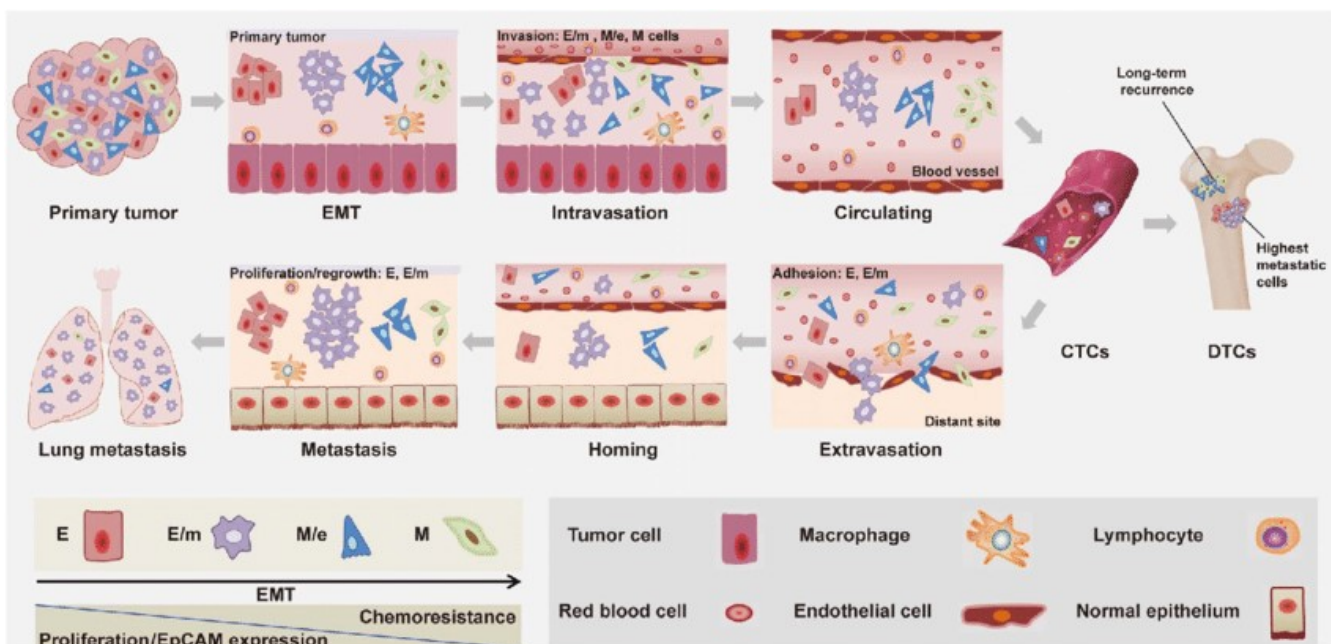
Έχουν βρεθεί τρεις υποτύποι της EMT. Η EMT τύπου 1 επάγεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και κυρίως στα

στάδια της γαστριδίωσης. Ο τύπος αυτός EMT δεν είναι ικανός να οδηγήσει σε ίνωση ή διήθηση κυττάρων και τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προκύπτουν έχουν την ικανότητα να υποστούν και την αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή τη μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάπτωση (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET). Διαταραχές στο σηματοδοτικό μονοπάτι αυτό έχουν ως αποτέλεσμα τα έμβρυα να μην προχωρούν στην γαστριδίωση και να αναστέλλεται ο σχηματισμός την νευρικής ακρολοφίας.

Η EMT τύπου 2 παρατηρείται σε περιπτώσεις αναγέννησης ιστών, επούλωσης πληγών και ίνωσης των οργάνων. Ειδικά στην περίπτωση της συμμετοχής της στη διαδικασία της φλεγμονής, η διαδικασία σταματά μετά την υποχώρηση της φλεγμονής. Στην περίπτωση όμως της επίμονης φλεγμονής μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση. Σε πειραματικά μοντέλα μυών, με νεφρική και ηπατική ίνωση, το 40% της έκκρισης του κολλαγόνου προέρχεται από την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω EMT.

Τέλος η EMT τύπου 3 παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα των οποίων τα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν υποστεί γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές σε συνδυασμό με την EMT, προσδίδει την ικανότητα της διείσδυσης και της μετάστασης. Η πορεία EMT και τα διαφορετικά γονίδια που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών σχετικά με την χρήση των γονιδίων της EMT ως προγνωστικούς δείκτες είτε ως θεραπευτικούς στόχους για την αναστροφή της EMT (Sistigu, Modugno, Manic, & Nistico, 2017).

Οι νεότερες μελέτες δείχνουν την άμεση εμπλοκή της καρκινογένεσης με την EMT. Η ενεργοποίηση της EMT οδηγεί στην αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο και τη μετάστασή τους σε άλλους υγιείς ιστούς μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Τα μεταστατικά κύτταρα έχουν ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο και ένα εξασθενημένο σύστημα κυτταρικής προσκόλλησης εξαιτίας του EMT. Τέσσερα στάδια EMT έχουν αποκαλυφθεί κατά τη διαδικασία μετατροπής ενός καρκινικού επιθηλιακού κυττάρου σε μεσεγχυματικό (Εικόνα 7) (X. Liu et al., 2019).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης κατά την μετάσταση των όγκων. Ο πρωτοπαθής όγκος είναι κυρίως επιθηλιακής φύσης και μέσω 4 σταδίων EMT τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά (X. Liu et al., 2019).

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο EMT και είτε προέρχονται από κύτταρα πρωτοπαθούς όγκου που έχουν υποστεί EMT είτε απέκτησαν τον ενδιάμεσο φαινότυπο ύστερα από την έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις TGFβ. Η δυνατότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων να αποκτήσουν εκ νέου επιθηλιακό φαινότυπο, αποδεικνύει την πλαστικότητα των όγκων και δείχνει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αυτά δημιουργούν αποικίες σε νέες μεταστατικές εστίες (X. Liu et al., 2019).

Ανάλογα με τα σηματοδοτικά μονοπάτια και τον ιστό, τα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να χάσουν μόνο ένα μέρος των χαρακτηριστικών τους και έτσι να οδηγηθούν σε μεικτό φαινότυπο. Η αντίστροφη διαδικασία, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω είναι η μεσεγχυματική επιθηλιακή μετάπτωση (MET). Η πιο συνηθισμένη παρατήρηση της MET έχει πραγματοποιηθεί αφού τα καρκινικά κύτταρα έχουν διηθηθεί στον ιστό στόχο. Εκείνη τη χρονική στιγμή ξεκινάει η αντίστροφη διαδικασία, όπου τα μεσεγχυματικά κύτταρα, επιστρέφουν στον επιθηλιακό τους φαινότυπο και εγκαθίστανται στον νέο ιστό. Έτσι πραγματοποιείται η μεσεγχυματική επιθηλιακή μετάβαση, η οποία ξεκινά με την έκφραση της E-καντερίνης και εν μέρει

αιτιολογεί τον λόγο όπου οι δευτεροπαθείς όγκοι διατηρούν τα ίδια ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά με τον πρωτοπαθή όγκο (Aiello & Kang, 2019).

1.3. Κυτταρική σηματοδότηση στην EMT

Πλήθος διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών και γεγονότων έχουν ταυτοποιηθεί ότι συμμετέχουν στην έναρξη και ολοκλήρωση της EMT. Από τα πιο γνωστά είναι η αναδιοργάνωση και έκφραση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, η ενεργοποίηση υποδοχέων με ενεργότητα κίνησης τυροσίνης και η ενεργοποίηση του Wnt/β-κατενίνη. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία 11 μοριακά μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται με την EMT.

Απώλεια E-καντερίνης

Η E-καντερίνη (όπως θα αναλυθεί και παρακάτω) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με βασικό ρόλο στη διατήρηση των κυτταρικών συνδέσεων μεταξύ γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων. Καθοριστικό γεγονός της EMT αποτελεί η αναστολή της έκφρασης της E-καντερίνης, η οποία πραγματοποιείται είτε σε παθολογικές καταστάσεις όπως η καρκινογένεση και η ίνωση, είτε φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η υπερμεθυλίωση ή η αποσιώπηση παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της E-καντερίνης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μηχανισμοί που ευθύνονται για την απώλεια αυτή είναι μεταλλάξεις του γονιδίου *cdh1*, οι οποίες οδηγούν στην αποσιώπηση του προαγωγέα του γονιδίου της E-καντερίνης και την αναστολή του υποκινητή της. Οι μεταγραφικοί παράγοντες SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB2, KLF8 και E47 προσδέονται στον υποκινητή του γονιδίου της E-καντερίνης, αναστέλλοντας έτσι την μεταγραφή του γονιδίου, ενώ οι παράγοντες Twist, TCF4, FOXC2 και η πρωτεΐνη SIX1 καταστέλλουν την έκφραση της E-καντερίνης. Η απώλεια της E-καντερίνης οδηγεί στην απελευθέρωση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και στην υπερέκφραση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι συμμετέχουν στην πορεία και έναρξη της καρκινογένεσης.

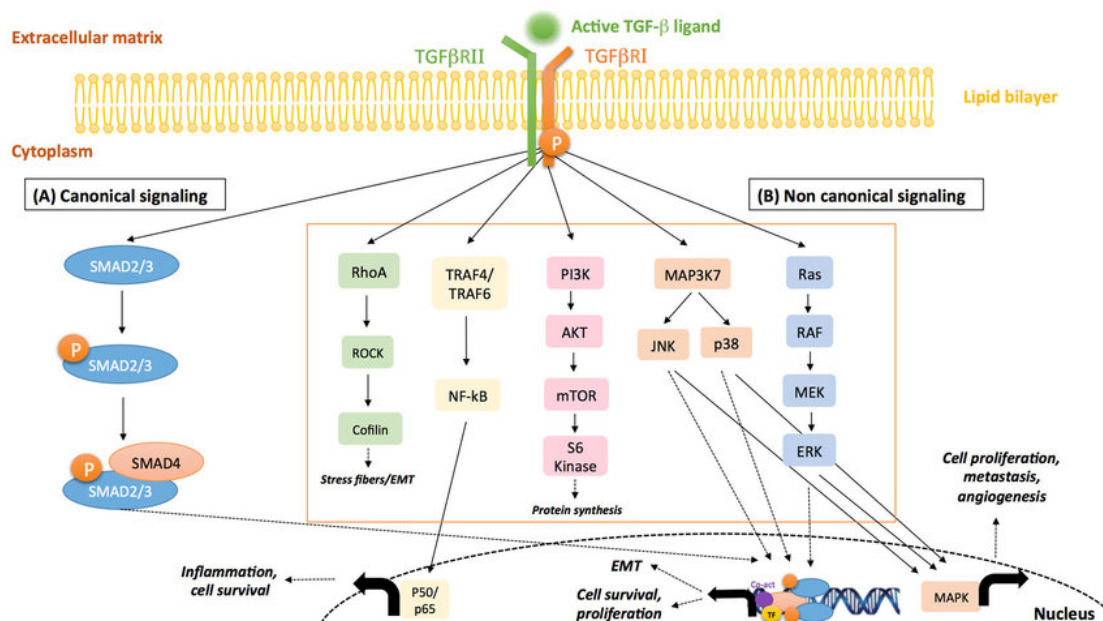
Η μειωμένη έκφραση της E-καντερίνης εξισορροπείται με την αύξηση της έκφρασης της N-καντερίνης με αποτέλεσμα την αλλαγή των τύπων συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων. Έτσι, τα κύτταρα χάνουν την «σφιχτή» σύνδεση με τα

γειτονικά τους και αποκτούν μεσεγγυματικό χαρακτήρα, διευκολύνοντας έτσι την κινητικότητα τους και την ικανότητα διήθησης και μετάστασής τους.

Αυξητικοί παράγοντες και EMT

Ο παράγοντας TGF- β είναι ένας αυξητικός παράγοντας ο οποίος δρα μέσω της πρόσδεσής του με υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης-τυροσίνης (RTKs). Η φυσιολογική του δράση σχετίζεται με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων και κατ' επέκταση με την παρεμπόδιση της διαδικασίας της καρκινογένεσης.

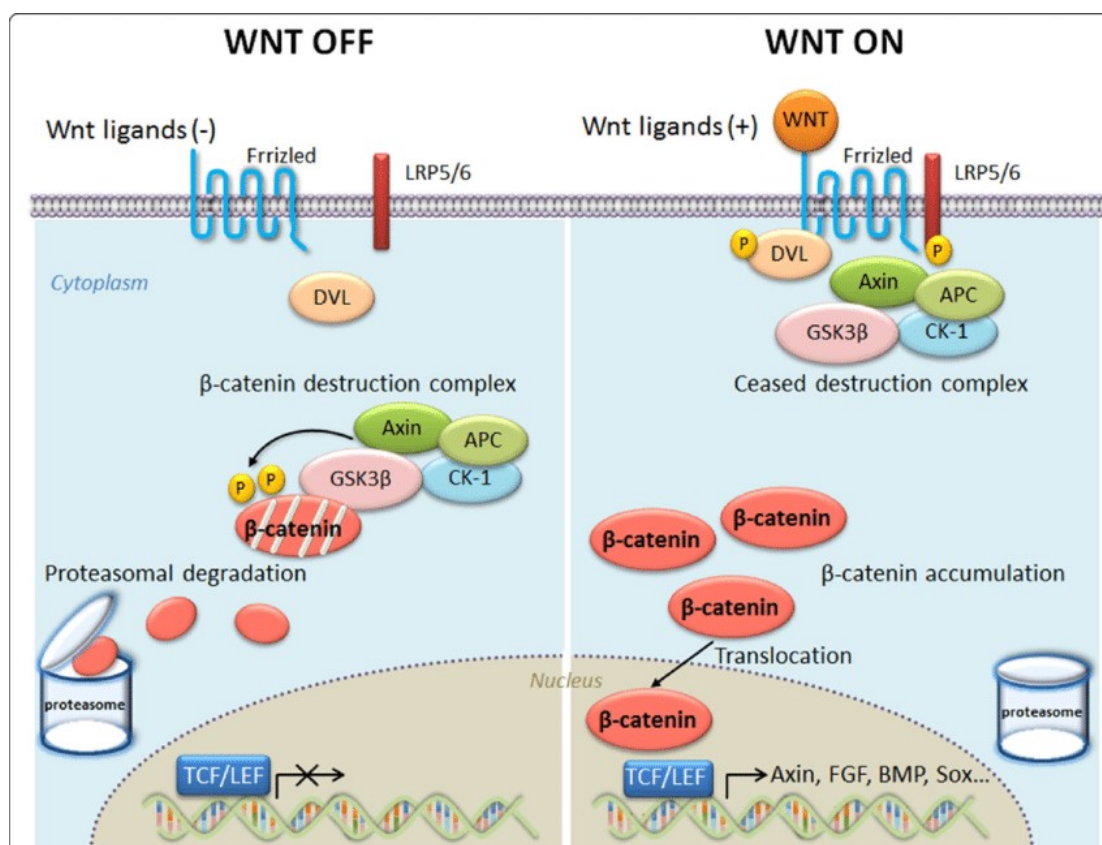
Δυο είναι οι πιθανοί οδοί μέσω των οποίων φαίνεται να ενεργοποιείται η EMT από τον παράγοντα TGF- β . Η πρώτη οδός σχετίζεται με τις πρωτεΐνες SMAD. Οι πρωτεΐνες SMAD σχηματίζουν τριμερή συμπλέγματα, τα οποία μετακινούνται στον πυρήνα και οδηγούν σε ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την έναρξη της διαδικασίας της EMT. Η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στις διαμεμβρανικές κινάσεις έχουν ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση και ενεργοποίησή τους και στη συνέχεια την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπάτιων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως τα μονοπάτια PI3K/Akt, MAPK/ERK, MAPK/p38 και το μονοπάτι JNK (Εικόνα 8). Οι αυξητικοί παράγοντες προσδέονται σε υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης-τυροσίνης (RTKs) με τους υποδοχείς EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) να επάγουν την EMT. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες είναι το μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK. Η φωσφορυλίωση των ERK1&2 επάγουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της EMT και παραγόντων που επάγουν την κυτταρική κινητικότητα και διήθηση. Οι κυριότεροι παράγοντες που ενεργοποιούνται είναι οι GTPάσες RHO και η ριβοσωμική πρωτεϊνική κινάση S6 (Levayer & Lécuit, 2008).



Εικόνα 8: Ο TGF- β στην EMT. Η κανονική και η μη κανονική σηματοδότηση που οδηγούν στην EMT μέσω του TGF β .

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης

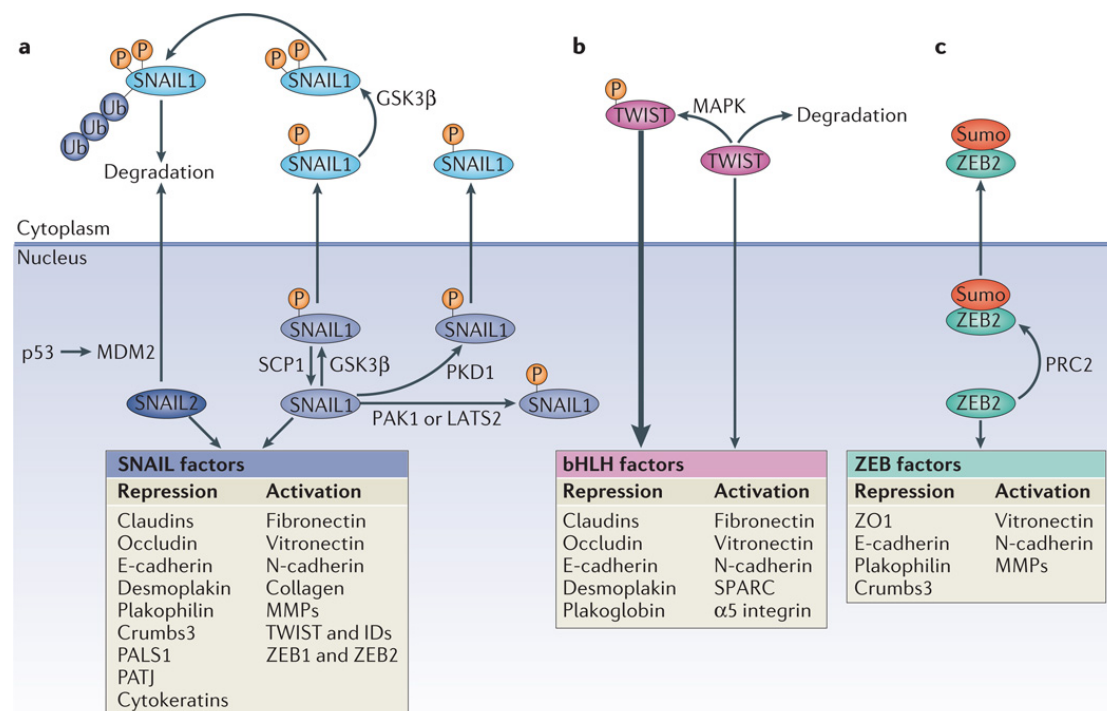
Εν συνεχεία, ένα σηματοδοτικό μονοπάτι του οποίου η ενεργοποίηση σχετίζεται άμεσα με τη διαδικασία EMT είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης (Εικόνα 8). Η πρωτεΐνη Wnt ανήκει σε μια οικογένεια γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών που εκφράζεται σε πλήθος ιστών. Η β -κατενίνη έχει δομικό ρόλο και συμμετέχει στην ένωση της E-καντερίνης με τα ινίδια ακτίνης. Φυσιολογικά, η β -κατενίνη που βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα δημιουργεί σύμπλοκο με τους παράγοντες Axin, APC, PP2A και GSK3 β . Κατά την EMT ο παράγοντας Wnt προσδένεται στο διαμεμβρανικό υποδοχέα Frizzled (άτυπος υποδοχέας προσδεμένος με G πρωτεΐνες). Ο υποδοχέας Frizzled μέσω των DVL πρωτεϊνών οδηγεί στη διάσπαση του συμπλόκου Axin και GSK3 β με αποτέλεσμα η GSK3 β να μην μπορεί να φωσφορυλιώσει τη β -κατενίνη και αυτή να παραμένει ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα. Η β -κατενίνη στην συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα και παρουσία των παραγόντων TCF και LEF επάγει την έκφραση των γονιδίων της EMT (c-myc, Cyclin D1 κ.ά.). Επομένως, τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt, Notch και hedgehog (HH) επάγουν την EMT μέσω της φωσφορυλίωσης και κατ' επέκταση της αναστολής της GSK3 β οδηγώντας σε σταθεροποίηση της β -κατενίνης (Εικόνα 9) (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).



Εικόνα 8: Το μονοπάτι WNT. Όταν το μονοπάτι WNT είναι ενεργό η β κατενίνη σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου παρουσία των TCF και LEF επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την EMT.

Μεταγραφικοί παράγοντες

Αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση διάφορων γονιδίων συμβάλλουν στην απώλεια του επιθηλιακού φαινοτύπου και την απόκτηση ενός μεσεγχυματικού φαινοτύπου. Για την έκφραση των γονιδίων αυτών υπεύθυνοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες, των οποίων η έκφραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ίνωση, την ανάπτυξη και την καρκινογένεση. Ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στην EMT εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο ή τον ιστό και συχνά ο ένας ελέγχει την έκφραση του άλλου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί εμπλέκονται τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στην καταστολή της EMT (Εικόνα 10).

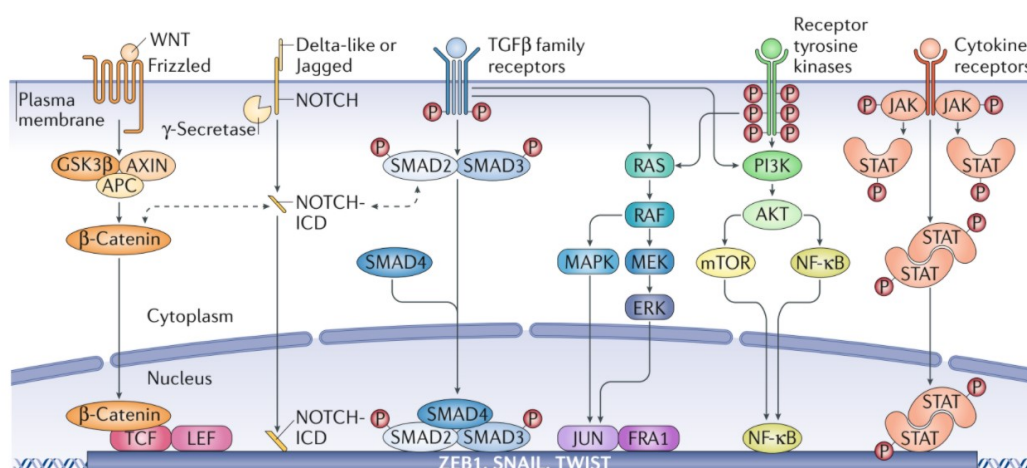


Εικόνα 10: Οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες στην EMT και τα γονίδια που ρυθμίζουν. α. Οι παράγοντες SNAIL β. Οι παράγοντες bHLH και γ. Οι παράγοντες ZEB.

Snail: Αποτελείται από 3 πρωτεΐνες εκ των οποίων οι Snail 1 (Snail) και Snail 2 (Slug) ενεργοποιούν την EMT κατά την ανάπτυξη, την καρκινογένεση και την ίνωση. Προσδένονται στο καρβοξυτελικό τμήμα των E-box αλληλουχιών DNA διάφορων επιθηλιακών γονιδίων και τα καταστέλλουν οδηγώντας έτσι σε μεσεγχυματικό φαινότυπο. Επίσης, ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες (TGF- β) και από σηματοδοτικά μονοπάτια (Wnt/ β -κατενίνη) και έτσι καταστέλλουν την έκφραση της E-καντερίνης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί και ο ρόλος τους στην καρκινογένεση, αφού φαίνεται να συμμετέχουν στην ικανότητα απόκτησης χαρακτηριστικών αρχέγονων καρκινικών κυττάρων ενώ μελέτες έχουν δείξει και τη θετική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Snail και σταδίου ογκογένεσης, μετάστασης, υποτροπής ακόμα και πτωχής πρόγνωσης.

bHLH (basic helix-loop-helix): Λειτουργούν σαν ρυθμιστές διαφοροποίησης κυττάρων και είναι ομοδιμερείς και ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι E12, E47, Twist1 και Twist2. Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας Twist1 καταστέλλει την έκφραση της E-καντερίνης και επάγει την έκφραση της N-καντερίνης ανεξάρτητα από το μεταγραφικό παράγοντα Snail.

ZEB (Zinc-finger E-box Binding): Οι παράγοντες ZEB1 και ZEB2 προσδένονται στα E-boxes, σε ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων και ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τη μεταγραφή τους. Οι παράγοντες SNAIL και TWIST1 συχνά οδηγούν στην ενεργοποίηση του ZEB1.

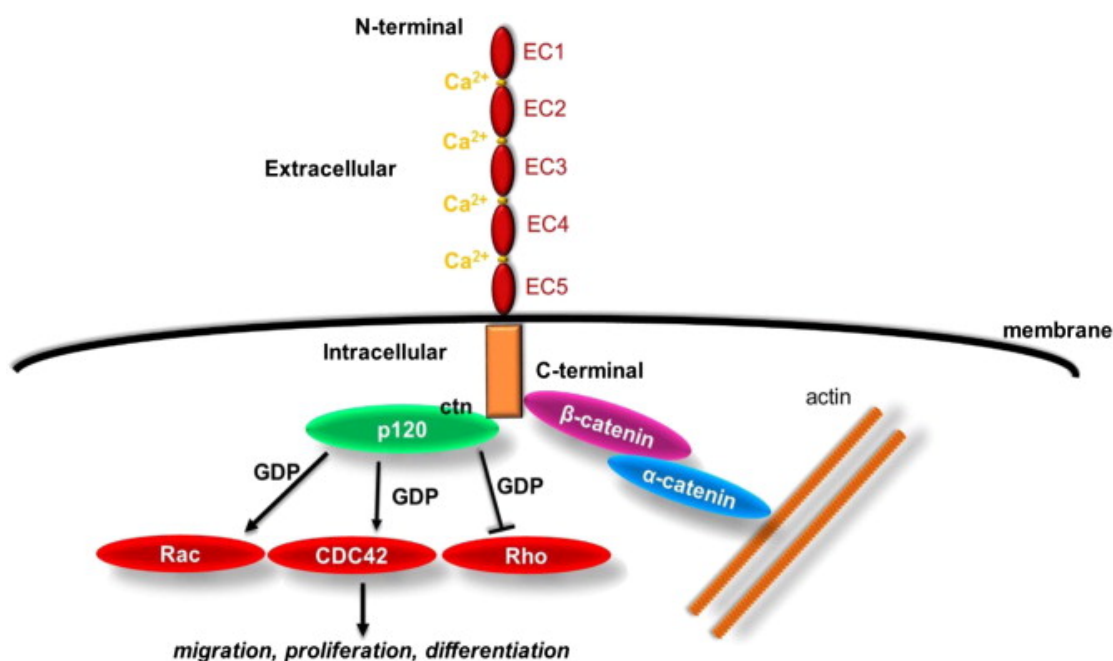


Εικόνα 11: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης της EMT. Η μεταγραφή των παραγόντων ZEB, SNAIL και TWIST ρυθμίζεται από πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών όπως τα μονοπάτια PI3K/Akt, ERK, JNK. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες είτε από κυτταροκίνες. Επίσης τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt και Notch επάγουν μέσω της β-κατενίνης την έκφραση αυτών των παραγόντων (Dongre & Weinberg, 2018).

Επίσης κατά την διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων ή καρκίνου, εκφράζεται η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η οποία ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT3, που με την σειρά του επάγει τον παράγοντα SNAIL1. Η επαγωγή της EMT μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης μέσω του παράγοντα HIF1a (Hypoxia Induced Factor 1a), ο οποίος επάγεται στο μικροπεριβάλλον των όγκων όταν επικρατούν καταστάσεις υποξίας, και μέσω της ενεργοποίησης του TWIST ενεργοποιείται η EMT (Gonzalez & Medici, 2014) (Εικόνα 11).

1.4. Καντερίνες

Οι καντερίνες αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της EMT όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω. Είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}). Αποτελούνται περίπου από 720-750 αμινοξικά κατάλοιπα και η γονιδιακή τους ρύθμιση πραγματοποιείται μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Αποτελούν πρωτεΐνες προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων. Έχουν ταυτοποιηθεί 100 μέλη στην οικογένεια των καντερινών και όλες έχουν την ίδια εξωκυττάρια και χαρακτηριστική επανάληψη ECD (Extracellular cadherin domain) (Εικόνα 12) (Shapiro & Weis, 2009).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της δομής και της λειτουργίας των καντερινών. Εξωκυττάρια, στην αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, οι καντερίνες αποτελούνται από χαρακτηριστικές EC περιοχές στις οποίες προσδένονται τα ιόντα ασβεστίου. Το ενδοκυττάρια τμήμα αλληλεπιδρά με την p120 και τη β- και α-κατενίνη (Alimperti & Andreadis, 2015).

Η κλασική κατηγοριοποίηση των καντερινών αναφέρει 6 υποομάδες. Οι πιο συχνά συναντούμενες είναι, η κλασική καντερίνη (Τύπου I) όπου περιλαμβάνει την E-καντερίνη, τη N-καντερίνη (neural, *Cdh2*), την P-καντερίνη (placental, *Cdh3*), τη VE-καντερίνη (vascular endothelial, *Cdh5*) και την R-καντερίνη (retinal, *Cdh4*) και οι καντερίνες τύπου II που περιλαμβάνει καντερίνες δεσμοσωμάτων, πρωτοκαντερίνες (Lee & Reichardt, 2009).

1.4.1. E-καντερίνη

Το γονίδιο της E-καντερίνης (epithelial, Cdh1) εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 16 ή στο χρωμόσωμα 8 στους μύες. Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την E-καντερίνη είναι το CD324. Η E-καντερίνη εκφράζεται στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ενώ στο στάδιο της νευρικής πλάκας εκφράζεται η N-καντερίνη και μειώνεται ταυτόχρονα η έκφραση της E-καντερίνης. Αφού ολοκληρωθεί η εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι καντερίνες έχουν ως ρόλο τη διατήρηση των κυτταρικών και ιστικών δομών αλλά και την κυτταρική κίνηση (Norton et al., 2007).

Το αμινοτελικό άκρο βοηθά στην σύνδεση με τα γειτονικά κύτταρα. Πέντε εξωκυττάρειες περιοχές που αποτελούνται από τις επαναλήψεις EC (EC 1-5, συνολικά 550 αμινοξικά κατάλοιπα), μια εξαιρετικά συντηρημένη κυτταροπλασματική περιοχή (150 αμινοξικά κατάλοιπα), μια διαμεμβρανική περιοχή, το καρβοξυτελικό άκρο που προσδέεται με την α - και β -κατενίνη και την p120. Αρχικά, η E-καντερίνη μεταφέρεται ως προ-πρωτεΐνη από το σύμπλοκο Golgi στην κυτταροπλασματική επιφάνεια και στα πρώιμα στάδια της σύνθεσής της αλληλεπιδρά με τη β -κατενίνη. Όταν η E-καντερίνη φτάσει στην κυτταροπλασματική επιφάνεια αλληλεπιδρά με την p120 και την α -κατενίνη. Η α -κατενίνη είναι προσδεσμένη ως διμερές με την β -κατενίνη. Η σύνδεση της E-καντερίνης δε γίνεται άμεσα με την α -κατενίνη αλλά μέσω πρόσδεσης του 76^{ov} αμινοξικού καταλοίπου. Η έκφρασή της γίνεται κυρίως σε επιθηλιακούς ιστούς και η αναγέννησή της πραγματοποιείται με χρόνο ημιζωής 5 ώρες (Kowalczyk & Nanes, 2012).

Ο ρόλος του συμπλόκου E-καντερίνης/ β -κατενίνης σχετίζεται με την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως αυτό του μονοπατιού των Wnt, PI3K/Akt, την ενεργοποίηση των GTPασών Rho και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B (Tian et al., 2011).

1.4.2. N-καντερίνες

Η N-καντερίνη (CADH2) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 130 kDa. Συναντάται κυρίως σε νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε

νευρογλοιακά κύτταρα. Επίσης εκφράζεται στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, σε μυοκαρδιακά, σε μυοκύτταρα και σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Nalla, Estes, Patel, & Rao, 2011). Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ρόλο προσκόλλησης, συγκροτεί συνάψεις και μπορεί να αποδώσει πλαστικότητα και μνήμη στις συνάψεις αυτές. Η εξωκυττάρια προσκόλλησή της επάγει τη δομική σταθερότητα και διευκολύνει την ενδοκυττάρια σήμανση. Η έκφραση της N-καντερίνης επάγεται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος και κατά την διάρκεια της επιμήκυνσης των νευρώνων και των αστροκυττάρων. Στους ενήλικες αντίθετα, η έκφραση της N-καντερίνης είναι μειωμένη. Τα καρκινικά κύτταρα, όταν εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την N-καντερίνη, χαρακτηρίζονται από μεταστατικότητα και διηθητική ικανότητα.

Όπως και η E-καντερίνη, έτσι και η N-καντερίνη αποτελείται από μία εξωκυττάρια περιοχή από πέντε επαναλαμβανόμενες αμινοξικές αλληλουχίες (EC1-EC5). Η ενδοκυττάρια περιοχή αποτελείται από μία υψηλά διατηρημένη περιοχή και μπορεί να αλληλοεπιδρά με κατενίνες, μόρια του κυτταροσκελετού και ακτίνες (Zuppinge, Erpenberger-Eberhardt, & Erpenberger, 2000).

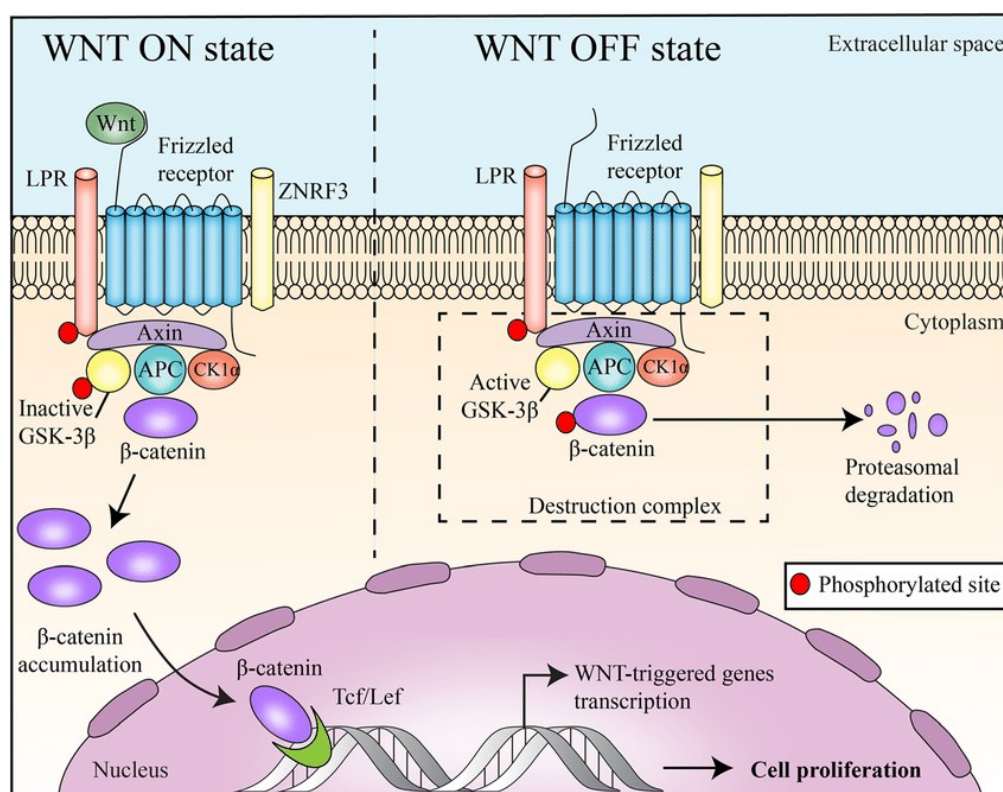
Η N-καντερίνη δρα συνεργατικά με τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) και επάγουν την ικανότητα διήθησης των κυττάρων προωθώντας την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επιπλέον επάγεται η κυτταρική σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα FGFR, ο οποίος με την σειρά του επάγει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση τη διήθησή τους. Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι η υποπεριοχή EC4 είναι αυτή που φυσιολογικά επάγει την αύξηση των δενδριτικών κυττάρων, αλλά σε περιπτώσεις όγκων επάγει την διήθηση (Qian et al., 2014).

1.4.3. Β-κατενίνη

Η ανθρώπινη β-κατενίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο CTNNB1, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και αποτελεί μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 92 kDa που αποτελείται από 781 αμινοξέα. Έχει διπλό ρόλο, αφού αποτελεί συστατικό του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt αλλά και δομικό συστατικό των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων. Εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα

και αποτελείται από μία περιοχή, η οποία περιέχει δεκατρείς επαναλήψεις σαράντα αμινοξέων Armadillo. Οι περιοχές αυτές αναδιπλώνονται σε μία περιοχή, η οποία ονομάζεται Armadillo domain (ARM). Το αμινοτελικό άκρο της β-κατενίνης έχει θέση πρόσδεσης με την α-κατενίνη και θέση φωσφορυλίωσης για την GSK3 και την CK (Casein Kinase) (Xing et al., 2008).

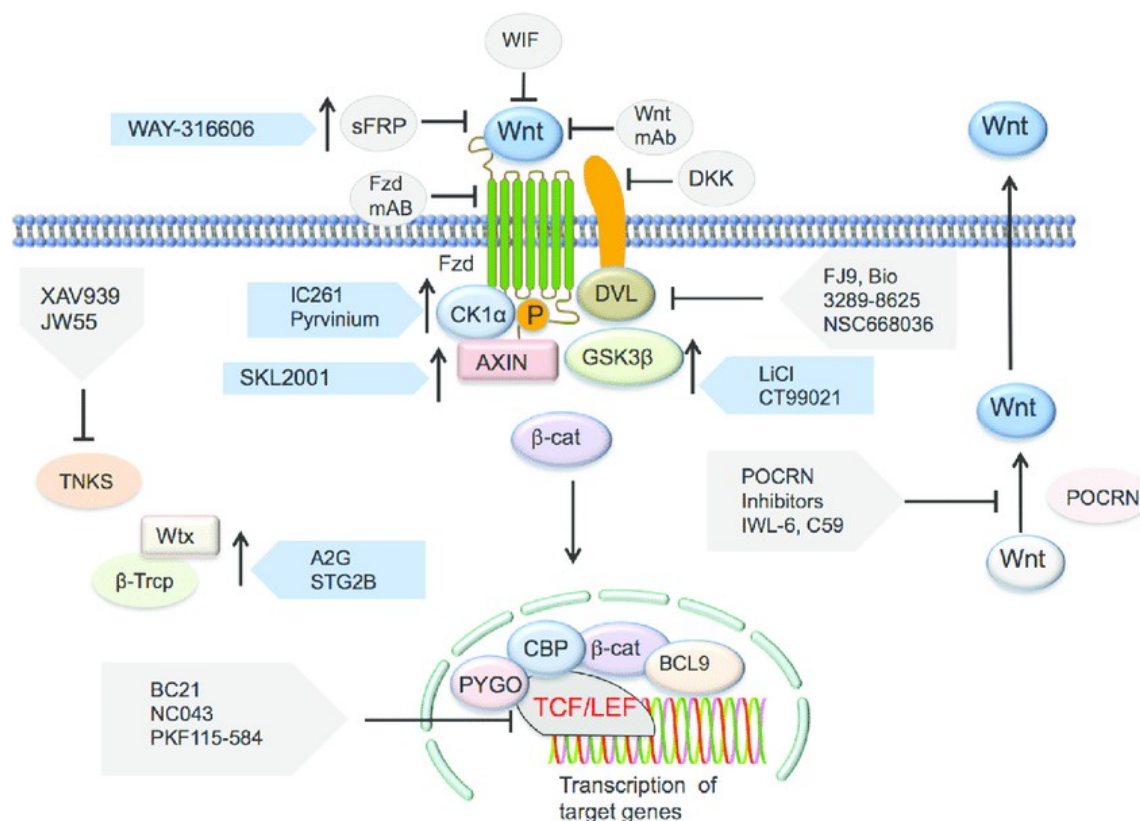
Η β-κατενίνη είναι μέλος του συμπλέγματος πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την δημιουργία αλλά και τη διατήρηση κυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Η εμπλοκή της στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο αποδόμησης PP2A (Protein Phosphatase 2A), CK1, GSK3b, APC και Axin.



Εικόνα 13: Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β-catenin. Αποτελεί μία οδό συντηρημένης εξέλιξης, η οποία ρυθμίζει πολλές από τις βασικές λειτουργίες ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Όταν το σηματοδοτικό μονοπάτι είναι σε κατάσταση ON η πρωτεΐνη Wnt προσδένεται στον υποδοχέα LPR και απενεργοποιεί την GSK3. Έτσι η β-κατενίνη μετατοπίζεται στον πυρήνα και δημιουργεί διμερές με τον μεταγραφικό παράγοντα Tcf/Lef επάγοντας έτσι την μεταγραφή των γονιδίων στόχων της Wnt που σηματοδοτεί την έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην κατάσταση OFF όπου δεν προσδένεται η Wnt στον LPR η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο αποδόμησης Axin-GSK3b-APC-CK1 και ανοικοδομείται (Pai et al., 2017).

Τα γονίδια στόχοι της β-κατενίνης έχουν πολύ διαφορετικούς ρόλους π.χ. η Cyclin D1 και η c-Myc έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ η PPARδ, η COX2 και η MDR1 αναστέλλουν την απόπτωση. Οι MMP και η λαμινίνη έχουν ρόλο στην πρόοδο του όγκου και ο VEGF είναι αυξητικός παράγοντας. Στον πυρήνα των κυττάρων η β-κατενίνη συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/Lef, οι οποίοι ενεργοποιούν τα γονίδια c-Myc, TCF1 και Cyclin D1 (Lecarpentier, Schussler, Hébert, & Vallée, 2019).

Το σύμπλοκο β-κατενίνης/E-καντερίνης επιτρέπει στην α-κατενίνη να δεσμευθεί με την ακτίνη του κυτταροσκελετού και να αναστείλει την κυτταρική διαίρεση. Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν το σύμπλοκο αποδόμησης έχουν συνδεθεί με πολλούς τύπους καρκίνου. Αγωνιστές των Wnt (Εικόνα 14) οδηγούν σε αυξημένη σηματοδότηση και φαίνεται ότι μπορούν να δράσουν ευεργετικά έναντι μεταστάσεων. Το Foxyl αποτελεί ένα εξαπεπτίδιο που μιμείται το Wnt5a, προσδένεται στους υποδοχείς Frizzled2 και Frizzled5 και φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, καρκίνο του παχέος εντέρου και καρκίνου του μαστού, το οποίο βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης 1 (Canesin et al., 2017).



Εικόνα 14: Πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι του καρκίνου στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-catenin. Φαίνεται πως η αναστολή του συμπλόκου αποδόμησης της β-κατενίνης επηρεάζει την σταθερότητα της β-κατενίνης επιδρώνοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι αναστολείς στα γονίδια στόχους της β-κατενίνης (π.χ. COX) πιστεύεται ότι σχετίζονται με την αύξηση της ουβικιτινύλωσης της β-κατενίνης και τέλος αναστολή της τρανσκριπτάσης αυξάνουν τα επίπεδα της AXIN διευκολύνοντας τον σχηματισμό του συμπλέγματος καταστροφής της β-κατενίνης (Suryawanshi, Tadagavadi, Swafford, & Manicassamy, 2016).

Κεφάλαιο 2^ο: Πρωτεΐνες απόκρισης θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs)

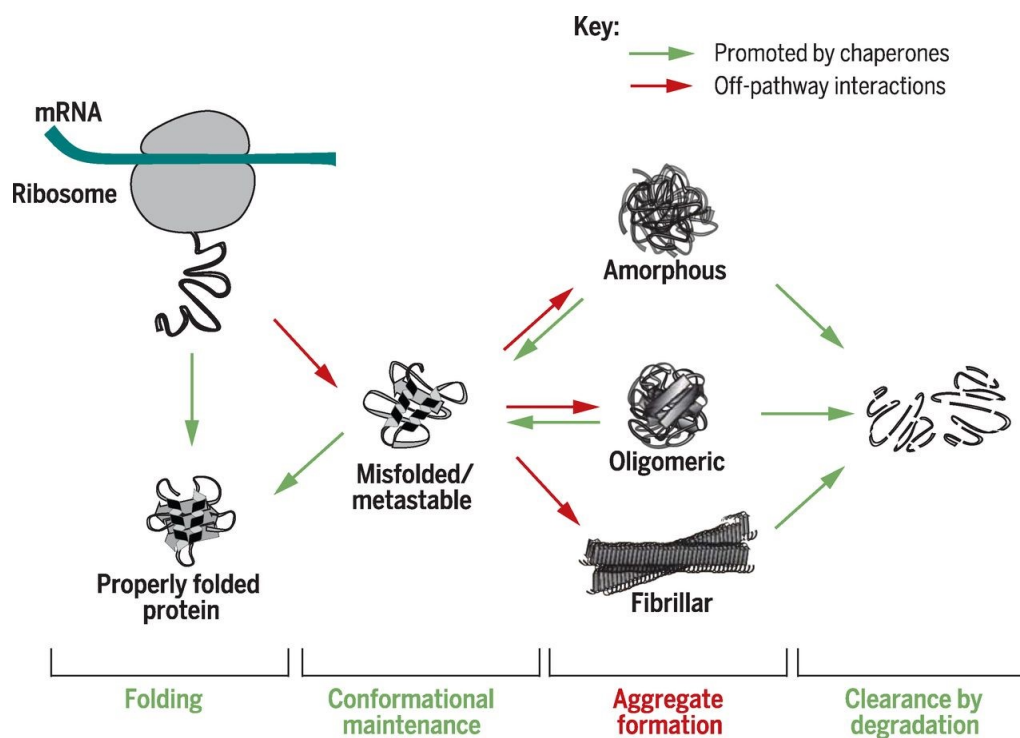
2.1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία με σκοπό τα γραμμικά πολυπεπτιδικά πολυμερή να οργανωθούν σε μια τριτοταγή λειτουργική δομή. Στην αναδίπλωση και στη διατήρηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών συμμετέχουν μη ομοιοπολικοί δεσμοί (υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δημιουργία γεφυρών άλατος, δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις Van der Waals) αλλά και ιοντικοί και δισουλφιδικοί δεσμοί. Η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών οδηγεί στη δημιουργία λειτουργικών μορίων και έχει ως αποτέλεσμα την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων. Έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα σχετικά με την κινητήριο δύναμη που οδηγεί στην πρωτεϊνική αναδίπλωση. Ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα αφορά την διατύπωση του υδροφοβικού φαινομένου ως το βασικό λόγο αναδίπλωσης. Το μοντέλο αυτό προτείνει τη δημιουργία ενός υδροφοβικού πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από υδρόφοβα αμινοξέα. Αμινοξέα με υδρόφοβες πλευρικές ομάδες, αλληλοεπιδρούν και «θάβονται» στο εσωτερικό στην προσπάθεια αποφυγής μιας αλληλεπίδρασης με το νερό. Τα πολικά αμινοξέα είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης (Uversky, 2014).

Οι πιο πρόσφατες απόψεις δίνουν ιδιαίτερη έμφαση στα χαρακτηριστικά των ενεργειακών πεδίων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και τα νέα μοντέλα αναφέρονται ως «γωνιά αναδίπλωσης» (folding funnels) ή «ενεργειακά πεδία» (Energy landscapes). Είναι γνωστό πλέον ότι η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών κατευθύνει και καθορίζει την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης (Clark, 2004). Η απόδειξη της γνώσης αυτή προήλθε το 1950 από τον Αμερικανό Βιοχημικό Κρίστιαν Άνφινσεν. Η φυσιολογική αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια συντονισμένη και αυστηρή διεργασία, η οποία υπόκειται αυστηρό έλεγχο (Fernandez-Reche, Cobos, Luque, Ruiz-Sanz, & Martinez, 2018).

Η πρωτεϊνική ομοιότητα είναι βασική για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων και πλήθος ασθενειών σχετίζονται με τη λανθασμένη πρωτεϊνική

αναδίπλωση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων (Εικόνα 15). Ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson (Lehtonen, Sonninen, Wojciechowski, Goldsteins, & Koistinaho, 2019), η νόσος Alzheimer (Morawe, Hiebel, Kern, & Behl, 2012), η νόσος Huntington (Morawe et al., 2012) και η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (ALS) είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ασθενειών που σχετίζονται με συσσώρευση και συσσωμάτωση πρωτεϊνών εξαιτίας της λανθασμένης αναδίπλωσης (Medinas, Valenzuela, & Hetz, 2017). Στο πλαίσιο της άμυνας του κυττάρου έναντι στρεσογόνων παραγόντων, καταστάσεων υποξίας και ασιτίας, οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί αποτελούν έναν από τους πιο αποτελεσματικούς μηχανισμούς ομοιόστασης (Klajps, Jayaraj, & Hartl, 2018).



Εικόνα 15: Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί είναι βασικοί παράγοντες διατήρησης της πρωτεόστασης. Προωθούν την αναδίπλωση των πρόσφατα συντεθειμένων πρωτεϊνών και αποτρέπουν τη δυνητική συσσωμάτωσή τους. Οι μοριακοί συνοδοί συνεργάζονται επίσης με άλλα συστατικά του δικτύου πρωτεόστασης, όπως το σύστημα πρωτεασώματος και παράγοντες της αυτοφαγίας, στην απομάκρυνση των τελικώς αναδιπλωμένων και συσσωματωμένων πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικής αποδόμησης (Balchin, Hayer-Hartl, & Hartl, 2016).

2.2. Πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί

Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (chaperones) είναι μια οικογένεια συντηρημένων πρωτεϊνών, οι οποίες συναντώνται σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς και σχετίζονται άμεσα με την κυτταρική επιβίωση. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλοεπιδρούν και σταθεροποιούν μία πρωτεΐνη οδηγώντας στην δημιουργία μίας σταθερής στερεοδιαμόρφωσης. Βασικός ρόλος των μοριακών συνοδών είναι η προφύλαξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από την λανθασμένη αναδίπλωση. Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί προστατεύουν από την συσσωμάτωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και επιταχύνουν τα βραδέα στάδια της αναδίπλωσης (Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl, & Hartl, 2013).

2.3. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs)

Η ανακάλυψη των πρωτεϊνών μοριακών συνοδών έγινε για πρώτη φορά σε καταστάσεις θερμικού σοκ και για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν heat shock proteins. Ο Ritossa το 1962 ήταν ο πρώτος που εξέτασε την απόκριση των κυττάρων στην επίδραση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα ανακάλυψε πως οι σιελογόνοι αδένες της *Drosophila busckii* αντιδρούν σε καταστάσεις θερμικού σοκ. Παρατήρησε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε στην εμφάνιση χρωμοσωμικών διογκώσεων των πολυταινικών χρωμοσωμάτων της *Drosophila*. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρησε ότι οι χρωμοσωμικές διογκώσεις που υπήρχαν πριν την επίδραση της θερμοκρασίας ελαττώνονταν σε μέγεθος ή εξαφανίζονταν υπό την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ άλλες εμφανίζονταν. Ήταν γνωστό εκείνη την εποχή ότι οι διογκώσεις αυτές είναι αποτέλεσμα της έντονης μεταγραφικής δραστηριότητας των χρωμοσωμάτων. Επομένως ο Ritossa συμπέρανε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση (Calderwood, 2007). Ο Tissieres δώδεκα χρόνια μετά ανακάλυψε τα προϊόντα των γονιδίων που ενεργοποιήθηκαν από τη θερμοκρασία και τα όρισε ως θερμοεπαγόμενα γονίδια και τις πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα γονίδια αυτά ως θερμοεπαγόμενες.

Παρόλο που η σύνθεση πρωτεϊνών που επάγεται από την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε πρώτα στην *Drosophila*, αρκετές μελέτες λίγα χρόνια

μετά απέδειξαν ότι η απόκριση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μία συντηρημένη διαδικασία από τα βακτήρια έως τους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Nover & Miernyk, 2001).

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής μίας ομάδας γονιδίων (θερμοεπαγόμενων γονιδίων HSP genes) είναι η βασική απόκριση των κυττάρων στην αύξηση της θερμοκρασίας. Τα γονίδια αυτά πριν την αύξηση της θερμοκρασίας ήταν ανενεργά ή είχαν πολύ μικρή ενεργότητα. Τα νεοσυντιθέμενα mRNAs μεταφράζονται στην συνέχεια σε θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες. Με την επαναφορά της θερμοκρασίας σε φυσιολογικά επίπεδα αναστέλλεται η μεταγραφή των θερμοεπαγόμενων γονιδίων. Η θερμοκρασία κατά την οποία παρατηρείται η μέγιστη επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών εξαρτάται από την φυσιολογική θερμοκρασία του κάθε οργανισμού (A. Kumar et al., 2020).


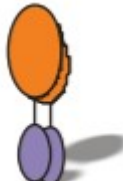
Επιπλέον έχει βρεθεί πως η επαγωγή της σύνθεσης των HSP δεν παρατηρείται μόνο κατά την αύξηση της θερμοκρασίας αλλά πραγματοποιείται και όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), τα βαρέα μέταλλα, η υποξία και η ανοξία καθώς και παθολογικές καταστάσεις όπως οι μολύνσεις και ο τραυματισμός ιστών. Υπάρχουν και μέλη της οικογένειας των HSP, τα οποία εκφράζονται ιδιοστατικά στα κύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως για παράδειγμα η κυτταρική διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος. Τα μέλη αυτά ονομάζονται συγγενείς θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat Shock Cognates, HSCs) (Brochu, Haimeur, & Ouellette, 2004).





Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες είναι περίπου το 5-10% των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου, ανάλογα με τη στρεσογόνο κατάσταση που αυτό βρίσκεται. Έχουν εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση το μοριακό βάρος τους και οι κυριότερες κατηγορίες είναι οι HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 και οι sHSPs (μικρές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες) (Macario, Lange, Ahring, & Macario, 2000). Όλες οι οικογένειες έχουν κοινή δομή και παρατηρούνται κοινές λειτουργικές επικράτειες (Domains). Έτσι παρατηρείται μία επικράτεια πρόσδεσης της αδενίνης όπου προσδένεται και υδρολύεται το ATP και μία επικράτεια πρόσδεσης πεπτιδίου στην οποία προσδένονται μη πολικά αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η πρόσδεση ATP

είναι αυτή που οδηγεί στην αλλαγή της στερεοδιάταξης των HSP και μπορεί να απελευθερωθεί προσδεσμένη πρωτεΐνη.

Εκτός από την λειτουργία τους ως μοριακοί συνοδοί στην αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών πλέον έχει καταγραφεί και μια σειρά από άλλες διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν, όπως η μεταφορά πρωτεϊνών σε οργανίδια, η επιδιόρθωση του DNA (Kotoglou et al., 2009), η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και η εμπλοκή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ponomarenko, Stepanenko, & Kolchanov, 2013).

Πίνακας 2: Δομή, λειτουργία και υποκυτταρική εντόπιση των κυριότερων οικογενειών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs) (Zorzi & Bonvini, 2011).

| Οικογένεια | Οργανισμός | Μοριακοί Συνοδοί | Υποκυτταρική εντόπιση | Δομή | Λειτουργία |
|------------|---|--|----------------------------------|---|---|
| Hsp100 | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> | ClpA, B, C Hsp104 | Κυτταρόπλασμα |  εξαμερές ή επταμερές | Ανοχή στο στρες, επαναφορά από αδιάλυτα συσσωματώματα των απενεργοποιημένων από τη θερμότητα πρωτεϊνών |
| Hsp90 | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i> | HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1 | Κυτταρόπλασμα ΕΔ, μιτοχόνδρια |  Διμερές | Κυτταρική σηματοδότηση (αλληλεπίδραση με υποδοχείς στεροειδών ορμονών, κινάσες σερίνης/θρεονίνης), ρύθμιση της απάντησης στο θερμοεπαγόμενο στρες, ρόλος στον κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιασμό, διατήρηση μιτοχονδριακής ακεραιότητας |

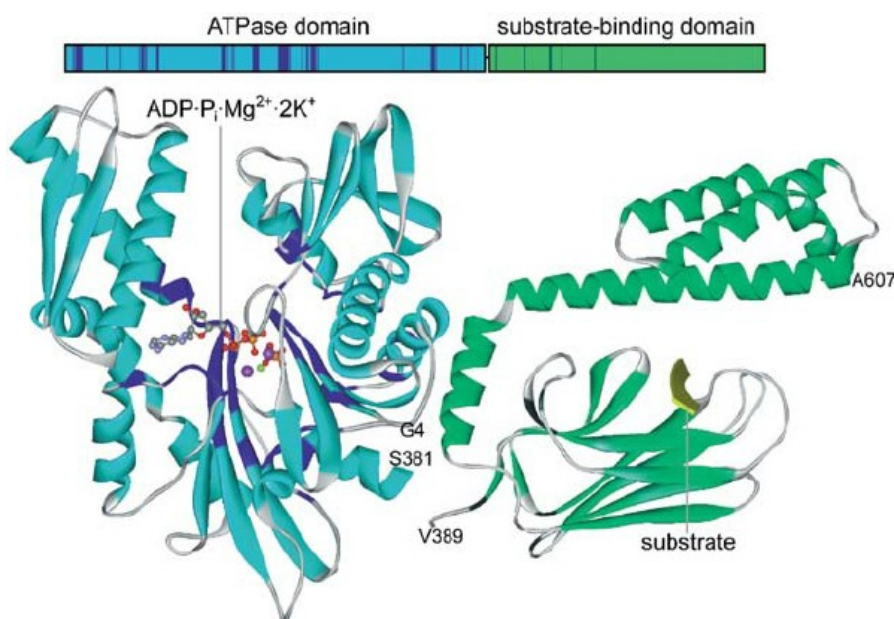
| | | | | | |
|------------|---|---|---|---|---|
| Hsc/Hsp70 | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i> | DnaK Ssa1-4 Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hs70, Hsp70, BIP, mHsp70 | |  Μονομερές | De novo αναδίπλωση πρωτεϊνών Αποφυγή συσσωμάτωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών Απόκριση στο στρες |
| Hsp60 | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i> Φυτά | GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60 | Κυτταρόπλασμα Μιτοχόνδρια Χλωροπλάστες Μιτοχόνδρια |  Δεκατετραμερές | De novo αναδίπλωση πρωτεϊνών Αποφυγή συσσωμάτωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών De novo αναδίπλωση ακτίνης και τουμπουλίνης |
| Hsp40 | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i> | dnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2 | Κυτταρόπλασμα Κυτταρόπλασμα πυρήνας |  Μονομερές | Ομοσυνοδός του HSP70 με ενεργότητα ΑΤΡάσης |
| Small Hsps | <i>E. coli</i> <i>H. sapiens</i> | IrbA, IrbB Hsp27 κρυσταλλίνη | Κυτταρόπλασμα |  Οκτα- έως 24μερές | Αποφυγή συσσωμάτωσης των μετουσιωμένων από θερμότητα πρωτεϊνών |

2.4. Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa (HSP70)

Η οικογένεια HSP70 αποτελεί την πιο καλά μελετημένη οικογένεια θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από μέλη, τα οποία εκφράζονται μόνο σε περιπτώσεις στρες και άλλα μέλη, τα οποία εκφράζονται και σε φυσιολογικές συνθήκες. Είναι συντηρημένες πρωτεΐνες και έχουν ταυτοποιηθεί σε όλους τους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, η αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης

HSP70 είναι κατά 73% ομόλογη με την αντίστοιχη της *Drosophila melanogaster*. Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό δομικής ομοιότητας. Τα μέλη που έχουν ταυτοποιηθεί είναι η HSP70, HSC70, GRP78 και η MTP70. Η HSP70 εκφράζεται αποκλειστικά σε καταστάσεις στρες του κυττάρου, η HSC70 εκφράζεται ιδιοστατικά. Οι HSP70 και οι HSC70 εκφράζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η GRP78 σε φυσιολογικά επίπεδα ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης και εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η MTP70 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Radons, 2016).

Σε όλα τα μέλη της οικογένειας έχει βρεθεί μια καλά συντηρημένη αμινοτελική περιοχή μεγέθους 44 kDa (450 αμινοξέα περίπου) με ασθενή δράση ATPάσης (ATP Binding Domain-ABD). Επίσης, καλά συντηρημένη είναι και η καρβοξυτελική περιοχή με μοριακό βάρος 28 kDa, όπου γίνεται η πρόσδεση του πεπτιδίου (Substrate/Peptide Binding Domain- SBD/PBD) (Εικόνα 16) (Mayer, 2005).



Εικόνα 16: Η δομή της HSP70. Η θερμοεπαγόμενη HSP70 διαθέτει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή 450 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο όπου προσδέεται και υδρολύεται το ATP και μια συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή πρόσδεσης με τα υδρόφοβα αμινοξέα των υποστρωμάτων (Mayer, 2005).

Είναι γνωστό ότι οι HSP70s διαθέτουν μια σειρά από ομοσυνοδούς (co-chaperones) όπως οι DnaJ, όπως η HSP40, όπου διαθέτουν την περιοχή J, υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τις HSPs και σταθεροποιούν το σύμπλοκο υποστρώματος-Hsp70-ADP (Kampinga & Craig, 2010).

Αρχικά, γίνεται αντιστρεπτή πρόσδεση του συμπλόκου HSP70-ATP. Όταν ξεκινά η υδρόλυση του ATP, επάγονται αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης, αυξάνοντας τη συγγένεια πρόσδεσης HSP70 με το υπόστρωμα. Στη συνέχεια κάποιιοι πρωτεϊνικοί συνοδοί όπως οι Hip και Hop φωσφορυλιώνουν το ADP σε ATP και απελευθερώνεται το υπόστρωμα, το οποίο οδηγείται σε σωστή αναδίπλωση. Κατά την έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες, οι HSP70 μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Zhuo Li, Hartl, & Bracher, 2013).

Η HSP70 αναγνωρίζει μεγάλα τμήματα υδροφοβικών αμινοξέων, τα οποία βρίσκονται είτε στα ριβοσώματα είτε σε μεσολαβούμενες από το στρες αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες. Για την εξειδίκευση στην αναγνώριση υποστρωμάτων σημαντικό ρόλο παίζουν η περιοχή SBD και η αμινοξική ακολουθία. Η πρόωρη αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αποφεύγεται μέσω της δράσης των μοριακών συνοδών, οι οποίοι αλληλεπιδρούν μέσω ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών. Δρα σε πολλές διαφορετικές διαδικασίες και συνήθως δρα σε συνεργασία με ομοσυνοδές πρωτεΐνες προς σχηματισμό λειτουργικών μοριακών συμπλόκων. Οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Exchange Factors-NEF) ρυθμίζουν τη διαμόρφωση της PBD/SBD. Η διαθεσιμότητα αυτής της μορφής είναι η κατεξοχήν υπεύθυνη για τη δυνατότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων των HSP70. Η πρόσδεση του υποστρώματος και η δράση των HSP70 ως ATPάση καθορίζεται από τις πρωτεΐνες J. Στο καρβοξυτελικό άκρο της HSP70 υπάρχει μια ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες με αλληλουχίες TPR. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ομάδα ομοσυνοδών που προσδέουν και ρυθμίζουν την πρόσδεση σε υποστρώματα και αλληλεπιδρούν με πολλές άλλες πρωτεΐνες επάγοντας τη μεταφορά και αναδίπλωση των υποστρωμάτων (HOP) είτε επάγουν στην αποδόμησή τους (CHIP) (Albakova et al., 2021).

2.4.1. Ρόλος των HSP70

Από τις βασικότερες λειτουργίες της HSP70 είναι η προστασία των κυττάρων από το θερμικό σοκ. Η προστασία αυτή επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των HSP70 σε μετουσιωμένες πρωτεΐνες και την αποφυγή της δημιουργίας συσσωματωμάτων. Επίσης, αυξημένα επίπεδα έκφρασης της HSP70 έχουν παρατηρηθεί σε κακοήθεις όγκους που χαρακτηρίζονται από επιθετικότητα. Φαίνεται ότι εμπλέκονται στη μεταγραφή ογκογονιδίων και ότι δημιουργούν σύμπλοκα με τα ογκογονίδια E1A των αδενοϊών, με το μεγάλο αντιγόνο T του SV40 και με το c-myc. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των κασπασών είτε μέσω της ενεργοποίησης του κυτοχρώματος c είτε αναστέλλοντας μεταβολικά μονοπάτια κάτω από τις κασπάσες (Sherman & Gabai, 2015).

Η αλληλεπίδραση της HSP70 με πλήθος πρωτεϊνών στόχων έχει ως αποτέλεσμα την εμπλοκή της σε πλήθος σηματοδοτικών κυτταρικών μονοπατιών όπως η επιδιόρθωση βλαβών του DNA, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η γήρανση (senescence). Έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με μεταλλάξεις της p53, της CFTR και της υπεροξειδάσης της δισμουτάσης λειτουργώντας ως μοριακός συνοδός και διατηρώντας τις πρωτεΐνες σε λειτουργική δομή ή οδηγώντας αυτές για αποικοδόμηση. Σε αρκετές μελέτες έχει υπερεκφραστεί η HSP70 και φαίνεται ότι μπορεί να κάνει απαλοιφή των συμπτωμάτων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών όμως μπορεί να δημιουργηθεί και ανοχή στην απόπτωση (Colvin et al., 2014; Njemini et al., 2011; Van Molle et al., 2002).

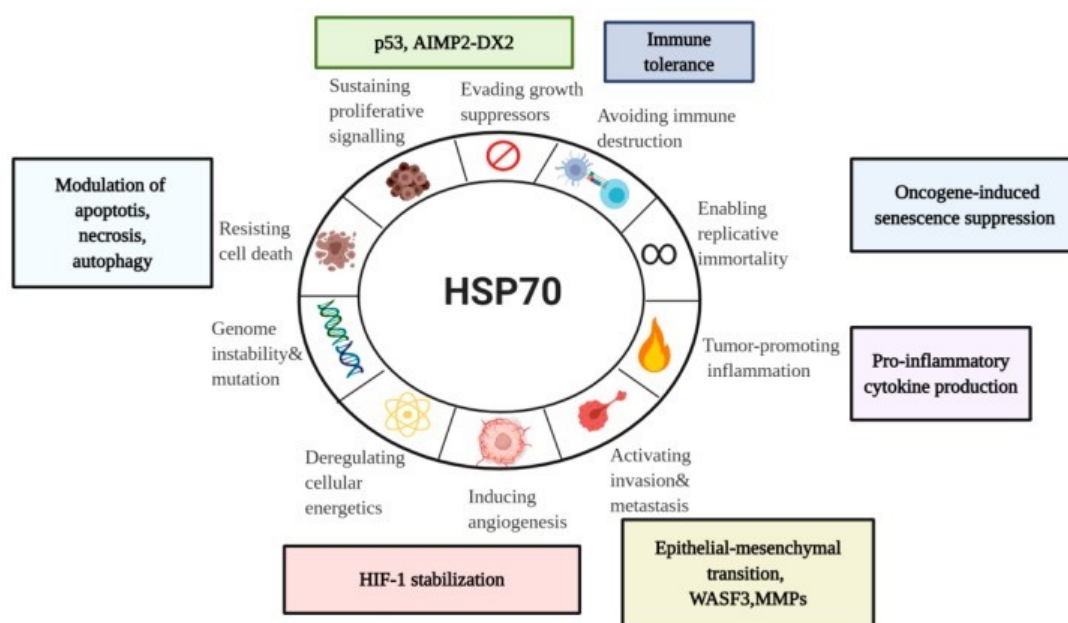
Κεφάλαιο 3^ο: Ο ρόλος της HSP70 στον καρκίνο

Μελέτες σχετικά με το ρόλο της HSP70 στην καρκινογένεση έχουν δείξει ότι η έκφραση της HSP70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Η έκφρασή της σε κακοήθεις όγκους υποδεικνύει μια κακή πρόγνωση για την εξέλιξη της νόσου. Η HSP70 διαθέτει μια σειρά από υποδοχείς στους οποίους συνδέονται διάφορα μόρια. Για παράδειγμα προσδένεται με το CD14, με υποδοχείς τύπου Toll (TLR2 και TLR4), με υποδοχείς της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης 1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1, LOX-1), με το CD91 και το CD40. Επίσης, προσδένεται σε υποδοχείς φυσικών φονέων (Natural Killer, NK) όπως το CD94/NKG2C και το NKG2D. Η πρόσδεση της HSP70 επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των υποδοχέων NKp30, NKp44, NKp46 και NKp80. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι το σύμπλοκο HSP70-HSP90 ονομάζεται “epicharome” και βρέθηκε να εκφράζεται σε μία μεγάλη ποικιλία όγκων που έχουν μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα. Αυτό το σύμπλοκο προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα σε αναστολείς HSP90 (Albakova, Armeev, Kanevskiy, Kovalenko, & Sapozhnikov, 2020).

3.1. Ο ρόλος της HSP70 στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι καρκινικών κυττάρων

Πλέον, γνωρίζουμε ότι τα καρκινικά κύτταρα εξελίσσονται και διαμορφώνουν (Albakova et al., 2020) μια σειρά αλληλεπιδράσεων με το ανοσοποιητικό σύστημα. Φαίνεται ότι η HSP70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή χωρίς όμως να γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό που σχετίζεται με αυτή την αλληλεπίδραση. Πιστεύεται ότι η σχέση μεταξύ HSP70 και ανοσολογικής απόκρισης σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα της HSP70 να προσδένει αντιγονικά πεπτιδία που προέρχονται από τους όγκους. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι το σύμπλοκο HSP70-πεπτιδίου οδήγησε σε κυτταρική απόκριση μεσολαβούμενη από τα CD8⁺ T κυτταροτοξικά κύτταρα. Σε άλλες μελέτες, έχει φανεί ότι η HSP70 εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων

απελευθερώνοντας εξωσώματα, τα οποία διεγείρουν και ενεργοποιούν τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) (Albakova et al., 2020). Ο Multhoff και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η προ-επώαση και η επαγωγή των καρκινικών κυττάρων με την HSP70 ή με το 14μερές πεπτιδίό της (TKD) έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της επιφανειακής HSP70 των καρκινικών κυττάρων με τα NK κύτταρα. Η αναγνώριση αυτή γίνεται παρουσία των ιντερλευκινών 2 και 15 (IL-2, IL-15). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε, το 2015 σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 κατά τις οποίες μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των αυτόλογων NK, τα οποία είχαν προεπωαστεί και ενεργοποιηθεί με το TKD και IL-2, σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-small cell lung cancer, NSCLC) μετά από ακτινοθεραπεία. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της κλινικής αυτής μελέτης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχουν δύο τύποι HSP70 που κυκλοφορούν στον ορό των ασθενών με καρκίνο. Ένας από τους τύπους είναι η εξωσωμική HSP70, που απελευθερώνεται από ζωντανά καρκινικά κύτταρα, ενώ ο άλλος τύπος είναι η HSP70 που απελευθερώνεται από καρκινικά κύτταρα που πεθαίνουν και χρησιμεύουν ως μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες (DAMPs)(Multhoff et al., 1995).



Εικόνα 17: Η HSP70 ως σημείο ελέγχου της καρκινογένεσης. Η HSP70 εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες που σχετίζονται με την πορεία και την ανάπτυξη των όγκων. Έχει σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή αντοχή, στην κυτταρική γήρανση, στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση, αυτοφαγία, νέκρωση), στη σταθεροποίηση του παράγοντα υποξίας HIF1α και στην επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (Albakova et al., 2020).

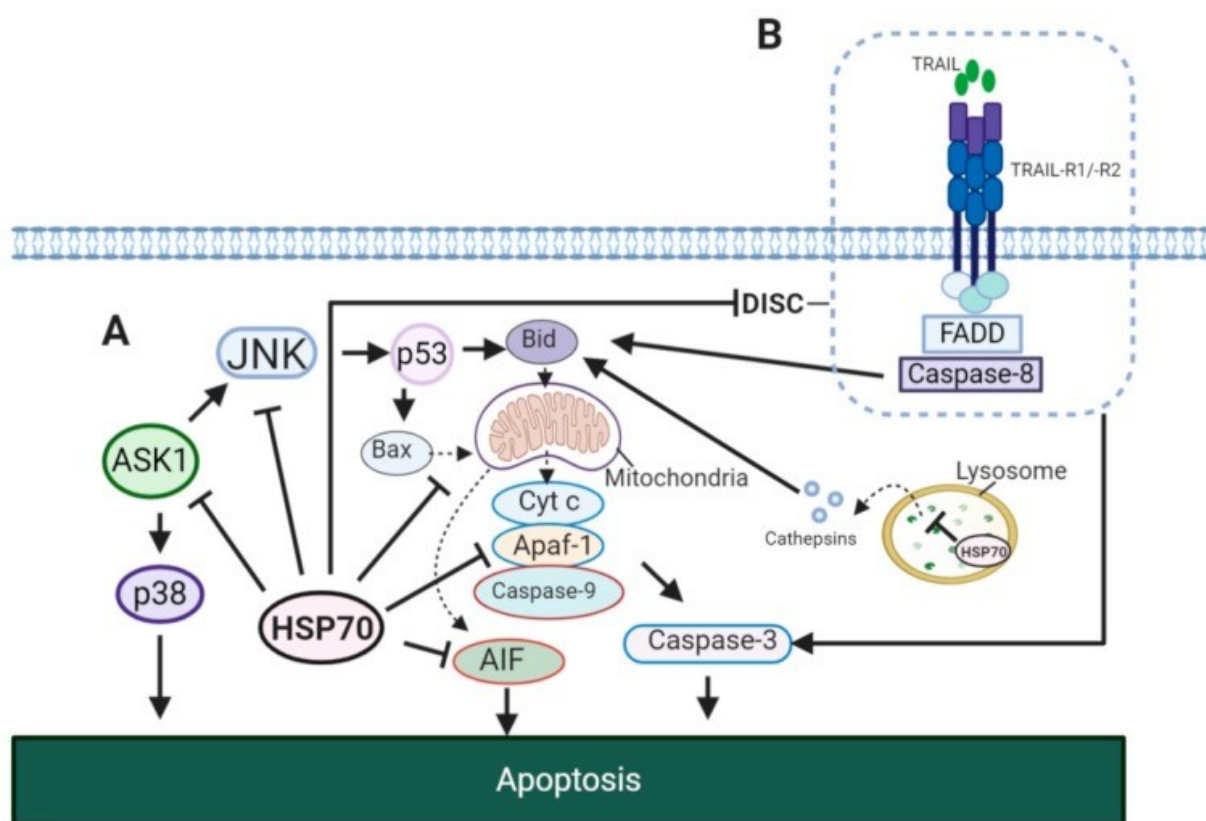
Σε άλλες μελέτες αποδείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση εξωκυττάριας HSP70 (eHSP70) με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) οδήγησε στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος διηγεί τις κυτταροκίνες της φλεγμονής TNF-α, IL-1β, IL-6 και IL-12. Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι στον ορό ασθενών με καρκίνο βρέθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της IL-10 και της IFN-γ οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση της HSP70 και εν συνεχεία η ενεργοποίηση των κυτταροκινών αυτών εμπλέκονται στην αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Όμως η μακροχρόνια ενεργοποίηση αυτών των κυτταροκινών και η επακόλουθη επίδραση που έχουν στην επαγωγή της υπερέκφρασης της HSP70 μπορεί να οδηγήσει σε ανοσολογική ανοχή (Weng, Calderwood, & Gong, 2011).

Για τη δράση αυτή της HSP70 στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων έχει δημιουργηθεί η ιδέα για τη δημιουργία των εμβολίων. Συγκεκριμένα, η βάση της ιδέας αυτής βρίσκεται στην ικανότητα των συμπλόκων HSP-πεπτιδίων να διεγείρουν τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL). Για το σκοπό αυτό έχουν απομονωθεί σύμπλοκα πεπτιδίων-HSP70 από όγκους και έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανοσοποίηση ξενιστών οδηγώντας στην ενεργοποίηση του συμπλόκου MHC1 και την ενεργοποίηση T κυτταροτοξικών κυττάρων και τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά (Lebrecht, Hefler, Tempfer, & Koelbl, 2001).

3.2. Ο ρόλος της HSP70 στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στον κυτταρικό θάνατο

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επιβιώνουν υπό συνθήκες υποξίας ή περιορισμένων θρεπτικών συστατικών. Η HSP70 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα και η έκφρασή της έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε καταστολή των αποπτωτικών μηχανισμών και στην αντίσταση των κυττάρων σε αυτούς τους μηχανισμούς. Αντίθετα, η μειωμένη έκφραση της HSP70 οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο. Η HSP70 επιδρά τόσο στο ενδογενές όσο και στο εξωγενές σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης, Συγκεκριμένα στη μεσολαβούμενη από τον TNF-α διαδικασία της απόπτωσης φαίνεται ότι το σύμπλοκο HSP70-CHIP επάγει την αποικοδόμηση της κινάσης ASK1 με αποτέλεσμα την αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK, c-Jun N-τερματικής κινάσης (JNK) και p38

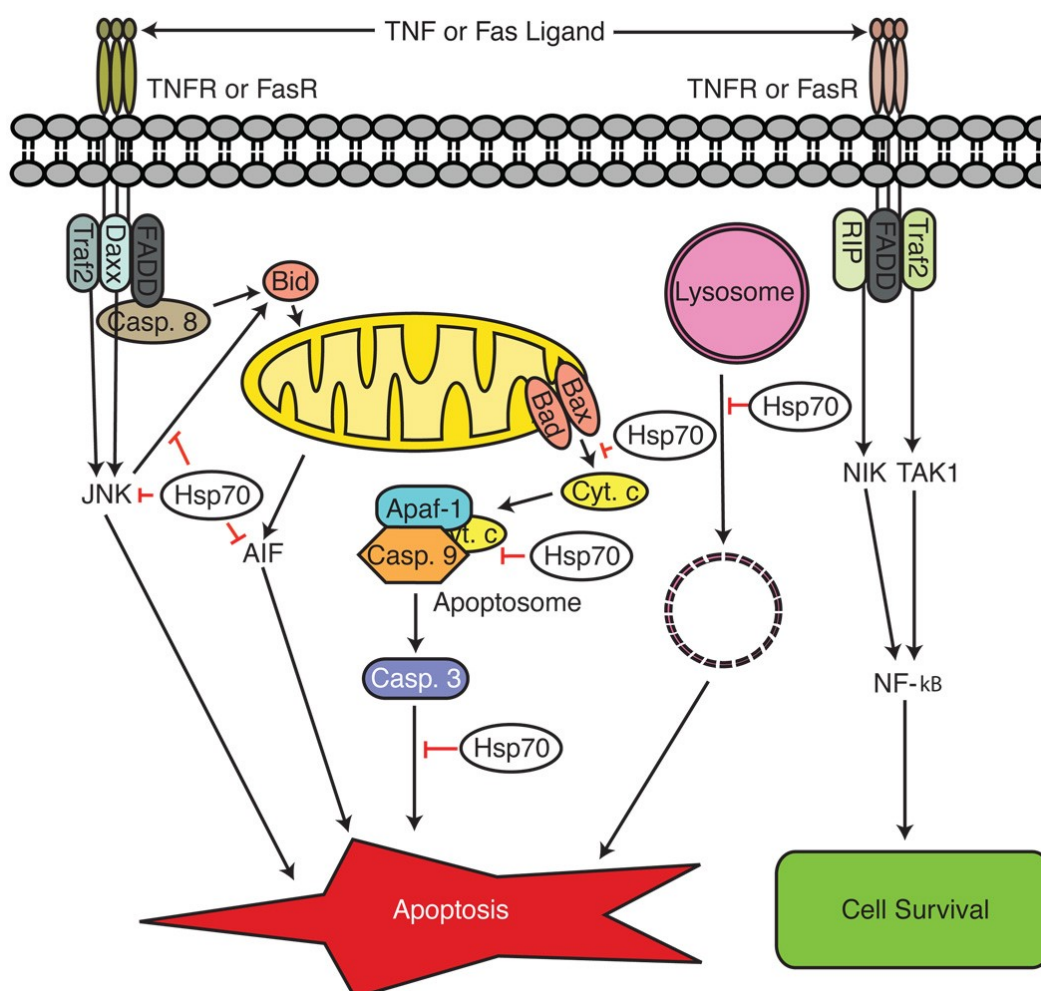
(Tournier et al., 2000). Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω της JNK φαίνεται ότι οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, επάγοντας το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μεσολαβείται από την ενεργοποίηση της p53, η οποία εν συνεχεία ενεργοποιεί την Bax και την Bid. Η HSP70 λειτουργεί αναστέλλοντας τη δράση της Bax στα μιτοχόνδρια, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει και τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης AIF (Εικόνα 18). Η δράση όμως της HSP70 εντοπίζεται και στην ρύθμιση του εξωγενούς σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης, αφού αναστέλλει το σύμπλοκο DISC μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς TRAILR1 και TRAILR2 (Staniek et al., 2019).



Εικόνα 28: HSP70 και ο ρόλος στην απόπτωση. Η HSP70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και ελέγχει όλους τους παράγοντες του ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού. Συγκεκριμένα αναστέλλει τον APAF-1 και την έξοδο του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Επίσης, αναστέλλει τον παράγοντα DISC του εξωγενούς μονοπατιού. Τέλος, αναστέλλει τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK JNK και p38 (Albakova et al., 2020).

Το σύμπλοκο HSP70-HSP90 σταθεροποιεί τον παράγοντα HIF-1a, που επάγεται υπό συνθήκες υποξίας και είναι υπεύθυνος για την έναρξη της

αγγειογένεσης καθώς και της διήθησης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η αγγειογένεση ενεργοποιείται εξαιτίας της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK-ERK. Τέλος η HSP70 ενισχύει την έκφραση της IL-5 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της ενδοθηλιακής συνθάσης οξειδίου του αζώτου (eNOS) (Park et al., 2017).



Εικόνα 19: Οι ρόλοι της HSP70 σε αντιαποπτωτικά μονοπάτια. Η HSP70 πιστεύεται ότι επάγει την κυτταρική επιβίωση και μπλοκάρει τους μηχανισμούς της απόπτωσης. Για κάποια υποστρώματα η HSP70 φαίνεται να δρα ως σταθεροποιητής ενώ για άλλα φαίνεται να μεσολαβεί σε μηχανισμούς αποικοδόμησής τους.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η καταστολή της έκφρασης της HSP70 (HSP70 knockdown) έχει ως αποτέλεσμα της επαγωγή της καθεψίνης B και την απελευθέρωσή της με αποτέλεσμα την προστασία των λυσοσωμάτων από την

οξειδωτική αποσταθεροποίησή τους. Η ισομορφή HSP72 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην κυτταρική γήρανση (senescence) επιδρώντας μέσω του μονοπατιού p53-p21.

Σε διμερές οι HSP70/HSP72 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πλήθος παραγόντων και να επιδράσουν σε διαδικασίες γήρανσης και απόπτωσης. Οι επιδράσεις αυτές έχουν οδηγήσει στη διατύπωση της πρότασης περί «εθισμού» των καρκινικών κυττάρων στην HSP70 και τις ομοσυνόδους της. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 ο ρόλος της HSP70 είναι διαφορετικός ανάλογα τον παράγοντα με τον οποίο αλληλοεπιδρά.

Πίνακας 3: Οι ρόλοι της HSP70 στο μονοπάτι της απόπτωσης και η επίδρασή της στους παράγοντες του μονοπατιού.

| Διαδικασία | Ρόλος HSP70 |
|--|---|
| Αποπτωτικό μονοπάτι εξαρτώμενο από τις κασπάσες (Caspase-dependent pathway) | |
| Bid | Η HSP72 αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα TNF που μεσολαβείται από την Bid |
| Caspase-9 | Η HSP70 αναστέλλει την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 στο αποπτώσωμα. |
| Bcl2 | Αναστολή της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης της BCL2 και αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. |
| Caspase-3 | Αναστολή της επαγόμενης από την κασπάση-3 απόπτωσης |
| Αποπτωτικό μονοπάτι ανεξάρτητο από τις κασπάσες (Caspase-independent pathway) | |
| JNK | Η HSP72 αναστέλλει την επαγόμενη από την JNK απόπτωση. |
| AIF | Αναστολή της απελευθέρωσης της AIF από τα μιτοχόνδρια |
| Λυσοσώματα | Σταθεροποίηση της ακεραιότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης |
| p53 | Αναστολή της επαγόμενης από την p53 κυτταρικής γήρανσης μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K. |

Κεφάλαιο 4^ο: Ο ρόλος της HSP70 στη μετάσταση

Η σημασία της έκφρασης της HSP70 στην έναρξη και την ανάπτυξη των όγκων είναι καλά μελετημένη και πλήθος ερευνών έχουν συσχετίσει την υπερέκφραση της HSP70 με αρκετούς τύπους καρκίνου. Μια από τις σημαντικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, η οποία αποτελεί μεγάλο στοίχημα των ερευνητών για τον έλεγχο και τη θεραπεία των όγκων, αποτελεί η ιδιότητα της μεταστατικότητας των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό πολλές μελέτες πλέον επικεντρώνονται στο ρόλο της HSP70 στη μετάσταση.

Συγκεκριμένα σε μοντέλα καρκίνου του μαστού με μεταστάσεις στους λεμφαδένες παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση της HSP70. Ενώ σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η απενεργοποίηση της HSP70 οδήγησε σε μειωμένη ικανότητα διήθησης και μετάστασης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, καρκίνου της ουροδόχου κύστης και καρκίνου του τραχήλου κεφαλής. Επίσης, η υπερέκφραση της HSP70 φαίνεται ότι αυξάνει την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων ενάντια της άνευ οίκου (anoikis) απόπτωσης, η οποία πραγματοποιείται όταν τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την ιδιότητα να βρίσκονται προσκολλημένα στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM). Η ιδιότητα αυτή της HSP70 φαίνεται ότι μεσολαβείται από την κινάση προσκόλλησης FAK και την Akt.

Για τη μελέτη του ρόλου της HSP70 μελετάται η επίδραση της HSP70 σε παράγοντες που εκφράζονται κατά την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σύμπλοκα πεπτιδίων HSP70 (HSP70-PC), τα οποία απομονώθηκαν από δείγματα ηπατοκαρκινώματος, είχαν την ικανότητα να επάγουν την EMT στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του ήπατος, Huh-7. Η επαγωγή της EMT γίνεται μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK/p38. Επιπλέον, η αποσιώπηση της HSP70 οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και η μειορρύθμιση της HSP70 οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου E-καντερίνη/β-κατενίνη οδηγώντας στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Όπως έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες, σημαντικό ρόλο στη μετάσταση των κυττάρων εκτός από την HSP70 διαδραματίζουν τα πεπτίδια της HSP70 που όπως αναφέρθηκε ανωτέρω επάγουν την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση αλλά

και οι ομοσυνοδοί της HSP70 που φαίνεται ότι εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη ενός μεσεγγυματικού φαινοτύπου. Η πρωτεΐνη HOP, είναι ομοσυνοδός της HSP70 και έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ωοθηκών και γλοιοβλαστώματος. Η απενεργοποίησή της αναστέλλει τη δημιουργία ψευδοποδίων και τη μεταστατικότητα κυττάρων καρκίνου του μαστού και παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων.

Η αυξημένη έκφραση της HSP70 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορους τύπους μεταστατικών κυττάρων και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης του υπολογισμού της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση της HSP70 με τις ομοσυνοδούς BAG3 ή τη HOP επάγει την ογκογένεση.

Η υπερέκφραση της HSP70 έχει συσχετιστεί με πιο επιθετικούς τύπους μεταστατικών καρκίνων ενώ ο ρόλος της HSP70 έχει ταυτοποιηθεί στην κυτταρική προσκόλληση. Η καταστολή της σηματοδότησης του TGF- β μέσω της φωσφορυλίωσης του SMAD2 από την HSP70 επάγει την EMT και αυξάνει το μεταστατικό χαρακτήρα των καρκινικών κυττάρων. Επίσης η αποσιώπηση της ομοσυνοδού HOP μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της GTPάσης Rho οδηγώντας έτσι στην αναστολή της δημιουργίας ψευδοποδίων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στην κινητικότητα των κυττάρων φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο η ενεργότητα του διμερούς Hsp70/Hsc70, αφού όταν αναστάλη η ενεργότητα ATPάσης της HSP70 σε κύτταρα διεγερμένα με τον αυξητικό παράγοντα EGF, μειώθηκε και η κινητικότητα αυτών των κυττάρων. Η έκφραση των MMP διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα διήθησης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Η αποσιώπηση του HOP μειώνει την έκφραση της MMP-2 και άλλων εμπλεκόμενων παραγόντων με την μετάσταση.

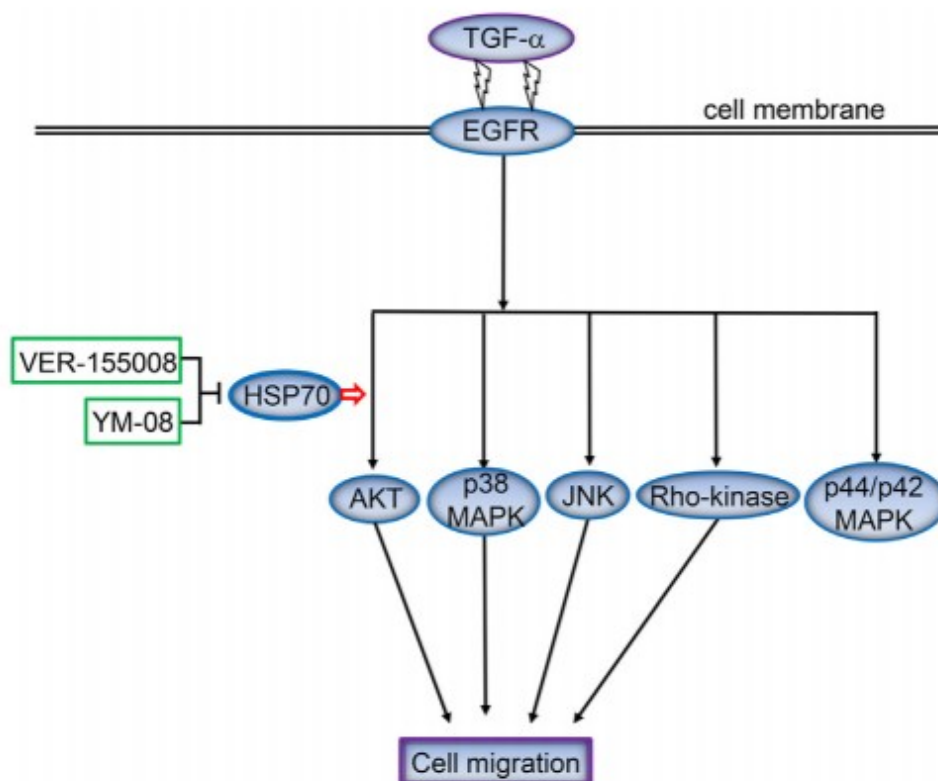
Η αυξημένη έκφραση της HSP70 έχει ταυτοποιηθεί στο εξωκυττάριο περιβάλλον σε δείγματα αίματος σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η ικανότητα της HSP70 να μεταφέρεται, έχει μελετηθεί σε τεχνητά πρωτεολιποσωμάτια και έχει φανεί ότι προσδέεται με τη φωσφατιδυλοχολίνη και δημιουργεί πόρους στο σωματίο, οδηγώντας στην μεταφορά της στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω κυστιδίων. Επίσης, είναι γνωστός ο ρόλος της HSP70 και η έκφρασή της σε λιπιδικές σχεδίες (Lipid rafts) των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των κυττάρων.

Η εξωκυττάρια μεταφορά της HSP70 έχει ταυτοποιηθεί *in vitro* και *in vivo* σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων. Η εξωκυττάρια αυτή μεταφορά διευκολύνθηκε από τη λήψη φαρμάκων ή θερμικού σοκ. Επίσης, σημαντικό ρόλο έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει και στη λειτουργία των λυσοσωμάτων, αφού κλάσμα της Hsp70 βρέθηκε ότι συσσωρεύεται σε λυσοσώματα πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι το HSP70 συνδέεται στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων στην εσωτερική πλευρά του αυλού με τη BMP (Bone morphogenetic proteins).

Η αποσιώπηση της HSP70 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (A549) και αδenoκαρκινώματος του μαστού (MCF7) έδειξε ότι οδηγεί σε απώλεια του επιθηλιακού χαρακτήρα των κυττάρων, στην αλλαγή της μορφολογίας τους (πιο επιμήκη κύτταρα) και σε απώλεια δεσμών με τα γειτονικά τους κύτταρα. Όλα αυτά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά παρατηρούνται στην EMT. Επίσης η αποσιώπηση της HSP70 οδήγησε στην αποσταθεροποίηση της E-καντερίνης ενώ όσον αφορά τη β-κατενίνη, στα καρκινικά κύτταρα A549 ήταν συγκεντρωμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά μετά την αποσιώπηση της HSP70 παρατηρήθηκε διάσπαρτη κατανομή της στο κύτταρο. Επίσης, στην ίδια μελέτη σημειώνεται ότι η απώλεια της HSP70 αποσυναρμολογεί τα σύμπλοκα των καντερινών με την p120, τις α- και β-κατενίνες και την αλληλεπίδρασή τους με νημάτια ακτίνης. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα που δεν εξέφραζαν την HSP70 παρουσίασαν επιταχυνόμενη ικανότητα μετανάστευσης. Μια πιθανή εξήγηση που δόθηκε για την ιδιότητα αυτή ήταν η απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων με τα γειτονικά κύτταρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η Hsp70 πιθανόν συμβάλλει στο σχηματισμό συμπλόκων που εξυπηρετούν την κυτταρική πρόσφυση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που αποδεικνύουν ότι η αποσιώπηση της HSP70 επάγει συγκεκριμένους μηχανισμούς μέσω διαφορετικών ερεθισμάτων και μπορεί να διαδραματίσει προστατευτικό ρόλο έναντι της επαγόμενης από TGFβ2 EMT και στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kasioumi et al., 2018).

Με τον ίδιο τρόπο φαίνεται ότι δρα η HSP70 και σε καρκινική κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος Huh7. Η αναστολή της HSP70 από τους αναστολείς VER155008 και YM-08 αλλά και η αποσιώπηση της HSP70 σε κύτταρα διαμολυνθέντα με siRNA βρέθηκε ότι μπλοκάρει τη μετανάστευση που μεσολαβείται

από τον παράγοντα TGF- α . Επίσης, οι αναστολείς της HSP70 μείωσαν τη φωσφορυλίωση της AKT, η οποία ήταν αυξημένη από τον παράγοντα TGF- α ενώ η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK (p38, ERK, JNK) που επάγουν τη μεταστατική ιδιότητα του ηπατοκαρκινώματος, δεν επηρεάστηκε από αυτούς. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt από την HSP70 οδήγησε στην επαγωγή της EMT στην κυτταρική σειρά Huh7. Η δράση αυτή οφείλεται στη ρύθμιση των στόχων της Akt, αφού η επαγωγή της έκφρασης των SLUG και SNAIL και η μειωμένη έκφραση E- καντερίνης εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της EMT στο ηπατοκαρκίνωμα.



Εικόνα 20: Μηχανισμός δράσης των αναστολέων της HSP70 στην μετάσταση. Φαίνεται ότι οι αναστολείς της ασκούν ενεργητική δράση έναντι της μεταστατικής ιδιότητας της καρκινικής κυτταρικής σειράς ηπατοκαρκινώματος Huh7. Η EMT ελέγχεται από τους παράγοντες TGF- α και EGFR μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt, p38-MAPK, JNK. p42/p44-MAPK (ERK) (Kobayashi et al., 2020).

Επιπλέον, έχει σημειωθεί και σταθερά υψηλή έκφραση της β -κατενίνης εξαιτίας της ενεργοποίησης του PI3K/Akt μέσω του παράγοντα TNF α που σχετίζεται άμεσα με την EMT (Kobayashi et al., 2020).

Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο του μαστού (85%) εξέφρασαν την HSP70-2 ανεξάρτητα από το στάδιο και την υποκατηγορία καρκίνου που εμφάνισαν. Επιπλέον, η έκφραση της HSP70 είναι υψηλή σε ασθενείς, οι οποίοι είχαν εμφανίσει μεταστάσεις στους λεμφαδένες οδηγώντας στην παρατήρηση ότι η έκφρασή της σχετίζεται ισχυρά με τις μεταστάσεις. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της HSP70-2 οδήγησε στη συσσώρευση καρκινικών κυττάρων στο στάδιο G0/G1 του κυτταρικού κύκλου.

Η πρωτεΐνη WASF3 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών του συνδρόμου Wiskott -Aldridge και εμπλέκεται στον πολυμερισμό της ακτίνης και την κυτταρική κίνηση. Έχει αποδειχθεί ότι η αποσιώπηση της WASF3 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του προστάτη έχει σημαντική επίδραση στην ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν και να διηθούνται *in vitro* αλλά και να δίνουν μεταστάσεις *in vivo*. Η αύξηση της μεταστατικότητας και της κινητικότητας των κυττάρων αυτών οφείλεται στη δημιουργία ελασματοποδίων στα κύτταρα. Η WASF3 ελέγχεται από τη φωσφορυλίωση της κινάσης ABL και την υπομονάδα p85 της PI3K. Η καταστολή της HSP90 οδήγησε σε μείωση της σηματοδότησης και στην αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου HSP90/HSP70/WASF3 οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η WASF3 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο HSP90/HSP70 (Teng, Ngoka, Mei, Lesoon, & Cowell, 2012).

Στην προσπάθεια της έγκαιρης και βέλτιστης πρόγνωσης των καρκινικών μεταστάσεων έχουν βρεθεί βιοδείκτες, οι οποίοι οδηγούν στην πιο γρήγορη διάγνωση. Μέσα σε αυτούς τους δείκτες είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating tumor cells, CTCs) ωστόσο, αυτή η προσέγγιση έχει σημαντικούς περιορισμούς, με το βασικότερο περιορισμό να είναι ότι τα CTCs ανιχνεύονται σε μικρές ποσότητες με αναλογία ένα CTC ανά 10^9 κύτταρα του αίματος. Τα εξωσωματικά κυστίδια, με ετερογενή πληθυσμό μεγέθους 50-150 nm, ανιχνεύονται σε όλα τα σωματικά υγρά και εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία. Χρησιμεύουν ως βιοδραστικά οχήματα (bioactive cargos) πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων σε κύτταρα επιδρώντας στη φυσιολογία τους. Αρκετοί τύποι κυττάρων εκκρίνουν εξωσώματα, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινικών κυττάρων,

προσδίδουν συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες στο κύτταρο αλλά μπορούν να προάγουν και την ογκογένεση, τη μεταστατικότητα και τη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος. Όλες αυτές οι ιδιότητες έχουν οδηγήσει στην προώθηση των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες καρκινογένεσης με σκοπό τη διάγνωση και την παρακολούθηση των όγκων. Όμως το γεγονός ότι πολλοί τύποι κυττάρων, καρκινικών και μη, μπορούν να εκκρίνουν εξωσώματα που κυκλοφορούν στο αίμα, είναι ένα βασικό ζήτημα. Για το σκοπό αυτό σημαντικό είναι να γίνει ταυτοποίηση της προέλευσης των εξωσωμάτων και να μελετώνται αυτά που προέρχονται μόνο από καρκινικά κύτταρα. Τα εξωσώματα τα οποία απομονώθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, συγκρίθηκαν με εξωσώματα τα οποία απομονώθηκαν από υγιείς. Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των HSP70 εξωσωματίων (εξωσώματα τα οποία στην μεμβράνη τους εκφράζουν την HSP70) ήταν υψηλότερος σε ασθενείς με καρκίνο σε σχέση με τους υγιείς, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των HSP70 εξωσωματίων είναι ακόμα πιο υψηλά σε ασθενείς με μεταστάσεις. Κατά την ανάλυση της έκφρασης της HSP70 σε βιοψίες όγκου, διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα των εξωσωματίων της HSP70 στο αίμα ταιριάζουν με τα επίπεδα έκφρασης της HSP70 στο εσωτερικό του όγκου. Επίσης, μελετήθηκε η έκφραση των εξωσωματίων μετά την ανταπόκριση στη θεραπεία και διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των εξωσωματίων κατά μέσο όρο 77% (Chanteloup et al., 2020).

Τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της HSP70 σε πλακώδη καρκινικά κύτταρα του κατώτερου ορθού, σε κύτταρα του καρκίνου το παχέος εντέρου και σε κύτταρα γαστρικού καρκίνου, είναι υπεύθυνα για τις διαφορετικές οδούς μετάστασης που θα ακολουθήσει ο κάθε τύπος καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, καρκίνοι του παχέος εντέρου και του γαστρικού συστήματος κατά κύριο λόγο διηθούνται στο ήπαρ ενώ καρκίνοι του κατώτερου ορθού διηθούνται στον πνεύμονα παρακάμπτοντας το ήπαρ. Επιπλέον, μεταστάσεις καρκινωμάτων πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα δεν περνούν το ήπαρ, και διηθούνται προς τους περιφερικούς λεμφαδένες και τον εγκέφαλο. Έτσι, ένα δυνητικά σημαντικό χαρακτηριστικό για τον προσδιορισμό θετικής ή αρνητικής πρόγνωσης, είναι κατά πόσον τα καρκινικά κύτταρα με έκφραση επιφανειακής HSP70 συσχετίζονται με αυξημένη μετάσταση.

Οι HSP εκφράζονται υπερβολικά σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων όγκων και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην εισβολή όγκου, στη μετάσταση, στον

πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη διαφοροποίηση και στον κυτταρικό θάνατο. Ανάλογα με την τοποθεσία τους, οι HSP είτε μεσολαβούν στην προστασία έναντι θανατηφόρου βλάβης που προκαλείται από εξωγενές στρες, είτε ασκούν ανοσολογική ενεργοποίηση ως σήματα κινδύνου στην ανοσία του καρκίνου. Στο κυτταρόπλασμα, οι HSP λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί που υποστηρίζουν την αναδίπλωση και τη μεταφορά μιας μεγάλης ποικιλίας πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και μετά από χημικά ή φυσικά ερεθίσματα στρες. Η HSP70 είναι σε θέση να προστατεύει τα κύτταρα από ένα ευρύ φάσμα αποπτωτικών και νεκρωτικών ερεθισμάτων. Τα καρκινικά κύτταρα με θετικό φαινότυπο επιφανείας HSP70 είναι ανθεκτικότερα σε χημικά και φυσικά προκαλούμενα ερεθίσματα στρες σε σύγκριση με τα κύτταρα αρνητικού φαινοτύπου επιφάνειας HSP70. Έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση κυτταροκινών TKD, NK κυττάρων και η δεσμευμένη στη μεμβράνη HSP70 βοηθούν τον όγκο να προστατεύεται από τα χημειοθεραπευτικά σχήματα και την ακτινοθεραπεία με αποτέλεσμα την επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Συγκριτική ανάλυση της λιπιδικής σύνθεσης των όγκων με διαφορετική έκφραση μεμβρανικής HSP70, αποκάλυψε υψηλότερη ακαμψία μεμβράνης σε θετικούς σε μεμβρανική HSP70 όγκους, οι οποίοι μπορεί να έχουν καλύτερη αντοχή στη χημειοθεραπεία και / ή αντίσταση στην ακτινοθεραπεία (Pfister et al., 2007).

Οι όγκοι μπορούν να αποφύγουν την ανοσιακή απάντηση επηρεάζοντας και αλλάζοντας το φαινότυπο των κυττάρων που εκφράζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor micro Environment, TME), συμπεριλαμβανομένων των T-λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα συνθέτουν κυτταροκίνες που αναστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα και οδηγούν σε αύξηση των κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό (Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) τα οποία ενεργοποιούν τα ρυθμιστικά Fox3+ T-λεμφοκύτταρα (Tregs), τα μακροφάγα που σχετίζονται με τους όγκους (Tumor-associated macrophages, TAMs) και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου αυξάνεται η έκφραση της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β), της ιντερλευκίνης 6 (IL-6), της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) και της ιντερλευκίνης 10 (IL-10), του παράγοντα TGF-β και του παράγοντα TNF-α. Η προ φλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-1β επάγει την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού

IL-1β/υποδοχέας IL-1/β-κατενίνη οδηγώντας στην επιπλέον στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού στην περιοχή του όγκου. Επίσης, η IL-6 μέσω του υποδοχέα της και του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT3 οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, επάγει την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, την επιθήλιο-μεσεγγυματική μετάβαση και τελικώς αυξάνει την μετάσταση των κυττάρων. Ο TNF-α, μία πλειοτρόπος κυτταροκίνη, παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης, στην νεοαγγείωση των όγκων, τη φλεγμονή και την ανοσία. Φαίνεται ότι επηρεάζει όλα τα στάδια της καρκινογένεσης και διάφορες λειτουργίες του εξαρτώνται από τον τύπο των όγκων και το μικροπεριβάλλον τους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις ο TNF-α σχετίζεται με την αναστροφή του όγκου ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα, σχετίζονται με την εξέλιξη της πορείας του όγκου. Η HSP70 εκφράζεται επίσης στο μικροπεριβάλλον του όγκου αφού εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα και μπορεί να ενεργοποιήσει την φυσική και επίκτητη ανοσία έναντι των καρκινικών κυττάρων. Ο ρόλος της εξωκυττάριας HSP70 επηρεάζει τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος και συγκεκριμένα με τα μακροφάγα που σχετίζονται με τους όγκους (TAM) (Komarova et al., 2019).

Σε κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της HSP70, παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά της IL-10 και της MCP-1. Η εξωκυττάρια HSP70 λειτουργεί και ως πρωτεΐνη μοριακός συνοδός αλλά ρυθμίζει επίσης την ενεργότητα των κυτταροκινών (chaperonkine) (Komarova et al., 2019). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι στο συνδυασμό κυττάρων τύπου μακροφάγων και καρκινικών κυττάρων, η eHsp70 (extracellular Hsp70) μπορεί να παίζει ρόλο κατά του όγκου. Τα μακροφάγα αποτελούν τον κυτταρικό πληθυσμό στο μικροπεριβάλλον του όγκου των οποίων ο φαινότυπος επηρεάζεται από γειτονικά καρκινικά κύτταρα και έτσι μπορούν να επηρεάσουν έντονα την ογκογένεση των καρκινικών κυττάρων.

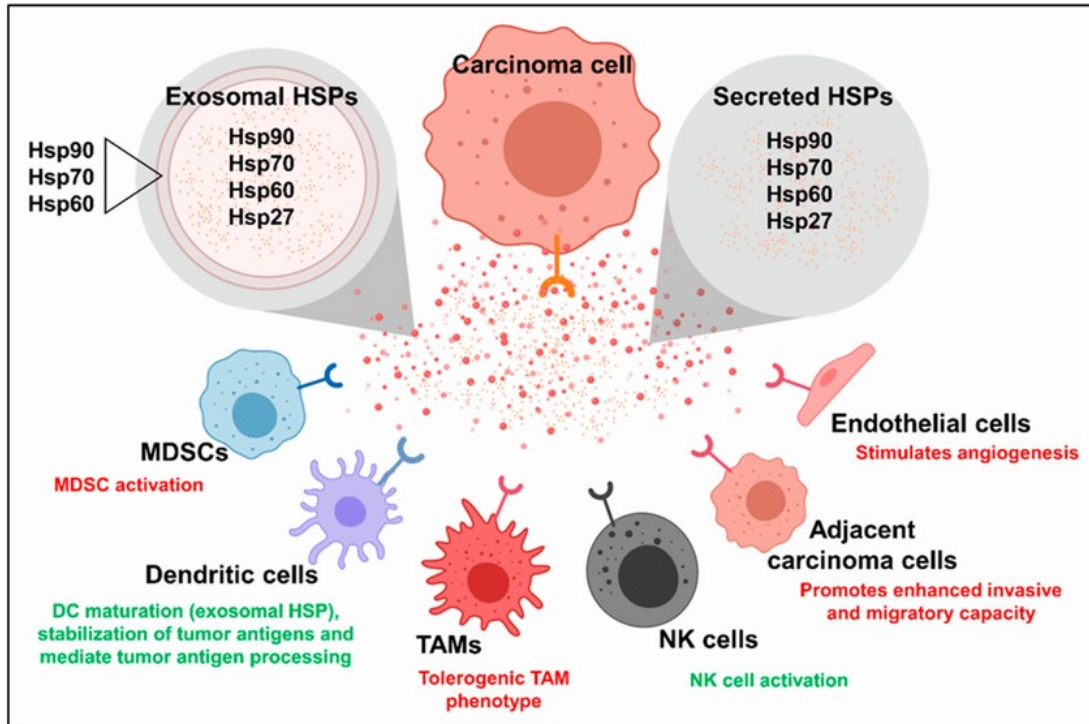
Σε πειράματα με κυτταροκαλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του eHsp70 είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο των μονοκυττάρων. Η αύξηση της έκφρασης της eHsp70 ήταν ταυτόχρονη με τη μεγαλύτερη επίδραση στον φαινότυπο μακροφάγων.

Η ικανότητα των καρκινωμάτων να στρατολογούν και να ενεργοποιούν TAM εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα κακοήθη κύτταρα που επιτυγχάνουν έναν μη διαφοροποιημένο μεσεγχυματικό φαινότυπο ως μέρος της EMT. Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων αυξήθηκε μετά την επαφή τους με μονήρη κύτταρα και ήταν υψηλότερος στα κύτταρα όγκου με αποσιωπημένη την Hsp70 καθώς και απουσία eHsp70 στο μέσο καλλιέργειας (Komarova et al., 2019).

Η έκφραση της E-καντερίνης μειώθηκε σημαντικά όταν τα καρκινικά κύτταρα με αποσιωπημένη HSP70 συν-καλλιιεργήθηκαν με μονοκύτταρα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση της HSP70 οδηγεί σε μια πιο γρήγορη και αποτελεσματική EMT. Επίσης σε άλλη μελέτη έχει αποδειχθεί ότι η HSP70 αναστέλλει την EMT που προκαλείται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης τροποποιώντας την έκφραση της Smad (J. Liu, Bao, Hao, Peng, & Hong, 2014).

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η συν-καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων με κύτταρα που μοιάζουν με μονοκύτταρα οδήγησε στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην ετοποσίδη. Αλλά, όπως αναμενόταν, σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα A549 με αποσιωπημένη την HSP70 (A549shHsp70) παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στο αντινεοπλασματικό φάρμακο. Μετά από συν-καλλιέργεια με κύτταρα THP1, και οι δυο κυτταρικές σειρές A549 (με φυσιολογικά και μειωμένα επίπεδα Hsp70) παρουσίασαν παρόμοια αντίσταση στην ετοποσίδη. Η έκκριση της HSP70 από κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να παίξει διαφορετικούς ρόλους στον καρκίνο και την ωρίμανση των μακροφάγων στην περιοχή του όγκου.

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι τα κύτταρα με μειωμένη έκφραση HSP70 μετά από μακροχρόνια επαφή με μονοκύτταρα/μακροφάγα έγιναν πιο επιθετικά από τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους. Προτείνεται ότι ο ρόλος της απελευθέρωσης HSP70 στο μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να βοηθήσει στη ρύθμιση μακροφάγων που ανήκουν σε δύο διαφορετικές οικογένειες, δηλαδή την προφλεγμονώδη και την οικογένεια προ-όγκου (Komarova et al., 2019).



Εικόνα 21: HSP70 και μικροπεριβάλλον όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν το μικροπεριβάλλον του όγκου εκκρίνοντας HSPs. Σε καρκινικά κύτταρα διαφορετικής προέλευσης έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνουν HSPs στον εξωκυτταρικό χώρο σε διαλυτή μορφή ή ως εξωσώματα. Οι διαφορετικές μορφές της HSP είναι συχνά άφθονες είτε εντός των εξωσωματίων είτε προσδεδεμένα στη μεμβράνη τους. Οι HSP που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τη βιολογία του όγκου αλλά και τις λειτουργίες άλλων κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συγκεκριμένα, οι εκκρινόμενες μορφές της HSP έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τις δραστηριότητες των κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από μυελοειδή (MDSCs), δένδριτικά κύτταρα, TAMs, κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), άλλων/γειτονικών κυττάρων καρκινώματος και ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα εξωκυτταρικά HSPs μπορούν να προωθήσουν τις ογκογονικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοκατασταλτικής δραστηριότητας MDSC, της εισβολής και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων και της αγγειογένεσης. Εναλλακτικά, οι εξωκυτταρικές HSPs μπορούν επίσης να προάγουν την ανοσία του όγκου σταθεροποιώντας τα αντιγόνα του όγκου, διεγείροντας τα TAM για την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών και με τη μεσολάβηση της επεξεργασίας αντιγόνου από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs).

Κεφάλαιο 5^ο: Η HSP70 ως φαρμακευτικός στόχος

Ο σημαντικός ρόλος της HSP70 στην επαγωγή της καρκινογένεσης αλλά και στην μεταστατική ιδιότητα των όγκων, την καθιστά έναν σημαντικό φαρμακευτικό στόχο. Μικρά μόρια έχουν σχεδιαστεί με σκοπό να δρουν ως αναστολείς του μηχανισμού της HSP70. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί αναστολείς έναντι της περιοχής SBD ή της περιοχής NBD. Επίσης έχουν ανακαλυφθεί μία σειρά αναστολέων του συμπλόκου HSP70-HSP40 και αλλοστερικοί αναστολείς της HSP70. Παράγοντες που στοχεύουν την HSP70 ή τα σύμπλοκα που δημιουργεί βρίσκονται σε προ κλινικές και κλινικές δοκιμές. Τέτοια παραδείγματα είναι η διυδροπυριμιδίνη, η δεοξυσπεργουαλίνη (deoxyspergualin), το MKT-077, οι πεπτιδικοί αναστολείς, το Ver-155008 και το PES-C1 (Murphy, 2013).

Δεοξυσπεργουαλίνη

Το πρώτο παράγωγο, το οποίο προέρχεται από έναν φυσικό παράγοντα, την 15-δεοξυσπεργουαλίνη, παρόλο που ενισχύει την δράση της ATPάσης της HSP70, είχε σημαντική αντικαρκινική δράση σε ζωικά μοντέλα λευχαιμίας. Η αντικαρκινική αυτή δράση δεν επιβεβαιώθηκε και στις κλινικές δοκιμές. Με βάση τη δομή της δεοξυσπεργουαλίνης, δημιουργήθηκε ένα μόριο το MAL3-101, το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε ξενομοσχεύματα (xenograft) πολλαπλού μυελώματος σε μύες (Braunstein et al., 2011).

MKT-077

Αποτελεί ένα φάρμακο το οποίο ανακαλύφθηκε ότι μπορεί να συσσωρεύεται εκλεκτικά στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων, έχοντας μία αντιπολλαπλασιαστική ιδιότητα ενώ δεν ασκεί την ίδια δράση στα φυσιολογικά κύτταρα. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με το MKT-077 σε ξενομοσχεύματα μυών έδειξαν ότι η επιλεκτική αυτή τοξικότητά του οφείλεται στην αλληλεπίδραση με την HSP-70, την Grp75 και την HSC70. Ο παράγοντας αυτός πλέον βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης 1 και έχει φανεί ότι αναστέλλει αλλοστερικά την περιοχή πρόσδεσης ADP της HSP70. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το παράγωγο του MKT-

077 το οποίο ονομάζεται YM-1 ήταν κυτταροτοξικό σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ φαίνεται ότι αύξησε την ευαισθησία της κυτταρικής σειράς MCF7 στην ταμοξιφαίνη (Propper et al., 1999; Rousaki et al., 2011).

Αναστολείς πεπτιδίων

Η παρατήρηση ότι ο παράγοντας AIF αλληλεπιδρά με την περιοχή SBD της HSP70 οδήγησε στον σχεδιασμό του μικρού πεπτιδίου ADD70 ως πιθανός αναστολέας της HSP70. Συγκεκριμένα, όταν καρκινικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πεπτίδιο ADD70 και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν ξενομοσχεύματα μυών, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και αύξηση του αριθμού των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Ένα τμήμα του μορίου A17, το οποίο αποτελείται από 13 αμινοξέα ήταν ικανό να οδηγήσει σε υποχώρηση υποδόριων όγκων σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα ύστερα από τοπική ή συστηματική χρήση (Schmitt et al., 2006).

Ver-155008

Αποτελεί ένα ανάλογο του ATP το οποίο προσδένεται στην HSP70 με σταθερά διαχωρισμού (Kd) ίση με 0,3 μ M και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο σε προ κλινικές μελέτες φάνηκε ότι η αντικαρκινική αυτή δράση είναι περιορισμένη και πλέον βάση της δομής του μορίου αυτού σχεδιάζονται παράγωγα, τα οποία είναι πιο αποτελεσματικά και με μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα (A. J. Massey et al., 2010).

PES & PES-CI

Η πρώτη ανακάλυψη του PES ήταν εξαιτίας της αναστολής της μεταφοράς του p53 στα μιτοχόνδρια, όμως τελικά η εκλεκτική κυτταροτοξικότητα δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το μόριο αυτό, όμως, έδειξε ότι μπορεί να μειώσει σημαντικά τον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως αποσιώπηση της HSP70. Ο μηχανισμός με τον οποίο φαίνεται ότι δρα το μόριο αυτό είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του NF- κ B αλλά και η αναστολή

της αυτοφαγίας. Επίσης αναστέλλει την HSP90 παρατείνοντας την παραγωγή των κυττάρων στην φάση G2/M (G2/M arrest) (Balaburski et al., 2013). Σε ζωικά μοντέλα με λέμφωμα των Β-λεμφοκυττάρων χορηγήθηκε PES ή PES-CI μία φορά την εβδομάδα για είκοσι συνεχόμενες εβδομάδες και παρατηρήθηκε σημαντική προστασία των ποντικών αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα στους ιστούς τους, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος και των μυών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται από τη σημαντική κυτταροτοξικότητα του PES έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών λεμφώματος, αλλά και από την συνέργεια που είχε με γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξική δράση του PES σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα (Balaburski et al., 2013; M. Kaiser et al., 2011).

Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις της HSP70

Εξαιτίας της έκφρασης της HSP70 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων σχεδιάστηκαν μονοκλωνικά αντισώματα (cmHsp70.1) τα οποία αναγνωρίζουν ένα επίτοπο στο καρβοξυτελικό άκρο της HSP70. Ο επίτοπος αυτός εκφράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μόνο των καρκινικών κυττάρων και όχι των φυσιολογικών κυττάρων. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ξενομοσχεύματα έχουν δείξει αυξημένη κυτταροτοξικότητα του αντισώματος αυτού το οποίο οδηγεί σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επιπλέον από το φυτό «Άμπελος του θεού των κεραυνών» του οποίου η επίσημη λατινική ονομασία είναι *Tripterygium wilfordii* απομονώθηκε η ουσία τριπτολίδιο, ένα υδατοδιαλυτό προ φάρμακο που προέρχεται από το μινελίδιο. Το τριπτολίδιο επάγει την έκφραση του microRNA miR-142-3p και μέσω αυτής της επαγωγής αναστέλλεται η έκφραση του mRNA της HSP70. Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση της HSP70 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, σε κύτταρα νευροβλαστώματος, σε κύτταρα οστεοσαρκώματος και σε κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Το μινελίδιο βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 για παγκρεατικούς καρκίνους με αντοχή στα κλασικά αντινεοπλασματικά. Τέλος, δύο ουσίες, η κουερσετίνη και η διμεθοξικουρκουμίνη, και τα δύο φυτικά παράγωγα, έχει φανεί ότι αναστέλλουν την HSP70 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και του προστάτη αντίστοιχα (Miyata et al., 2012; Stangl et al., 2011).

Πίνακας 4: Οι φαρμακευτικές ουσίες που έχουν σχεδιαστεί και στοχεύουν την HSP70, ο μοριακός στόχος που έχουν και η επίδρασή τους σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα.

| Ουσίες | Μοριακός στόχος | Μονοπάτι που εμπλέκεται | Επίδραση <i>in vitro</i> | Επίδραση <i>in vivo</i> | Βιβλιογραφία |
|-------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|--|---|
| PES | Αναστολέας SBD της HSP70 | Αυτοφαγία | Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης | 1) Μείωση της ανάπτυξης όγκου σε μύες με Myc-lymphoma 2) Αύξηση της ευαισθησίας στην απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και του μελανώματος 3) Αντιμεταστατική δράση | (Leu, Pimkina, Frank, Murphy, & George, 2009) (Schmitt et al., 2006) (Ernst et al., 2016) |
| ADD70 | Αναστολέας SBD της HSP70 | Απόπτωση | Ευαισθητοποίηση της φαρμακοεπαγόμενης απόπτωσης | Αναστολή της ανάπτυξης του μελανώματος | (Schmitt et al., 2006) |
| Myricetin | Αναστολέας DnaJ/Hsp(c)70 | Αναστολή πρωτεασώματος | Επαγωγή της απόπτωσης | Αναστολή της ανάπτυξης των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. | (Koren et al., 2010) |
| MKT-077 | Αναστολέας NBD της HSP70 | Απόπτωση | Αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων | Μείωση ανάπτυξης όγκου σε ξενομοσχεύματα MCF7 | (X. Li et al., 2015) |
| Ver-155008 | Αναστολέας NBD της HSP70 | Αναστολή της HSP90 | 1) Αναστολή του πολλαπλασιασμού σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου 2) Επαγωγή της απόπτωσης | - | (A. J. Massey et al., 2010) |
| YM1 | Αναστολέας του συμπλόκου HSP70-NEF | Αναστέλλει το FoxM1 | Αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων | Αναστολή της ανάπτυξης όγκων μαστού και μελανώματος σε ξενομοσχεύματα | (Koren et al., 2012) |
| YK5 | Αναστολέας NBD της HSP70 | Αναστολή του συμπλόκου HSP70/HSP90 | Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων του μαστού | - | (Rodina et al., 2013) |

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της στόχευσης της HSP70 τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα διάφορων τύπων καρκίνου έχουν οδηγήσει στην δημιουργία θεραπευτικών σχημάτων βασισμένα στην αναστολή της HSP70. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα των κλινικών μελετών έχουν δείξει ότι οι βασισμένες θεραπείες στην HSP70 είναι καλά ανεκτές. Μέχρι στιγμής δύο σχήματα έχουν φτάσει στην κλινική δοκιμή φάσης 2 (Albakova et al., 2020).

Πίνακας 5: Θεραπευτικά σχήματα στα οποία συμμετέχουν μόρια στόχευσης της HSP70 και η φάση κλινικών δοκιμών στην οποία βρίσκονται.

| Θεραπείες βασισμένες στην HSP70 | Τύπος καρκίνου | Φάση κλινικής δοκιμής | Βιβλιογραφία |
|--|---|------------------------------|----------------------------|
| Αυτόλογο πεπτίδιο της HSP70 σε συνδυασμό με imatinib | Χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) | Φάση 1 | (Zihai Li et al., 2005) |
| Αυτόλογο πεπτίδιο της HSP70 (AG-858) σε συνδυασμό με imatinib | Χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) | Φάση 2 | (ClinicalTrials.gov, 2020) |
| Αυτόλογα περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα του αίματος (PBMS) προ ενεργοποιημένα με το πεπτίδιο TKD και IL-2 | Καρκίνος παχέος εντέρου | Μελέτη περίπτωσης | (Milani et al., 2009) |
| Αυτόλογα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) προενεργοποιημένα με το πεπτίδιο TKD και IL-2 ακολουθούμενα από ακτινοθεραπεία | Μεταστατικός καρκίνος του παχέος εντέρου και μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) | Φάση 1&2 | (Specht et al., 2015) |
| Εμβόλιο με DNA μεταλλαγμένου ιού HPV16E7 και HSP70 | Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου της μήτρας | Φάση 1 | (Trimble et al., 2009) |
| Δενδριτικά κύτταρα διαμολυσμένα με το mRNA της HSP70 | Ηπατοκυτταρικός καρκίνος | Φάση 1 | (Trimble et al., 2009) |
| Αυτόλογα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) προενεργοποιημένα με το πεπτίδιο TKD και IL-2 ακολουθούμενα από ακτινοθεραπεία και μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-PD1 (nivolumab) | Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου IIIb | Μελέτη περίπτωσης | (Kokowski et al., 2019) |
| Ενδοογκική ένεση με το ανασυνδυασμένο ογκολυτικό αδενοϊό τύπου 2 ο οποίος υπερεκφράζει την HSP70 (H103) | Μεταστατικοί συμπαγείς όγκοι | Φάση 1 | (J. L. Li et al., 2009) |

5.1. Προκλινικές μελέτες

Το Μάρτιο του 2014 δημοσιεύθηκε μια μελέτη στην οποία αναφέρεται η δημιουργία ενός εμβολίου, το οποίο στοχεύει την HSP70 για την εξάλειψη συγκεκριμένων βλαστικών κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη μεταστατικότητα. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν σύμπλοκα HSP70, τα οποία απομονώθηκαν από κύτταρα, τα οποία είχαν προκύψει από τη σύντηξη δενδριτικών και ακτινο-ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων. Τα σύμπλοκα αυτά ονομάζονται HSP70.PC-F. Μύες εμβολιάστηκαν με το HSP70.PC-F και παρατηρήθηκε διέγερση των T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων έναντι των πρωτογενών και διάχυτων όγκων αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία τους στην ακτινοθεραπεία. Σε *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα φυσικοί φονείς NK είναι ικανοί να στοχεύουν καρκινικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν στη μεμβράνη τους την HSP70 (Kata et al., 2013). Οι νεότερες κατηγοριοποιήσεις χωρίζουν τους αναστολείς της HSP70 σε τρεις οικογένειες: αυτούς που στοχεύουν την PBD, αυτούς που στοχεύουν την ABD και αυτούς που στοχεύουν τους συν συνοδούς της HSP70.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον αναστολέα PES, το PES αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την προώθηση του κυτταρικού κύκλου κυττάρων που είναι θετικά στον ιό Epstein-Barr (Epstein Barr Virus, EBV). Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται οφείλεται στην απόπτωση αναστέλλοντας τις διαδικασίες αυτοφαγίας σε κύτταρα HONE1/Akata και HK1/Akata. Επίσης, το PES αυξάνει την έκφραση του LMP1, οδηγώντας σε απόπτωση τα κύτταρα B95-8 μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών από τον παράγοντα NF-κΒ. Επιπλέον, το PES μειώνει την έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου 1 του ιού (Epstein Barr, Nuclear Antigen 1, EBNA1) και μειώνει τη λυτική αντιγραφή του EBV (Epstein Barr Virus). Η δράση αυτή του PES στη μείωση της έκφρασης των ικών πρωτεϊνών και του ικού DNA φαίνεται ότι μεσολαβείται από την ανασταλτική δράση του PES έναντι της HSP70. Έχει βρεθεί ότι η HSP70 αλληλεπιδρά με το EBNA1 με το PES να αναστέλλει αυτή την αλληλεπίδραση. Τέλος, το PES αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων ξενομοσχευμένου όγκου HONE1 / Akata σε BALB / c nude μύες (Wang et al., 2018). Η χορήγηση PES σε πειραματικά μοντέλα μυών στα οποία είχε αναπτυχθεί λέμφωμα B λεμφοκυττάρων, έδειξε αυξημένη κυτταροτοξικότητα, αναστολή της αυτοφαγίας και προστασία των μυών από την ανάπτυξη του

λεμφώματος, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα στους υγιείς ιστούς. Η κυτταροτοξικότητα του PES έχει αποδειχθεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές λευχαιμιών όπως η οξεία λευχαιμία (Martin Kaiser et al., 2011) και η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) (Steele et al., 2009). Η συγχορήγηση PES με το αντινεοπλασματικό μεθοτρεξάτη έδρασε συνεργιστικά σε καρκινική κυτταρική σειρά τραχήλου της μήτρας (French et al., 2013).

Πρωτεΐνες XIAP και c-IAP1 αλληλοεπιδρούν με την HSP70 ως συμπαράγοντες και έχει βρεθεί αυξημένη έκφρασή τους σε στοματικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι το PES αναστέλλει τις πρωτεΐνες αυτές σε κυτταρική σειρά πλακωδών κυττάρων στοματικού καρκίνου και παρεμποδίζει την πρόσδεσή τους με την HSP70. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως η δράση του PES μεσολαβείται από τη μείωση της έκφρασης και της φωσφορυλίωσης των Akt και ERK ρυθμίζοντας έτσι την απόπτωση και την κυτταρική επιβίωση. Η αναστολή της HSP70 ενισχύει τη δράση της γεμισιταβίνης και της κουερσετίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα (Jiang & Xiao, 2020).

Σχετικά με το ανάλογο του ATP, το VER-155008, προσδένεται στην περιοχή NBD των HSP70-8 και HSP70-1 και αποτελεί έναν ανταγωνιστικό αναστολέα του ATP ασκώντας αλλοστερικό έλεγχο στις περιοχές NBD και SBD. Έχει αποδειχθεί ότι σε *in vitro* προκλινικές μελέτες αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (HCT116) (Williamson et al., 2009) και καρκινικών κυττάρων καρκίνου του μαστού (BT474) (A. Massey et al., 2009). Δυστυχώς δεν έχει προχωρήσει σε *in vivo* μελέτες εξαιτίας της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς του, ενώ πλέον μελετάται για την προστατευτική του δράση στην αξονική μορφολογία και τη βελτίωση της μνήμης σε μοντέλα μυών για την νόσο Alzheimer (5XFAD μύες) όπου έχει φανεί να αυξάνει σημαντικά την αξονική ανάπλαση σε νευρώνες που έχουν επωαστεί με β-αμυλοειδές *in vitro* αλλά έχει φανεί και *in vivo* ότι βελτιώνεται η αναγνώριση αλλά και η τοποθεσία νέων αντικειμένων, ενώ παράλληλα παρατηρείται και βελτίωση της επεισοδιακής μνήμης (Yang & Tohda, 2018). Η δεοξυσπεργουαλίνη έχει φανεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη της λευχαιμίας σε πειραματικά μοντέλα μυών (Plowman et al., 1987).

Το κατιονικό ανάλογο της ροδακυανίνης MKT-077 προκαλεί εκλεκτική τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα. Οι πιο γνωστοί στόχοι του είναι η ογκοπρωτεΐνη

RAS, η F ακτίνη, η μορταλίνη και οι τελομεράσες. Έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και αναστέλλει την ενεργότητα των τελομερασών. Συγκεκριμένα, η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί σε πέντε τύπους καρκίνου: καρκίνος του παχέος εντέρου, καρκίνος του μαστού, παγκρεατικός καρκίνος, καρκίνος ουροδόχου κύστης και στο μελάνωμα (Koya et al., 1996).

Το ανάλογο YM-01 έχει επίσης μελετηθεί και έχει αποδειχθεί ότι σε *in vitro* μελέτες μπορεί να αυξήσει ή να επαναφέρει την ευαισθησία στην ταμοξιφαίνη σε κύτταρα με αντίσταση στον παράγοντα αυτόν MCF7. Επίσης έχει φανεί ότι μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Tau σε κύτταρα HeLa, τα οποία υπερεκφράζουν την Tau, αλλά και μειώνουν τα επίπεδα της ενδογενούς Tau σε κύτταρα νευροβλαστώματος ή σε πρώιμους νευρώνες, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από μοντέλα μυών με νευροεκφυλιστικό φαινότυπο rTg4510. Ένα άλλο ανάλογο το YM-08 μπορεί να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μειώσει τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Tau σε απομονωμένες τομές εγκεφάλου καθιστώντας έτσι τον αναστολέα αυτό για χρήση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Abisambra et al., 2013; Miyata et al., 2013).

Το YK5 έχει δοκιμαστεί και έχει αποδειχθεί η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου σε κυτταρικές σειρές οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Επίσης έχει φανεί η δράση συνέργειας με χημειοθεραπευτικές ουσίες όπως το AsO₃ και το PU-H71 σε πρώιμα κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (Sharma et al., 2012).

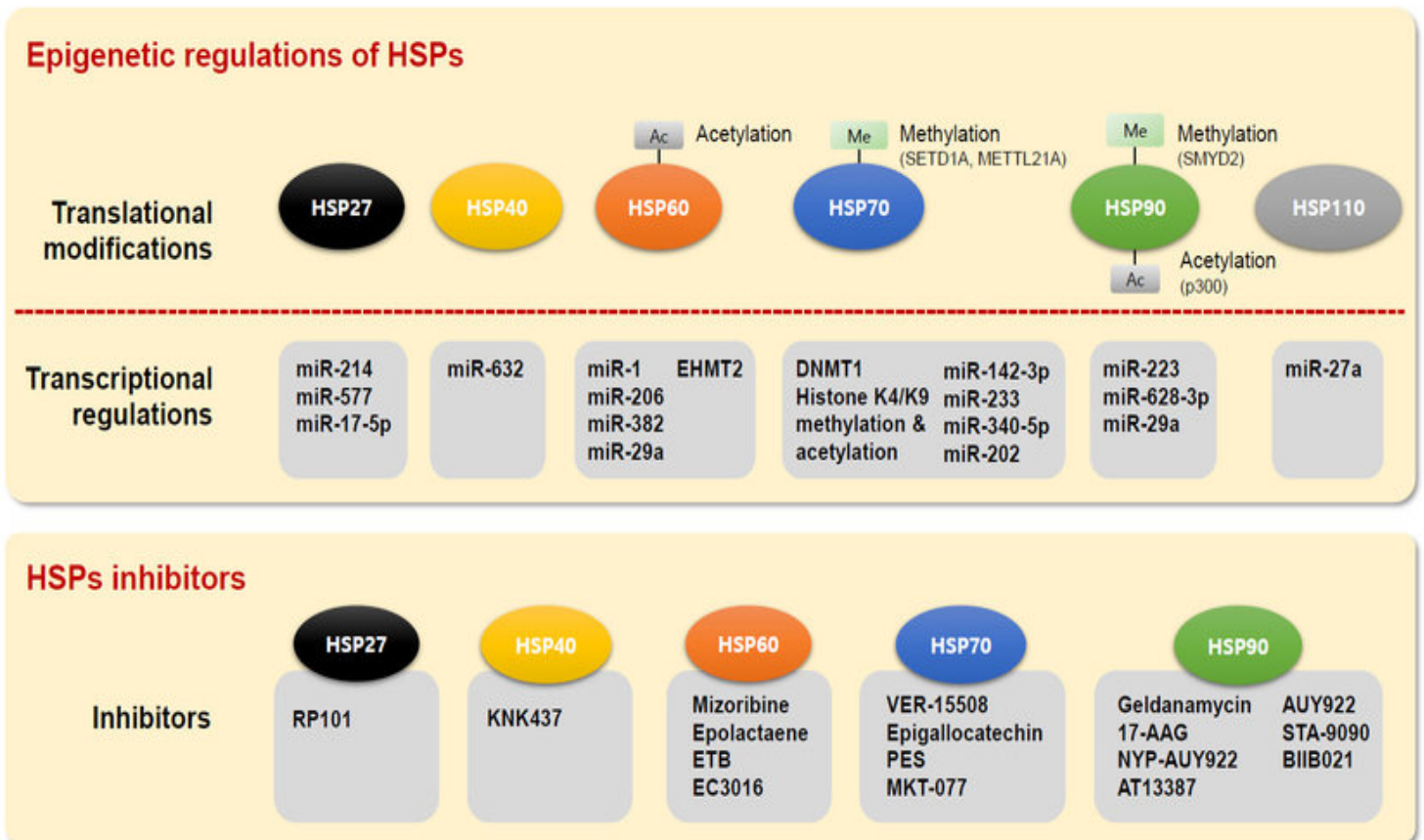
Όσον αφορά το πεπτίδιο ADD70 (AIF-Derived decoy for HSP70) μειώνει το μέγεθος των όγκων σε καρκίνο του παχέος εντέρου και στο μελάνωμα σε επίμυες και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα αυτά στην σισπλατίνη (cisplatin). Η δραστηριότητα αυτή του ADD70 δεν έχει φανεί και σε ανοσοκατεσταλμένους μύες διότι η αντικαρκινική του δράση οφείλεται στην αύξηση της ενεργότητας των κυτταροτοξικών CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων (S. Kumar et al., 2016).

5.2. Κλινικές μελέτες

Κάποια από τα ανάλογα που στοχεύουν την HSP70 έχουν προχωρήσει και σε κλινικές μελέτες. Ένας τρόπος καταπολέμησης των μεταστατικών όγκων είναι η θεραπεία με κύτταρα φυσικούς φονείς (NK) σε ασθενείς όπου τα καρκινικά κύτταρα είναι θετικά σε HSP70 στην κυτταρική μεμβράνη. Με *ex vivo* διαδικασία, κύτταρα φυσικοί φονείς διεγέρθηκαν με TKD/IL-2 και εν συνεχεία χορηγήθηκαν σε ασθενείς που συμμετείχαν σε κλινική δοκιμή φάσης 1 και είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του παχέος εντέρου ή με καρκίνο του πνεύμονα. Ο συνδυασμός των διεγερμένων αυτών κυττάρων μπορούν να χαρακτηριστούν ως ανοσοθεραπεία όπου σε συνδυασμό με συμβατικές θεραπείες είναι ένας πολλά υποσχόμενος συνδυασμός για την εξάλειψη της μετάστασης σε ασθενείς με όγκους όπου εκφράζεται στις μεμβράνες των κυττάρων τους η HSP70 (Kata et al., 2013).

Η δεοξυσπεργουαλίνη είναι ένα φάρμακο που βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 για διάφορες καταστάσεις όπως η χρόνια απόρριψη μοσχευμάτων σε ασθενείς με νεφρικά μοσχεύματα, για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, για νεφρικές ασθένειες μαζί με το μονοκλωνικό αντίσωμα Alemtuzumab ενώ με το μονοκλωνικό αντίσωμα Pembrolizumab έχει χρησιμοποιηθεί για λεμφώματα που σχετίζονται με τα T λεμφοκύτταρα ή με λεμφώματα που σχετίζονται με τους φυσικούς φονείς. Σε κλινικές δοκιμές φάσης 2 έχει φανεί ότι μπορεί να έχει ευεργετικό αποτέλεσμα έναντι μεταστατικού καρκίνου του μαστού με αντίσταση στην χημειοθεραπεία με βασική ανεπιθύμητη ενέργεια την υπομαγνησισαιμία, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με νευρομυϊκές παρενέργειες (Dhingra et al., 1994).

Το MKT-077 έχει φτάσει μέχρι την κλινική δοκιμή φάσης 1, όπου έχει ανασταλεί και η περαιτέρω μελέτη του εξαιτίας της μη αναστρέψιμης νεφρικής τοξικότητας. Παρόλα αυτά οι κλινικές μελέτες και οι *in vivo* μελέτες με το MKT-077 έδειξαν ότι ανάλογα ροδακυανίνης που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλούς θεραπευτικούς στόχους. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν τα ανάλογα YM1 και YK5 (Propper et al., 1999).



Εικόνα 21: Συγκεντρωτική εικόνα των επιγενετικών ρυθμίσεων όπου συμμετέχουν οι HSPs και οι αναστολείς τους ως θεραπεία σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η HSP70 μεθυλιώνεται, ρυθμίζει την μεθυλίωση και ακετυλίωση των ιστονών K4/K9 και επηρεάζει την έκφραση των microRNAs, miR-142-3P, miR-233, miR-340-5P, miR-202. Οι πιο γνωστοί αναστολείς της HSP70 είναι το PES, το VER-15508 και το MKT-077 (Ban, Han, Hur, & Cho, 2019).

Κεφάλαιο 6^ο: Συζήτηση

Η κυτταρική μετανάστευση αποτελεί μια διαδικασία σημαντική για την κίνηση των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων. Περιλαμβάνει πολλά στάδια που κατηγοριοποιούνται βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Από τις βασικότερες μορφολογικές αλλαγές που πραγματοποιούνται είναι η δημιουργία προεξοχών με σκοπό τη δημιουργία προπορευόμενου άκρου με το οποίο διευκολύνεται η κυτταρική μετανάστευση. Φυσιολογικά η κυτταρική μετανάστευση πραγματοποιείται κατά την ανοσολογική απόκριση, τη μετανάστευση κυττάρων στη νευρική ακρολοφία, την εμβρυογένεση και την επούλωση τραυμάτων. Παθολογικά η κυτταρική κίνηση και μετανάστευση παρατηρείται στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων σε νέους υγιείς ιστούς. Κατά τη διαδικασία της μετανάστευσης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα χάνουν τις κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ τους, αυξάνεται η ικανότητα της κίνησής τους και αντιστέκονται σε μηχανισμούς απόπτωσης. Ουσιαστικά τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τον επιθηλιακό φαινότυπό τους και αποκτούν έναν νέο μεσεγχυματικό φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα. Η διαδικασία αυτή της μετάβασης από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο καλείται επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition, EMT).

Η EMT διαδικασία είναι βασική για την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν και να διηθούνται σε άλλους υγιείς ιστούς δίνοντας μεταστάσεις. Η E-καντερίνη εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση και την επικοινωνία των επιθηλιακών κυττάρων. Η μείωση της έκφρασης της E-καντερίνης και η αύξηση έκφρασης παραγόντων όπως η φιμπρονεκτίνη, η N-καντερίνη και η βιμεντίνη είναι κύρια χαρακτηριστικά της EMT. Ο κυτταροσκελετός ακτίνης αναδιοργανώνεται και δημιουργούνται ελασματοπόδια (lamellipodia), νηματοπόδια (filopodia) και πόδια διήθησης που δίνουν στα κύτταρα τη δυνατότητα της κίνησης. Αφού μεταναστεύσουν στο νέο ιστό μέσω της αντίστροφης διαδικασίας, της μεσεγχυματικής επιθηλιακής μετάβασης (MET) επιστρέφουν στον επιθηλιακό φαινότυπο και εγκαθίστανται στον ιστό. Μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι ZEB (zinc-finger E-box-binding), bHLH (basic helix-loop-helix), SNAIL και Twist

καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που αποτελούν επιθηλιακούς δείκτες και ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με το μεσεγχυματικό φαινότυπο.

Μια σειρά από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι βρίσκονται κάτω από τη ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών ενεργοποιούνται αλλάζοντας το φαινότυπο. Έτσι, οι μεταγραφικοί παράγοντες SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB2, KLF8 και E47 προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου της E-καντερίνης και αναστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου, ενώ οι παράγοντες Twist, TCF4, FOXC2 και η πρωτεΐνη SIX1 καταστέλλουν την έκφραση της E-καντερίνης. Οι πρωτεΐνες SMAD οδηγούν στην επαγωγή της EMT, η οποία επίσης επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως τα μονοπάτια PI3K/Akt, MAPK/ERK, MAPK/p38 και το μονοπάτι JNK. Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται σε υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης-τυροσίνης (RTKs), με τους υποδοχείς EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) για να επάγουν την EMT. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες είναι το μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK. Η φωσφορυλίωση των ERK1&2 επάγει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της EMT και παραγόντων που επάγουν την κυτταρική κινητικότητα και τη διήθηση. Οι κυριότεροι παράγοντες που ενεργοποιούνται είναι οι GTPάσες RHO και η ριβοσωμική πρωτεϊνική κινάση S6. Τέλος, τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt, Notch και hedgehog (HH) επάγουν την EMT μέσω της φωσφορυλίωσης και κατ' επέκταση της αναστολής της GSK3β οδηγώντας σε σταθεροποίηση της β-κατενίνης.

Έχουν βρεθεί τρεις υποτύποι της EMT. Η EMT τύπου 1 επάγεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt στα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και κυρίως στα στάδια της γαστριδίωσης. Η EMT τύπου 2 παρατηρείται σε περιπτώσεις αναγέννησης ιστών, επούλωσης πληγών και ίνωσης των οργάνων. Η EMT τύπου 3 παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα των οποίων τα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν υποστεί γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις.

Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί (chaperones) είναι μια οικογένεια συντηρημένων πρωτεϊνών, οι οποίες συναντώνται σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς και σχετίζονται άμεσα με την κυτταρική επιβίωση και

προστατεύουν από την συσσωμάτωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και επιταχύνουν τα βραδέα στάδια της αναδίπλωσης. Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί που εκφράζονται σε καταστάσεις θερμικού σοκ ονομάζονται heat shock proteins, κατηγοριοποιούνται βάσει του μοριακού τους βάρους και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και στην απόκρισή του σε καταστάσεις στρες. Όλες οι οικογένειες έχουν κοινή δομή και παρατηρούνται κοινές λειτουργικές επικράτειες (Domains). Μία επικράτεια αποτελεί η θέση πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου αδενίνης όπου προσδένεται και υδρολύεται το ATP.

Η HSP70 αποτελεί βασική πρωτεΐνη για την προστασία των κυττάρων από το θερμικό σοκ και εμπλέκεται σε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την κυτταρική γήρανση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η υπερέκφρασή της έχει αποδειχθεί σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Η έκφρασή της σε κακοήθεις όγκους υποδεικνύει μια κακή πρόγνωση για την εξέλιξη της νόσου. Η HSP70 προσδένει αντιγονικά πεπτιδία που προέρχονται από τους όγκους, το σύμπλοκο HSP70-πεπτιδίου οδηγεί σε κυτταρική απόκριση μεσολαβούμενη από τα CD8⁺ T κυτταροτοξικά κύτταρα ενώ η μεμβρανική έκφραση της HSP70 διεγείρει και ενεργοποιεί τα NK κύτταρα. Η HSP70 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα και η έκφρασή της έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε καταστολή των αποπτωτικών μηχανισμών και αντίσταση των κυττάρων σε αυτούς τους μηχανισμούς. Το σύμπλοκο HSP70-HSP90 σταθεροποιεί τον παράγοντα HIF-1a, που επάγεται υπό συνθήκες υποξίας και είναι υπεύθυνος για την έναρξη της αγγειογένεσης καθώς και της διήθησης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Όσον αφορά το ρόλο της HSP70 στη μετάσταση, η αποσιώπηση της HSP70 οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεσεγχυματικού φαινότυπου σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα και η μειορρύθμιση της HSP70 οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του συμπλόκου E-καντερίνη/β-κατενίνη οδηγώντας στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η αυξημένη έκφραση της HSP70 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορους τύπους μεταστατικών καρκινικών κυττάρων και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης του υπολογισμού της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων. Η καταστολή της σηματοδότησης του TGF-β μέσω της φωσφορυλίωσης του SMAD2 από την HSP70 επάγει την EMT και αυξάνει το μεταστατικό χαρακτήρα των καρκινικών κυττάρων.

Ο σημαντικός ρόλος της στην επαγωγή της ογκογένεσης και της μετάστασης έχει ως αποτέλεσμα τη μελέτη της HSP70 ως φαρμακευτικό στόχο σε διάφορους τύπους καρκίνου είτε τη χρήση της ως βιοδείκτη για έγκαιρη διάγνωση μεταστάσεων. Μικρά μόρια έχουν σχεδιαστεί με σκοπό να δρουν ως αναστολείς του μηχανισμού της HSP70. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί αναστολείς έναντι της περιοχής SBD ή της περιοχής NBD. Επίσης έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί αναστολείς του συμπλόκου HSP70-HSP40 και αλλοστερικοί αναστολείς της HSP70. Παράγοντες που στοχεύουν την HSP70 ή τα σύμπλοκα που δημιουργεί βρίσκονται σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Οι νεότερες κατηγοριοποιήσεις χωρίζουν τους αναστολείς της HSP70 σε τρεις οικογένειες: αυτούς που στοχεύουν την PBD, αυτούς που στοχεύουν την ABD και αυτούς που στοχεύουν τους συν συνοδούς της HSP70. Τέτοια παραδείγματα είναι η διυδροπυριμιδίνη, η δεοξυσπεργουαλίνη (deoxyspergualin), οι MKT-077, οι πεπτιδικοί αναστολείς, το Ver-155008 και το PES-C1 ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη δημιουργία εμβολίων.

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση της HSP70 έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους συμπαγών και αιματολογικών όγκων, όμως η αποσιώπησή της *in vitro* έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του επιθηλιακού χαρακτήρα των κυττάρων και την προώθηση της EMT. Επομένως, μεμονωμένα η αποσιώπηση ή η αναστολή της HSP70 δε θα μπορούσε να προκαλεί μια στρατηγική μονοθεραπείας για την αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου αλλά όπως έχει φανεί στις μέχρι στιγμής μελέτες η χρήση των αναστολέων της μαζί με standard χημειοθεραπευτικά θα μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία και να αποτελέσει μια αποτελεσματική θεραπεία για διάφορους τύπους καρκίνου.

Ο ρόλος της Hsp70 στην Επιθήλιο-μεσεγχυματική Μετάπτωση

Χριστίνα Τζίμα

Περίληψη

Δυο από τα πιο βασικά προβλήματα σε διάφορους τύπους καρκίνου αποτελεί η αντίσταση στη χημειοθεραπεία και η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούνται και να μεταναστεύουν σε άλλους υγιείς ιστούς. Στην προσπάθεια της δημιουργίας πιο αποτελεσματικών θεραπειών, έχει γίνει εκτενής μελέτη του ρόλου της HSP70 στην καρκινογένεση, στην μετάσταση και στην EMT. Η EMT διαδικασία αποτελεί την κύρια διαδικασία μετατροπής των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα της κυτταρικής κίνησης. Η HSP70 έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και ότι εκφράζεται στο εξωτερικό της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης οδηγώντας στη δημιουργία εξωσωματίων. Η στόχευση της HSP70 έχει αποτελέσει πεδίο μελέτης τα τελευταία χρόνια, με τους αναστολείς να έχουν φθάσει μέχρι και σε κλινικές δοκιμές φάσης 2. Η στόχευση της HSP70 σε συνδυασμό με κλασική χημειοθεραπευτική αγωγή φαίνεται ότι μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός θεραπευτικού σχήματος αποτελεσματικό έναντι των μεταστατικών κυττάρων και των κυττάρων με αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

The role of Hsp70 in Epithelial-mesenchymal Transition

Christina Tzima

Abstract

Two of the most common problems in various types of cancer are resistance to chemotherapy and the ability of cancer cells to infiltrate and migrate to other healthy tissues. In an effort to create more effective therapies, the role of HSP70 in carcinogenesis, metastasis and EMT has been extensively studied. The EMT process is the main process of conversion of epithelial cells into mesenchymal cells that have the ability of cell movement. HSP70 has been observed to be overexpressed in various types of cancer and to be expressed externally on their cytoplasmic membrane leading to the formation of extracorporeal. Targeting HSP70 has been a field of study in recent years, with inhibitors reaching as far as phase 2 clinical trials. Targeting HSP70 in combination with conventional chemotherapy appears to lead to the development of an effective metastatic regimen against metastatic cells and cells with resistance to chemotherapy and radiotherapy.

Βιβλιογραφία

- Abisambra, J., Jinwal, U. K., Miyata, Y., Rogers, J., Blair, L., Li, X., . . . Dickey, C. A. (2013). Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biological psychiatry*, *74*(5), 367-374. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.02.027
- Aiello, N. M., & Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(5), 1016-1026. doi: 10.1084/jem.20181827
- Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I., & Sapozhnikov, A. M. (2020). HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells*, *9*(3), 587. doi: 10.3390/cells9030587
- Albakova, Z., Siam, M. K. S., Sacitharan, P. K., Ziganshin, R. H., Ryazantsev, D. Y., & Sapozhnikov, A. M. (2021). Extracellular heat shock proteins and cancer: New perspectives. *Translational Oncology*, *14*(2), 100995. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100995>
- Alimperti, S., & Andreadis, S. T. (2015). CDH2 and CDH11 act as regulators of stem cell fate decisions. *Stem Cell Research*, *14*(3), 270-282. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.02.002>
- Balaburski, G. M., Leu, J. I., Beeharry, N., Hayik, S., Andrade, M. D., Zhang, G., . . . Murphy, M. E. (2013). A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent. *Mol Cancer Res*, *11*(3), 219-229.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, *353*, aac4354-aac4354. doi: 10.1126/science.aac4354
- Ban, H. S., Han, T.-S., Hur, K., & Cho, H.-S. (2019). Epigenetic Alterations of Heat Shock Proteins (HSPs) in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *20*, 4758. doi: 10.3390/ijms20194758
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *18*(2), 128-134. doi: 10.1038/nrc.2017.118
- Braunstein, M. J., Scott, S. S., Scott, C. M., Behrman, S., Walter, P., Wipf, P., . . . Batuman, O. (2011). Antimyeloma Effects of the Heat Shock Protein 70 Molecular Chaperone Inhibitor MAL3-101. *J Oncol*, *232037*(10), 29.
- Brochu, C., Haimeur, A., & Ouellette, M. (2004). The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite leishmania. *Cell stress & chaperones*, *9*(3), 294-303. doi: 10.1379/csc-15r1.1
- Brouhard, G. J., & Rice, L. M. (2018). Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *19*(7), 451-463. doi: 10.1038/s41580-018-0009-y
- Calderwood, S. K. (2007). Introduction: Heat Shock Proteins—From Drosophila Stress Proteins to Mediators of Human Disease. In S. K. Calderwood (Ed.), *Cell Stress Proteins* (pp. 1-4). New York, NY: Springer New York.
- Canesin, G., Evans-Axelsson, S., Hellsten, R., Krzyzanowska, A., Prasad, C. P., Bjartell, A., & Andersson, T. (2017). Treatment with the WNT5A-mimicking peptide Foxy-5 effectively reduces the metastatic spread of WNT5A-low prostate cancer cells in an orthotopic mouse model. *PLoS one*, *12*(9), e0184418-e0184418. doi: 10.1371/journal.pone.0184418

- Chanteloup, G., Cordonnier, M., Isambert, N., Bertaut, A., Hervieu, A., Hennequin, A., . . . Gobbo, J. (2020). Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: a clinical prospective pilot study. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*, 1766192. doi: 10.1080/20013078.2020.1766192
- Chapter 3 - Cytoskeleton. (2008). In S. R. Goodman (Ed.), *Medical Cell Biology (Third Edition)* (pp. 59-100). San Diego: Academic Press.
- Clark, P. (2004). Protein folding in the cell: Reshaping the folding funnel. *Trends in biochemical sciences*, *29*, 527-534. doi: 10.1016/j.tibs.2004.08.008
- ClinicalTrials.gov. (2020). AG-858 in Patients Who Are Cytogenetically Positive After Treatment With Gleevec.
- Colvin, T. A., Gabai, V. L., Gong, J., Calderwood, S. K., Li, H., Gummuluru, S., . . . Sherman, M. Y. (2014). Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer research*, *74*(17), 4731-4740. doi: 10.1158/0008-5472.can-14-0747
- Dhingra, K., Valero, V., Gutierrez, L., Theriault, R., Booser, D., Holmes, F., . . . Hortobagyi, G. (1994). Phase II study of deoxyspergualin in metastatic breast cancer. *Invest New Drugs*, *12*(3), 235-241. doi: 10.1007/bf00873965
- Dongre, A., & Weinberg, R. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4
- Draber, P., & Dráberová, E. (2012). Microtubules (pp. 29-53).
- Ernst, K., Liebscher, M., Mathea, S., Granzhan, A., Schmid, J., Popoff, M. R., . . . Schiene-Fischer, C. (2016). A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin. *Scientific Reports*, *6*, 20301-20301. doi: 10.1038/srep20301
- Fernandez-Reche, A., Cobos, E., Luque, I., Ruiz-Sanz, J., & Martinez, J. C. (2018). Approaching the thermodynamic view of protein folding through the reproduction of Anfinsen's experiment by undergraduate physical biochemistry students: The Anfinsen's Experiment on Ribonuclease Folding. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *46*. doi: 10.1002/bmb.21107
- French, J., Zhao, H., An, S., Niessen, S., Deng, Y., Cravatt, B., & Benkovic, S. (2013). Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*. doi: 10.1073/pnas.1300173110
- Gonzalez, D., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling*, *7*, re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189
- Jiang, L., & Xiao, J. (2020). 2-phenylethynylsulfonamide inhibits growth of oral squamous cell carcinoma cells by blocking the function of heat shock protein 70. *Biosci Rep*, *40*(3). doi: 10.1042/bsr20200079
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, *4*(4), 253-265. doi: 10.1038/nrc1317
- Kaiser, M., Kühnl, A., Reins, J., Fischer, S., Ortiz-Tanchez, J., Schlee, C., . . . Baldus, C. D. (2011). Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukemia. *Blood Cancer J*, *1*(7), 15.

- Kaiser, M., Kuhn, A., Reins, J., Fischer, S., Ortiz-Tanchez, J., Schlee, C., . . . Baldus, C. (2011). Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukemia. *Blood cancer journal*, *1*, e28. doi: 10.1038/bcj.2011.28
- Kalluri, R., & Weinberg, R. (2009). Kalluri R, Weinberg RA.. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-1428. *The Journal of clinical investigation*, *119*, 1420-1428. doi: 10.1172/jci39104
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *11*(8), 579-592. doi: 10.1038/nrm2941
- Kasioumi, P., Vrazeli, P., Vezyraki, P., Zerikiotis, S., Katsouras, C., Damalas, A., & Angelidis, C. (2018). Hsp70 (HSP70A1A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells. *International Journal of Oncology*, *54*. doi: 10.3892/ijo.2018.4666
- Kata, J., Lipp, A., Nimmervoll, B., Sonnleitner, A., Hesse, J., Haselgrübler, T., & Balogi, Z. (2013). The Complex Function of Hsp70 in Metastatic Cancer. *Cancers*, *6*, 42-66. doi: 10.3390/cancers6010042
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 323-355. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442
- Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., & Hartl, F. U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of cell biology*, *217*(1), 51-63. doi: 10.1083/jcb.201709072
- Kobayashi, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamada, N., Migita, S., Hioki, T., Mizutani, D., & Kozawa, O. (2020). Heat shock protein 70 positively regulates transforming growth factor- α -induced hepatocellular carcinoma cell migration via the AKT signaling pathway. *Heliyon*, *6*, e05002. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05002
- Kokowski, K., Stangl, S., Seier, S., Hildebrandt, M., Vaupel, P., & Multhoff, G. (2019). Radiochemotherapy combined with NK cell transfer followed by second-line PD-1 inhibition in a patient with NSCLC stage IIIb inducing long-term tumor control: a case study. [Radiochemotherapie in Kombination mit NK-Zell-Transfer gefolgt von einer Zweitlinien-PD-1-Inhibition bei einem Patienten im NSCLC-Stadium IIIb führt zur Langzeittumorkontrolle: Ein Fallbericht]. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, *195*(4), 352-361. doi: 10.1007/s00066-019-01434-9
- Komarova, E. Y., Marchenko, L. V., Zhakhov, A. V., Nikotina, A. D., Aksenov, N. D., Suezov, R. V., . . . Guzhova, I. V. (2019). Extracellular Hsp70 Reduces the Pro-Tumor Capacity of Monocytes/Macrophages Co-Cultivated with Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, *21*(1), 59. doi: 10.3390/ijms21010059
- Koren, J., 3rd, Jinwal, U. K., Jin, Y., O'Leary, J., Jones, J. R., Johnson, A. G., . . . Dickey, C. A. (2010). Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels. *J Biol Chem*, *285*(4), 2498-2505.
- Koren, J., 3rd, Miyata, Y., Kiray, J., O'Leary, J. C., 3rd, Nguyen, L., Guo, J., . . . Dickey, C. A. (2012). Rhodocyanine derivative selectively targets cancer cells and overcomes tamoxifen resistance. *PLoS one*, *7*(4), 26.
- Kotoglou, P., Kalaitzakis, A., Vezyraki, P., Tzavaras, T., Michalis, L. K., Dantzer, F., . . . Angelidis, C. (2009). Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones*, *14*(4), 391-406. doi: 10.1007/s12192-008-0093-6

- Kowalczyk, A. P., & Nanes, B. A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Sub-cellular biochemistry*, *60*, 197-222. doi: 10.1007/978-94-007-4186-7_9
- Koya, K., Li, Y., Wang, H., Ukai, T., Tatsuta, N., Kawakami, M., . . . Chen, L. B. (1996). MKT-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer research*, *56*(3), 538-543.
- Kumar, A., Sharma, S., Chunduri, V., Kaur, A., Kaur, S., Malhotra, N., . . . Garg, M. (2020). Genome-wide Identification and Characterization of Heat Shock Protein Family Reveals Role in Development and Stress Conditions in *Triticum aestivum* L. *Scientific Reports*, *10*(1), 7858. doi: 10.1038/s41598-020-64746-2
- Kumar, S., Stokes, J., Singh, U., Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters*, *374*, 156-166. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.056
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*, 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Lebrecht, A., Hefler, L., Tempfer, C., & Koelbl, H. (2001). Serum Cytokine Concentrations in Patients with Cervical Cancer: Interleukin-4, Interferon- γ , and Monocyte Chemoattractant Protein-1: To the Editor. *Gynecologic Oncology*, *83*(1), 170-171. doi: <https://doi.org/10.1006/gyno.2001.6361>
- Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J.-L., & Vallée, A. (2019). Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers. *Frontiers in Oncology*, *9*, 1248-1248. doi: 10.3389/fonc.2019.01248
- Lee, S. H., & Reichardt, L. F. (2009). Cadherins and Synapse Organization. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 489-496). Oxford: Academic Press.
- Lehtonen, Š., Sonninen, T.-M., Wojciechowski, S., Goldsteins, G., & Koistinaho, J. (2019). Dysfunction of Cellular Proteostasis in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*, *13*, 457-457. doi: 10.3389/fnins.2019.00457
- Leu, J. I., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E., & George, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell*, *36*(1), 15-27.
- Levayer, R., & Lecuit, T. (2008). Breaking down EMT. *Nature cell biology*, *10*, 757-759. doi: 10.1038/ncb0708-757
- Li, J. L., Liu, H. L., Zhang, X. R., Xu, J. P., Hu, W. K., Liang, M., . . . Chu, D. T. (2009). A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients. *Gene Therapy*, *16*(3), 376-382. doi: 10.1038/gt.2008.179
- Li, X., Colvin, T., Rauch, J. N., Acosta-Alvear, D., Kampmann, M., Dunyak, B., . . . Gestwicki, J. E. (2015). Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther*, *14*(3), 642-648.
- Li, Z., Hartl, F. U., & Bracher, A. (2013). Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(8), 929-935. doi: 10.1038/nsmb.2608
- Li, Z., Qiao, Y., Liu, B., Laska, E. J., Chakravarthi, P., Kulko, J. M., . . . Srivastava, P. K. (2005). Combination of Imatinib Mesylate with Autologous Leukocyte-Derived Heat Shock Protein

- and Chronic Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 11(12), 4460-4468. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-0250
- Liu, J., Bao, J., Hao, J., Peng, Y., & Hong, F. (2014). HSP70 inhibits high glucose-induced Smad3 activation and attenuates epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells. *Molecular medicine reports*, 10. doi: 10.3892/mmr.2014.2279
- Liu, X., Li, J., Loureiro Cadilha, B., Markota, A., Voigt, C., Huang, Z., . . . Wang, H. (2019). Epithelial-type systemic breast carcinoma cells with a restricted mesenchymal transition are a major source of metastasis. *Science Advances*, 5, eaav4275. doi: 10.1126/sciadv.aav4275
- Macario, A., Lange, M., Ahring, B., & Macario, E. (2000). Stress Genes and Proteins in the Archaea. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63, 923-967, table of contents. doi: 10.1128/mubr.63.4.923-967.1999
- Massey, A., Williamson, D., Browne, H., Murray, J., Dokurno, P., Shaw, T., . . . Wood, M. (2009). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66, 535-545. doi: 10.1007/s00280-009-1194-3
- Massey, A. J., Williamson, D. S., Browne, H., Murray, J. B., Dokurno, P., Shaw, T., . . . Wood, M. (2010). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 66(3), 535-545.
- Mayer, M. (2005). Recruitment of Hsp70 chaperones: A crucial part of viral survival strategies. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 153, 1-46. doi: 10.1007/s10254-004-0025-5
- Medinas, D. B., Valenzuela, V., & Hetz, C. (2017). Proteostasis disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 26(R2), R91-R104. doi: 10.1093/hmg/ddx274
- Milani, V., Stangl, S., Issels, R., Gehrmann, M., Wagner, B., Hube, K., . . . Multhoff, G. (2009). Anti-tumor activity of patient-derived NK cells after cell-based immunotherapy--a case report. *Journal of translational medicine*, 7, 50-50. doi: 10.1186/1479-5876-7-50
- Miyata, Y., Li, X., Lee, H. F., Jinwal, U. K., Srinivasan, S. R., Seguin, S. P., . . . Gestwicki, J. E. (2013). Synthesis and initial evaluation of YM-08, a blood-brain barrier permeable derivative of the heat shock protein 70 (Hsp70) inhibitor MKT-077, which reduces tau levels. *ACS Chem Neurosci*, 4(6), 930-939. doi: 10.1021/cn300210g
- Miyata, Y., Rauch, J. N., Jinwal, U. K., Thompson, A. D., Srinivasan, S., Dickey, C. A., & Gestwicki, J. E. (2012). Cysteine reactivity distinguishes redox sensing by the heat-inducible and constitutive forms of heat shock protein 70. *Chem Biol*, 19(11), 1391-1399.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Kido, S., Shimonishi, T., Matsuyama, S., Kitahara, K., & Miyazaki, K. (2005). Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, 92(2), 252-258. doi: 10.1038/sj.bjc.6602266
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y., & Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *British journal of cancer*, 90(6), 1265-1273. doi: 10.1038/sj.bjc.6601685
- Morandi, A., Taddei, M., Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2017). Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Frontiers in Oncology*, 7. doi: 10.3389/fonc.2017.00040

- Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., & Behl, C. (2012). Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, *46*(1), 41-54. doi: 10.1007/s12035-012-8246-0
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W., & Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer*, *61*(2), 272-279. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910610222>
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, *34*(6), 1181-1188. doi: 10.1093/carcin/bgt111
- Nalla, A. K., Estes, N., Patel, J., & Rao, J. S. (2011). N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Experimental Cell Research*, *317*(17), 2512-2521. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.024>
- Njemini, R., Bautmans, I., Onyema, O. O., Van Puyvelde, K., Demanet, C., & Mets, T. (2011). Circulating heat shock protein 70 in health, aging and disease. *BMC immunology*, *12*, 24-24. doi: 10.1186/1471-2172-12-24
- Norton, J., Ham, C., Dam, J., Jeffrey, R., Longacre, T., Huntsman, D., . . . Ford, J. (2007). CDH1 Truncating Mutations in the E-Cadherin Gene. *Annals of surgery*, *245*, 873-879. doi: 10.1097/01.sla.0000254370.29893.e4
- Nover, L., & Miernyk, J. A. (2001). A genomics approach to the chaperone network of Arabidopsis thaliana. *Cell stress & chaperones*, *6*(3), 175-176. doi: 10.1379/1466-1268(2001)006<0175:agattc>2.0.co;2
- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., . . . Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of hematology & oncology*, *10*(1), 101-101. doi: 10.1186/s13045-017-0471-6
- Park, S. L., Chung, T.-W., Kim, S., Hwang, B., Kim, J. M., Lee, H. M., . . . Moon, S.-K. (2017). HSP70-1 is required for interleukin-5-induced angiogenic responses through eNOS pathway. *Scientific Reports*, *7*, 44687-44687. doi: 10.1038/srep44687
- Paul, A. S., & Pollard, T. D. (2009). Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell motility and the cytoskeleton*, *66*(8), 606-617. doi: 10.1002/cm.20379
- Pfister, K., Radons, J., PhD, R., Tidball, J., Pfeifer, M., Freitag, L., . . . Multhoff, G. (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype. *Cancer*, *110*, 926-935. doi: 10.1002/cncr.22864
- Plowman, J., Harrison, S. D., Jr., Trader, M. W., Griswold, D. P., Jr., Chadwick, M., McComish, M. F., . . . Zaharko, D. (1987). Preclinical antitumor activity and pharmacological properties of deoxyspergualin. *Cancer research*, *47*(3), 685-689.
- Ponomarenko, M., Stepanenko, I., & Kolchanov, N. (2013). Heat Shock Proteins. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 402-405). San Diego: Academic Press.
- Propper, D. J., Braybrooke, J. P., Taylor, D. J., Lodi, R., Styles, P., Cramer, J. A., . . . Harris, A. L. (1999). Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT077 in chemo-resistant solid tumours. *Ann Oncol*, *10*(8), 923-927.
- Qian, X., Anzovino, A., Kim, S., Suyama, K., Yao, J., Hulit, J., . . . Hazan, R. B. (2014). N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene*, *33*(26), 3411-3421. doi: 10.1038/onc.2013.310

- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell stress & chaperones*, 21(3), 379-404. doi: 10.1007/s12192-016-0676-6
- Rodina, A., Patel, P. D., Kang, Y., Patel, Y., Baaklini, I., Wong, M. J., . . . Chiosis, G. (2013). Identification of an allosteric pocket on human hsp70 reveals a mode of inhibition of this therapeutically important protein. *Chem Biol*, 20(12), 1469-1480.
- Rousaki, A., Miyata, Y., Jinwal, U. K., Dickey, C. A., Gestwicki, J. E., & Zuiderweg, E. R. (2011). Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones. *J Mol Biol*, 411(3), 614-632.
- Schmitt, E., Maingret, L., Puig, P. E., Rerole, A. L., Ghiringhelli, F., Hammann, A., . . . Garrido, C. (2006). Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer research*, 66(8), 4191-4197.
- Shapiro, L., & Weis, W. I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(3), a003053-a003053. doi: 10.1101/cshperspect.a003053
- Sharma, K. K., Rico, J. F., Becker, M. W., Roboz, G. J., Chiosis, G., & Guzman, M. L. (2012). HSP70 Inhibitor, YK5, Synergizes with Chemotherapeutic Agents and Prevents Chemoresistance in Acute Myelogenous Leukemia (AML). *Blood*, 120(21), 2476-2476. doi: 10.1182/blood.V120.21.2476.2476
- Sherman, M. Y., & Gabai, V. L. (2015). Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene*, 34(32), 4153-4161. doi: 10.1038/onc.2014.349
- Sistigu, A., Modugno, F., Manic, G., & Nistico, P. (2017). Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 36. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.05.008
- Specht, H. M., Ahrens, N., Blankenstein, C., Duell, T., Fietkau, R., Gaipf, U. S., . . . Multhoff, G. (2015). Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Peptide Activated Natural Killer (NK) Cells for the Treatment of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) after Radiochemotherapy (RCTx) - From Preclinical Studies to a Clinical Phase II Trial. *Frontiers in Immunology*, 6, 162-162. doi: 10.3389/fimmu.2015.00162
- Stangl, S., Gehrman, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., . . . Multhoff, G. (2011). Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 733-738.
- Staniek, J., Lorenzetti, R., Heller, B., Janowska, I., Schneider, P., Unger, S., . . . Rizzi, M. (2019). TRAIL-R1 and TRAIL-R2 Mediate TRAIL-Dependent Apoptosis in Activated Primary Human B LymphocytesData_Sheet_1.pdf. *Frontiers in Immunology*, 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00951
- Steele, A., Prentice, A., Hoffbrand, A., Yogashangary, B., Hart, S., Lowdell, M., . . . Wickremasinghe, R. (2009). 2-Phenylacetylenesulfonamide (PAS) induces p53-independent apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*, 114, 1217-1225. doi: 10.1182/blood-2008-11-190587
- Suryawanshi, A., Tadagavadi, R. K., Swafford, D., & Manicassamy, S. (2016). Modulation of Inflammatory Responses by Wnt/ β -Catenin Signaling in Dendritic Cells: A Novel Immunotherapy Target for Autoimmunity and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 7(460). doi: 10.3389/fimmu.2016.00460

- Teng, Y., Ngoka, L., Mei, Y., Lesoon, L., & Cowell, J. (2012). HSP90 and HSP70 Proteins Are Essential for Stabilization and Activation of WASF3 Metastasis-promoting Protein. *The Journal of biological chemistry*, *287*, 10051-10059. doi: 10.1074/jbc.M111.335000
- Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., . . . Zheng, G. (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2011*, 567305-567305. doi: 10.1155/2011/567305
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., . . . Davis, R. J. (2000). Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. *Science*, *288*(5467), 870-874. doi: 10.1126/science.288.5467.870
- Trimble, C. L., Peng, S., Kos, F., Gravitt, P., Viscidi, R., Sugar, E., . . . Wu, T. C. (2009). A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(1), 361-367. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1725
- Uversky, V. (2014). *Fundamentals of Protein Folding* (pp. 1-61).
- Van Molle, W., Wielockx, B., Mahieu, T., Takada, M., Taniguchi, T., Sekikawa, K., & Libert, C. (2002). HSP70 Protects against TNF-Induced Lethal Inflammatory Shock. *Immunity*, *16*(5), 685-695. doi: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00310-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00310-2)
- Wang, H., Bu, L., Wang, C., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, X., . . . Sun, X. (2018). The Hsp70 inhibitor 2-phenylethanesulfonamide inhibits replication and carcinogenicity of Epstein-Barr virus by inhibiting the molecular chaperone function of Hsp70. *Cell Death & Disease*, *9*, 734. doi: 10.1038/s41419-018-0779-3
- Weng, D., Calderwood, S. K., & Gong, J. (2011). Preparation of a heat-shock protein 70-based vaccine from DC-tumor fusion cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *787*, 255-265. doi: 10.1007/978-1-61779-295-3_19
- Williamson, D., Borgognoni, J., Clay, A., Daniels, Z., Dokurno, P., Drysdale, M., . . . Massey, A. (2009). Novel Adenosine-Derived Inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, Discovered Through Structure-Based Design. *Journal of medicinal chemistry*, *52*, 1510-1513. doi: 10.1021/jm801627a
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J. D., Zheng, J. J., Moon, R. T., & Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure (London, England : 1993)*, *16*(3), 478-487. doi: 10.1016/j.str.2007.12.021
- Yang, X., & Tohda, C. (2018). Heat Shock Cognate 70 Inhibitor, VER-155008, Reduces Memory Deficits and Axonal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. doi: 10.3389/fphar.2018.00048
- Zorzi, E., & Bonvini, P. (2011). Inducible hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers*, *3*(4), 3921-3956. doi: 10.3390/cancers3043921
- Zuppinger, C., Eppenberger-Eberhardt, M., & Eppenberger, H. M. (2000). N-Cadherin: Structure, Function and Importance in the Formation of New Intercalated Disc-Like Cell Contacts in Cardiomyocytes. *Heart Failure Reviews*, *5*(3), 251-257. doi: 10.1023/a:1009809520194