

**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI**

Anna Zebzda

**WPŁYW CZYNNIKA WZROSTU HEPATOCYTÓW
I KOMÓREK PODŚCIELISKA SZPIKU KOSTNEGO
NA BIOLOGIĘ SZPICZAKA MNOGIEGO W MODELU
EKSPERYMENTALNYM**

Praca doktorska

PROMOTOR:

Dr hab. Marcin Majka

Pracę wykonano w Zakładzie Transplantologii
Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kierownik Zakładu: dr hab. Marcin Majka

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Marek Zembala

Kraków, 2010

Badania prezentowane w rozprawie dotyczące mikrośrodowiska szpiku kostnego w szpiczaku mnogim były finansowane w ramach projektu promotorskiego 1139/B/P01/2007/33

W okresie od września do grudnia 2008 przebywałam na stypendium zagranicznym w Vrije Universiteit Brussel współfinansowanym przez Fundację Florentyny Kogutowskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Rząd Flamandzki

W roku akademickim 2008/2009 otrzymywałam stypendium Miasta Krakowa oraz Małopolskie Stypendium Doktoranckie

*Serdeczne podziękowania składam
Mojemu promotorowi, Dr hab. Marcinowi Majce,
Za opiekę naukową, pomoc i cierpliwość
Podczas przygotowywania niniejszej pracy.*

*Dziękuję również dr Arturowi Jurczyszynowi
Za współpracę i pomoc w pozyskiwaniu
Materiału klinicznego*

*Pragnę podziękować
Koleżankom i kolegom
Z Zakładu Transplantologii,
Szczególnie Sylwii i Ani
Za pomoc w wykonywaniu doświadczeń
Oraz przyjazną atmosferę.*

*Jestem bardzo wdzięczna Rodzicom i Radkowi
Za wsparcie i wiarę w moje możliwości.*

1 SPIS TREŚCI

1	SPIS TREŚCI.....	1
2	WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW	4
3	STRESZCZENIE	6
4	WSTĘP.....	8
4.1	Szpiczak mnogi.....	8
4.1.1	Obraz kliniczny.....	8
4.1.2	Etiopatogeneza szpiczaka mnogiego	9
4.1.3	Patomorfologia szpiczaka mnogiego	10
4.1.4	Leczenie szpiczaka mnogiego i rokowanie	12
4.1.5	Nowe metody leczenia i perspektywy ich rozwoju	12
4.2	Oś HGF-MET	14
4.2.1	MET	14
4.2.2	Czynnik wzrostu hepatocytów	15
4.2.3	Rola osi HGF-MET w komórkach prawidłowych.....	16
4.2.4	Rola osi HGF-MET w komórkach nowotworowych.....	16
4.2.4.1	Rola osi HGF-MET w komórkach szpiczakowych	17
4.2.5	Inhibitory osi HGF-MET	18
4.3	Białka szoku cieplnego 90.....	20
4.3.1	Rola HSP90 w komórkach prawidłowych.....	20
4.3.2	Rola HSP90 w komórkach nowotworowych.....	21
4.3.3	Inhibitory HSP90	22
4.3.3.1	Geldanamycyna	22
4.4	Mikrośrodowisko szpiku kostnego	24
4.4.1	Mezenchymalne komórki macierzyste	24
4.4.2	Rola mikrośrodowiska w szpiczaku	25
4.4.3	Osteogeneza	26
4.4.4	Osteoklastogeneza	26
4.4.4.1	Zaburzenia osteoblastogenezy	28
4.4.5	Mikrofragmenty	29
5	CELE PRACY	32
6	MATERIAŁY I METODY	33
6.1	Hodowle komórkowe	33
6.1.1	Hodowla szpiczakowych linii komórkowych.....	33
6.1.2	Materiał kliniczny	33
6.1.2.1	Izolacja i hodowla pierwotnych komórek szpiczakowych	34
6.1.2.2	Izolacja i hodowla komórek prawidłowych.....	34

6.2	Transfekcja komórek	35
6.3	Uzyskanie linii komórkowych pozbawionych receptora MET	35
6.4	Ocena wyciszenia receptora MET w modelu mysim	35
6.5	Geldanamycyny	36
6.6	Ocena proliferacji/przeżywalności za pomocą testu MTS	37
6.7	Wykrywanie apoptozy	37
6.8	Analiza cyklu komórkowego	38
6.9	Ocena ekspresji białek	38
6.9.1	Oznaczenie stężenia białka	38
6.9.2	Ocena ekspresji białek metodą Western Blot	39
6.9.3	Immunohistochemiczna detekcja białek w preparatach histologicznych	40
6.9.4	Barwienie immunohistochemiczne komórek ustalonych linii szpiczakowych	40
6.10	Indukcja i ocena różnicowania MSC w osteoblasty	40
6.11	Analiza fenotypu MSC – cytometria przepływowa	41
6.12	Izolacja mikrofragmentów błonowych	41
6.13	Ocena ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym	41
6.13.1	Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji	41
6.13.2	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	42
6.14	Analiza statystyczna	43
7	WYNIKI	44
7.1	Rola osi HGF-MET w komórkach szpiczakowych	44
7.1.1	Obecność mRNA dla MET w komórkach linii MM	44
7.1.1.1	Obecność receptora MET na powierzchni komórek linii MM	44
7.1.2	Izolacja komórek posiadających na powierzchni receptor CD138+	45
7.1.3	Obecność mRNA dla MET w komórkach pacjentów MM	46
7.1.3.1	Obecność receptora MET na komórkach pacjentów MM	47
7.1.4	Wykorzystanie interferencji RNA do blokowania osi HGF-MET w komórkach MM	49
7.1.4.1	Charakterystyka linii MM z receptorem MET i pozbawionych tego receptora	49
7.1.4.2	Zablokowanie osi HGF-MET nie wpływa na wzrost komórek U266 i INA6	50
7.1.4.3	Zablokowanie osi HGF-MET zwiększa przeżycie myszy NOD-SCID	51
7.2	Wpływ GA na wzrost komórek	52
7.2.1	GA i jej pochodne hamują wzrost komórek linii szpiczakowych	52
7.2.1.1	GA i jej pochodne wywołują apoptozę komórek szpiczakowych	55

7.2.1.2 GA i jej pochodne wywołują apoptozę komórek szpiczakowych pochodzących od pacjentów	57
7.2.1.3 GA i jej pochodne obniżają ekspresję białka AKT.....	58
7.2.1.4 GA i jej pochodne powodują blokadę cyklu komórkowego komórek szpiczakowych	59
7.2.1.5 Ekspresja HSP90 w komórkach MM jest wyższa niż w komórkach prawidłowych.....	60
7.2.2 GA i jej pochodne zmniejszają ekspresję receptora MET w komórkach MM61	
7.3 Wpływ mikrośrodowiska szpiku kostnego na rozwój szpiczaka mnogiego 61	
7.3.1 Charakterystyka komórek MSCs	62
7.3.1.1 Analiza fenotypowa komórek MSCs	62
7.3.1.2 Analiza genotypu	63
7.3.2 Charakterystyka mikrofragmentów błonowych.....	65
7.3.2.1 Wpływ stymulacji komórek MSCs przez mikrofragmeny błonowe na różnicę w ekspresji genów	65
7.3.3 Różnicowanie MSC w obecności lub braku obecności mikrofragmentów błonowych.....	67
8 DYSKUSJA	70
8.1 Komórki linii szpiczakowych i wyizolowane od pacjentów chorych na MM wykazują ekspresję MET na poziomie mRNA i białka.....	70
8.2 Interferencja RNA pozwala na skuteczne zablokowanie osi HGF-MET	70
8.3 Geldanamycyna hamuje wzrost komórek MM.....	72
8.4 Pochodne geldanamycyny wpływają w podobny sposób na komórki szpiczakowe jak GA.....	74
8.5 Rola mikrośrodowiska.....	76
9 WNIOSKI.....	81
10 LITERATURA.....	82

2 WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

ADP - adenozynodwufosforan

ATP - adenozynotrójfosforan

ATPaza - adenozynotrifosfataza

BSA - albumina surowicy wołowej

BSA - albumina bydlęca

DMEM - medium hodowlane Dulbecco

DMSO - dimetylosulfotlenek

DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

FBS - wołowa surowica płodowa

GA - geldanamycyna

hGAPDH - ludzka dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

mGAPDH - mysia dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

HGF - czynnik wzrostu hepatocytów

HIF-1 - czynnik-1 indukowany przez niedotlenienie

HRP - peroksydaza chrzanowa

Hsp-90 - białko szoku cieplnego-90

HSP - białko szoku cieplnego

IL - interleukina

MAPK - kinazy białkowe aktywowane miogenami

MM – szpiczak mnogi

MMP-1 - metaloproteinaza-1 macierzy

MMP-9 - metaloproteinaza-9 macierzy

MSC - komórki mezenchymalne

MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5- difenylotetrazolowy

NOD-SCID myszy - myszy cukrzycowe bez objawów otyłości z wrodzonym defektem odporności typu komórkowego

PARP - syntaza poli-ADP-rybozy

PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

PE - fikoerytryna

PI - jodek propidyny

RNAi - interferencja RNA

RNA - kwas rybonukleinowy

RT-PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

SDF-1 - czynnik-1 pochodzenia stromalnego

SDS - siarczan dodecyłu sodu

shLacZ - krótkie interferujące RNA o strukturze spinki skierowane przeciw sekwencji LacZ

shMET - krótkie interferujące RNA o strukturze spinki skierowana przeciw sekwencji MET

shRNA - krótkie interferujące RNA o strukturze spinki

siMET - krótkie interferujące RNA skierowane przeciw sekwencji MET

siRNA - krótkie interferujące RNA

TEMED - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu-beta

TNF - czynnik martwicy nowotworów

TIMP2 - inhibitor metaloproteinazy-2

VEGF czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

WT - typ dziki

3 STRESZCZENIE

Szpiczak mnogi (ang. *Multiple Myeloma*; MM) jest nowotworem hematologicznym dotykającym aktualnie około 10 000 osób w Polsce. Długość życia chorych na MM zwiększyła się w ciągu ostatnich dziesięcioleci dzięki wprowadzeniu najnowszych leków takich jak talidomid, bortezomib czy lenalidomid oraz zastosowaniu auto-przeszczepienia szpiku kostnego. Jednak wciąż nie ma skutecznego sposobu leczenia tej choroby.

W pierwszej części niniejszej pracy dokonano oceny przydatności potencjalnej terapii MM, polegającej na zablokowaniu ekspresji receptora MET na komórkach szpiczaka, odpowiedzialnego za procesy nowotworzenia, przy użyciu siRNA. W kolejnym etapie wykorzystano inhibitory białka szoku cieplnego 90 - geldanamycyny i jej pochodne, blokujące różne etapy wielu szlaków komórkowych biorących udział w rozwoju nowotworu.

Zbadano wpływ obniżenia ekspresji receptora MET na ogólną charakterystykę komórek szpiczakowych oraz przeżywalność myszy NOD-SCID. Dokonano również analizy wpływu geldanamycyny i jej pochodnych na wzrost komórek szpiczakowych. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że ustalone szpiczakowe linie komórkowe oraz materiał kliniczny wykazują obecność receptora MET na poziomie mRNA i białka. Zablokowanie receptora MET prowadziło do zwiększenia przeżycia myszy, natomiast użycie GA i analogów powodowało indukcję apoptozy i zahamowanie cyklu komórkowego oraz obniżenie ekspresji MET.

W drugiej części pracy dokonano analizy mikrośrodowiska szpiku kostnego zdrowych dawców i pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells*; MSC). Uzyskane wyniki wykazały różnicę zarówno w ekspresji antygenów powierzchniowych oraz wybranych do oceny genów. Wykonano również badania dotyczące roli szpiczakowych mikrofragmentów błonowych (MM-MFB). Potwierdzono obecność białka Dickkopf-1 (DKK-1) - inhibitora szlaku Wnt w liażatach MM-MFB. Przedstawiono także wpływ obecności MM-MFB na komórki MSC poprzez wykazanie różnic w ekspresji genów związanych z angiogenezą oraz zaburzenia w osteoróżnicowaniu po stymulacji MM-MFB.

Zaproponowana strategia wydaje się być interesująca w kontekście poszukiwania nowych terapii MM.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a haematological malignancy which is currently diagnosed in 10 000 patients in Poland. The patients lifespan has increased over the past decade due to implementation the new drugs like thalidomide, bortezomib and lenalidomide and also autologus bone marrow transplantation. Although there are no effective treatments for complete recovery from this disease available so far.

Major goal of the first part of this study was to evaluate a new treatment strategy for MM, based on blocking the expression of MET receptor, which is responsible for neoplastic process, by siRNA. In next step we used geldanamycines and its analogues to inhibit the heat shock proteins 90 which are targeting in many different cellular pathways which are taking part in tumour development.

We investigated the influence of reduction expression of MET receptor for general characteristic of multiple myeloma cells and survival of NOD-SCID mice. We also examined the effect of geldanamycin and its analogs on multiple myeloma cell growth. Our results showed that MM cell lines expressed MET receptor at mRNA and protein level. Blocking MET receptor increased mice survival, whereas geldanamycines and analogs induced apoptosis, inhibited cell cycle and downregulated MET expression.

In second part of this thesis we analysed microenviroment of bone marrow from healthy donors and patients with multiple myeloma. In our study we used mesenchymal stem cells (MSC). The results showed differences in expression of surface antigens and tested genes. Wealso investigated a role of multiple myeloma microvesicles (MM-MFB) on MSC . We confirmed presence of Dikkopf-1 protein, an inhibitor of Wnt pathway, in the MM-MFB. We also presented the influence of MM-MFB on MSC leading to differences in gene expression linked to angiogenesis and imbalance in osteodifferentiation.

Proposed strategy is very interesting in context of finding new therapies of MM.

4 WSTĘP

4.1 Szpiczak mnogi

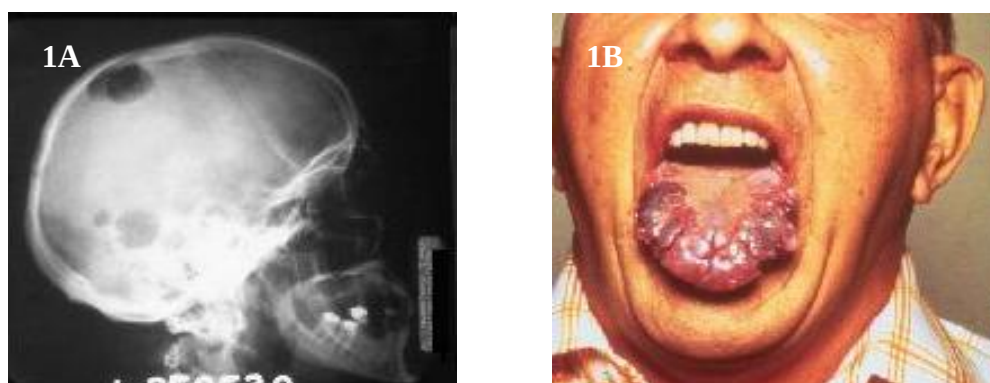
Szpiczak mnogi (łac. *Myeloma plasmocyticum*, ang. *Multiple Myeloma*; MM) jest wieloogniskowym rozrostem komórek plazmatycznych. Sporadycznie może występować w postaci pojedynczych guzów, złożonych z nowotworowych plazmocytów zwanych wówczas *myeloma solitera*. Rozwój choroby jest wieloetapowy [22]. Wśród wszystkich nowotworów złośliwych zapadalność na MM wynosi 1-2%, co stanowi ok. 15 % nowotworów pochodzenia krwiotwórczego [122]. Ryzyko zachorowania wzrasta z wiekiem, a szczyt przypada na siódmą dekadę życia. Nowotwór ten nie jest spotykany u dzieci i młodzieży. Nieco częściej chorują mężczyźni oraz przedstawiciele rasy czarnej [55,77]. Szacuje się, że zachorowalność na szpiczaka wynosi 4 na 100 000 osób [44].

4.1.1 Obraz kliniczny

Początki choroby są zwykle mało charakterystyczne. Pacjenci skarżą się na osłabienie, zmniejszoną sprawność fizyczną, uporczywe bóle kostne, skłonność do infekcji i stopniowo postępującą utratę masy ciała. W badaniach laboratoryjnych zazwyczaj stwierdzany jest białkomocz i podwyższone, dwu lub trójcyfrowe OB o małej amplitudzie między pierwszą a drugą godziną. Wysokie stężenie monoklonalnego białka M w surowicy krwi wiąże się z wystąpieniem tzw. zespołu nadlepkoci. Charakteryzuje się on niewydolnością nerek (tzw. "nerka szpiczakowa"), zaburzeniami widzenia spowodowanymi zmianami naczyniowymi na dnie oczu (łac. *fundus paraproteinaemicus*), rozsianymi mikrozakrzepami w drobnych naczyniach mózgowych, a nawet w krańcowych przypadkach śpiączką paraproteinemiczną (łac. *coma paraproteinaemica*) [64].

Do najbardziej charakterystycznych objawów szpiczaka należą wyraźnie odgraniczone ogniska osteolityczne w kościach (Ryc. 1 A), którym towarzyszą bóle i złamania patologiczne, niewydolność nerek, anemia i skłonność do zakażeń [77, 133]. Rzadziej występujące objawy to: wzrost poziomu wapnia we krwi (hyperkalcemia),

zaburzenia krzepnięcia krwi (skaza krwotoczna lub nadkrzepliwość), czy odkładanie się amyloidu (Ryc. 1 B) [134].



Rycina 1 A- Ogniska osteolityczne w kości czaszki, B- Zmiany spowodowane odkładaniem amyloidu. Z materiałów udostępnionych przez American Society of Hematology 2002.

Typowe objawy wynikają ze zdolności komórek szpiczakowych do produkcji oraz wydzielania monoklonalnych immunoglobulin lub wyłącznie ich lekkich łańcuchów. Większość (około 55%) szpiczaków produkuje immunoglobiny typu IgG, a około 20% z nich IgA. Podobnie często generowane są wyłącznie łańcuchy lekkie, w pozostałych przypadkach produkowane są monoklonalne IgM, IgD, IgE, immunoglobiny biklonalne lub są to szpiczaki niesekrecyjne [22]. Aktywny szpiczak wykazuje w obrazie klinicznym takie cechy jak: anemia, uszkodzenie nerek, destrukcja kości czy hiperkalcemia [40].

4.1.2 Etiopatogeneza szpiczaka mnogiego

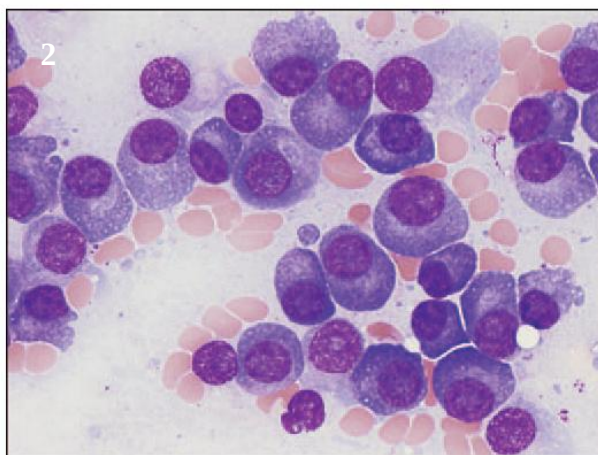
Etiologia szpiczaka nie jest znana. U niewielkiej części pacjentów rozwija się on na podłożu tzw. gammapatii monoklonalnej nieokreślonego znaczenia (ang. *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*; MGUS), w której klon komórek limfocytarnych typu B produkujący białko monoklonalne nie ma właściwości nowotworowych [22]. Inną opisaną formą tego nowotworu jest tzw. „tłący się szpiczak” (ang. *Smoldering Multiple Myeloma*; SMM). SMM uważany jest również za asymptomatycznego szpiczaka. SMM wykazuje wzmożoną proliferację komórek plazmatycznych, których stosunek występowania jest większy niż w przypadku MGUS, ale nadal nie utrudnia normalnych funkcji fizjologicznych organizmu. SMM

charakteryzuje się również bardzo powolną proliferacją i relatywną stabilizacją w czasie [40].

U około 65% chorych stwierdza się anomalie chromosomowe [2, 9]. Genetyczne podłoże szpiczaka może być bardzo złożone wśród pacjentów, jednakże wiele wspólnych cech zostało już opisanych. Najczęstszą są zmiany chromosomowe zapoczątkowane translokacją w genie IgH oraz IgL. Translokacja IgH występuje w około 50% MGUS i SMM, prawie 80% nowotworowych komórek pierwotnych PC i 90% szpiczakowych linii komórkowych. Na ogół monosomie dotyczą chromosomów 13, 14, 16 i 22, najczęściej spotykanymi są jednak trisomie, które dotyczą chromosomów: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 i 21. Delecje chromosomu 13 lub monosomie wydają się mieć duże znaczenie w patogenezie MM. Zmiany cytogenetyczne t(4;14) t(4;16)-17p13 determinują kwalifikację pacjentów w najwyższej grupie ryzyka z całkowitym przeżyciem ok. 25 miesięcy, natomiast 13q14 w grupie pośredniej z całkowitym przeżyciem ok. 42 miesięcy [39]. Do czynników genetycznych niekorzystnych w rokowaniach, wpływających na rozwój nowotworu należą onkogeny z takich rodzin jak: *Ras*, *PTEN*, *c-Myc*, *p53* czy białka supresorowego *Rb* [40, 50].

4.1.3 Patomorfologia szpiczaka mnogiego

Szpiczakowe plazmocyty zarówno pod względem morfologicznym jak i immunologicznym są bardzo podobne do komórek prawidłowych. Posiadają małą aktywność proliferacyjną oraz zmniejszoną wrażliwość na bodźce proapoptotyczne. W większości przypadków komórki szpiczaka stanowią 5-30% ogółu jądrzastych komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym, tworząc zarówno skupiska nieposiadające bezpośredniego kontaktu z naczyniami, jak i występujące pojedynczo komórki wśród pozostałych komórek krwiotwórczych (Ryc. 2) [20]. W około 1/3 przypadków dochodzi do włóknienia szpiku, co związane jest z gorszą prognozą. Szpiczak stosunkowo rzadko zajmuje narządy pozaszpikowe. W około 2% przypadków występuje tzw. białaczka plazmatycznokomórkowa (bezwzględna plazmocytoza we krwi obwodowej $>2.0 \times 10^9/L$ lub odsetek plazmocytów $> 20\%$ leukocytów krwi) [22].



Rycina 2. Rozmaz aspiratu szpiku kostnego u pacjenta ze szpiczakiem mnogim. Z pracy Singhal, S.i Mehta, J. [132]

W badaniach immunohistochemicznych komórki MM nie wykazują ekspresji wspólnego antygeny leukocytarnego (LCA, CD45) oraz wielu markerów typowych dla limfocytów B (CD19, CD20, CD22) z wyjątkiem CD79a. [22].

Badania nad szpiczakiem mnogim wymagają izolacji komórek w ramach układu krwiotwórczego, jakimi jest subpopulacja CD138 ograniczona głównie do późnych etapów różnicowania komórek B. Antygen ten zazwyczaj ulega silnej ekspresji w prawidłowych i zmienionych nowotworowo komórkach plazmatycznych [43, 127] oraz komórkach limfoplazmocytoidalnych [43]. W dojrzałej tkance CD138 ulega ekspresji w nabłonku prostym i przejściowym, fibroblastach, przejściowych keratynocytach i komórkach śródbłonna [156]. CD138 (Syndekan -1) należy do rodziny proteoglikanów, a jego ligandami są fibronektyna i kolagen. Syndekan-1 odgrywa nadzwyczaj istotną rolę w zasiedlaniu i utrzymaniu proliferacji w szpiku, pośrednicząc w adhezji do różnych białek przestrzeni pozakomórkowej i regulacji niektórych czynników wzrostu guza [112]. Wewnątrzkomórkowa część CD138 łączy cytoszkielet z elementami komórkowymi [156], a zewnątrzkomórkowa część cząsteczki wiąże ligandy. Ekspresja CD138 ulega zmniejszeniu w procesie zezłośliwiania różnych nabłonków [62], a antygen ulega gwałtownemu zrzuceniu przez komórki szpiczaka wchodzące w apoptozę, co czyni z CD138 marker żywotnych komórek szpiczaka [156, 70].

4.1.4 Leczenie szpiczaka mnogiego i rokowanie

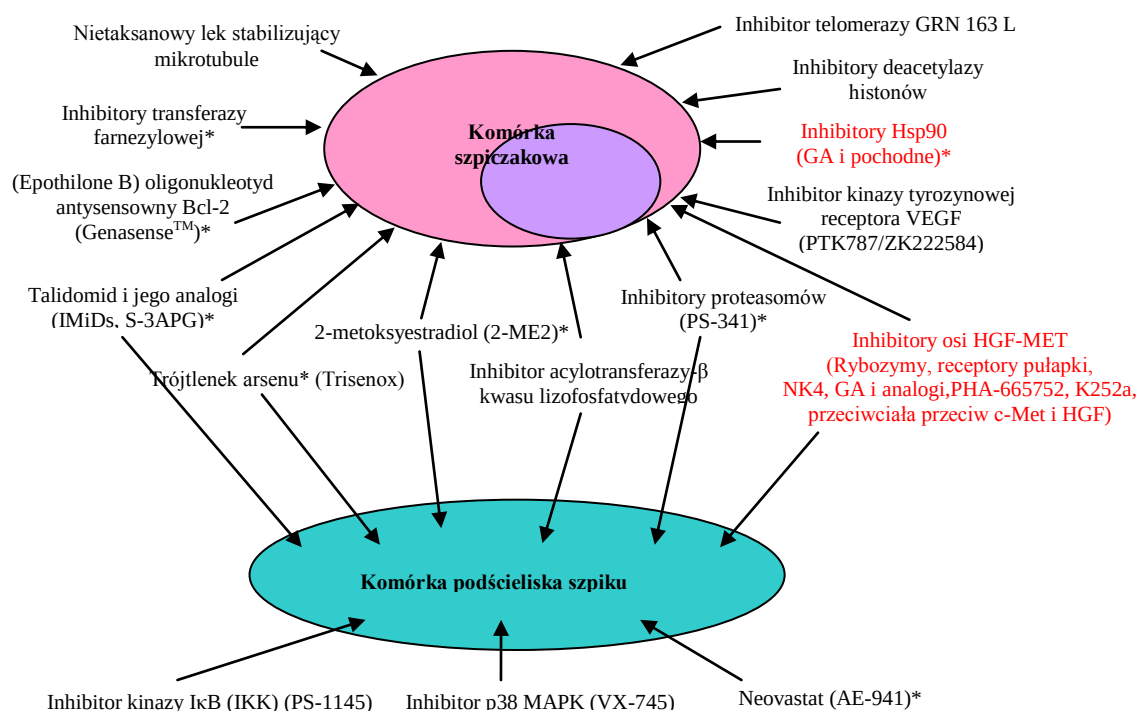
Pacjenci chorzy na MGUS i SMM oprócz regularnych kontroli nie są poddawani żadnym standardowym terapiom celowanym, z wyjątkiem zaawansowanych postaci SMM. Dla pacjentów wykazujących objawy symptomatycznego szpiczaka średnia przeżycia to ok. 5 lat od daty diagnozy. Bez zastosowania terapii pacjenci przeżywają ok. 6 miesięcy, co może być przedłużone do 3 lat po zastosowaniu terapii melfalan-prednizolon. Leczenie z zastosowaniem wysokodawkowej chemioterapii (środki alkilujące, antracykliny i kortykosteroidy) i następującym po niej przeszczepieniem komórek macierzystych szpiku kostnego przedłuża medianę przeżycia do 5 lat [36].

Nowoczesne leki takie jak thalidomid, bortezomib i lenalidomid wzbudzają nadzieję na dalszy wzrost długości życia pacjentów chorych na szpiczaka [132]. Dane literaturowe z 2008 roku potwierdzają, iż pomimo znacznego postępu MM pozostaje w dalszym ciągu nieuleczalną chorobą rozrostową krwi, chociaż można ją coraz lepiej kontrolować. Wynika to, między innymi, z rozwoju oporności komórek nowotworowych na stosowane leczenie, które ma na celu niszczyć głównie komórki szybko dzielące się. Dzięki najnowszym metodom leczenia, w znaczący sposób zwiększyła się również średnia przeżycia, która aktualnie wynosi 6-7 lat, a dziesięć lat temu wynosiła 3-4 lata [117]. Jedno z najnowszych doniesień z 2009 roku sugeruje, iż zastosowanie podwójnych auto przeszczepów zwiększa całkowite przeżycie o kolejne lata [80].

4.1.5 Nowe metody leczenia i perspektywy ich rozwoju

W związku z brakiem możliwości wyleczenia przy użyciu klasycznych metod, podjęto próby zastosowania leków ukierunkowanych nie tylko na komórki MM, ale również inne składowe wpływające na interakcje z podścieliskiem szpiku kostnego (Ryc. 3) [42].

Celem nowych terapii szpiczaka są różne elementy wpływające na rozwój nowotworu. Zaliczane są do nich: czynniki promujące proliferację nowotworową czy wszczepianie się („*homing*”) komórek szpiczaka do szpiku, interakcję z białkami macierzy międzykomórkowej i adhezję do komórek podścieliska szpiku indukującą kaskadę substancji przekaźnikowych i cytokin (auto- i parakrynnych), które wpływają na progresję nowotworu [42].



* leki w fazie badań klinicznych

Rycina 3. Nowe strategie leczenia szpiczaka mnogiego

Lekami ukierunkowanymi zarówno na komórki szpiczaka, jak i ich interakcje z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego, są takie środki jak: talidomid i jego analogi (IMiDs, S-3APG), inhibitory proteasomów (PS-341), trójtlenek arsenu (Trisenox), 2-metoksyestradiol (2-ME2), które obecnie są w fazie badań klinicznych [71].

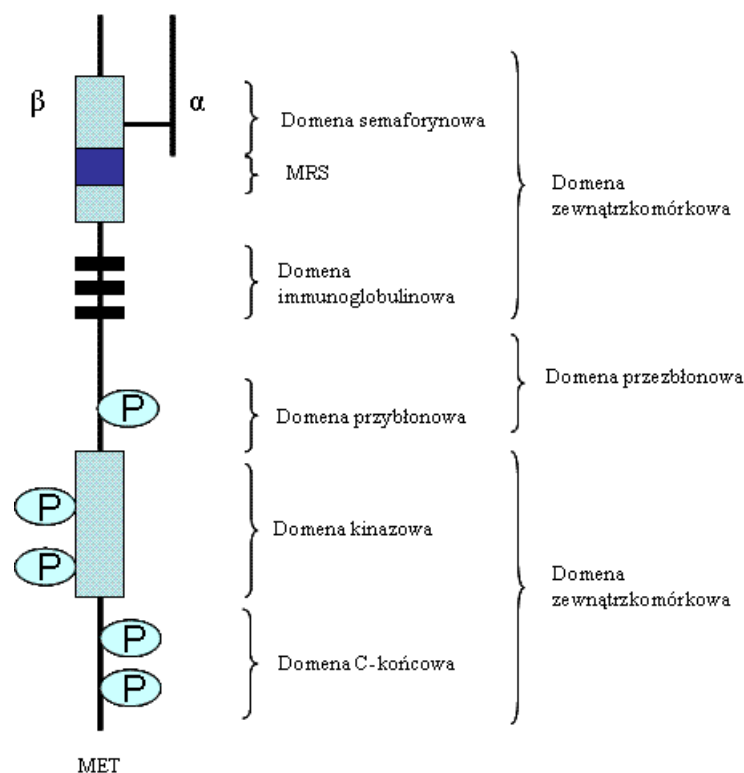
Talidomid i jego pochodne (Revimid) hamują wytwarzanie czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) oraz blokują angiogenezę przez inhibicję czynnika wzrostu fibroblastów-b (b-FGF) i/lub czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF) [96]. Leki te blokują cykl komórkowy w fazie G1 wzrostu lub indukują apoptozę MM. Ponadto, hamują one przyleganie komórek MM do podścieliska szpiku oraz wydzielanie przez komórki MM i komórki podścieliska cytokin stymulujących wzrost, przeżycie, oporność na leki i migrację komórek szpiczakowych.

Inhibitor proteasomów PS-341 jest nowym środkiem terapeutycznym prawdopodobnie zdolnym do pokonania oporności na leki w komórkach MM. Indukuje on apoptozę komórek MM poprzez hamowanie aktywacji NF- κ B, jak również reguluje ekspresję białek adhezyjnych na komórkach MM i podścieliska szpiku, blokując przyleganie komórek MM i wydzielanie cytokin w podścielisku szpiku. Jest także inhibitorem angiogenezy [97].

4.2 Oś HGF-MET

4.2.1 MET

MET jest przezbłonową glikoproteiną, o wielkości 190 kDa. Część zewnątrzkomórkowa zawiera domenę semaforynową, która jest odpowiedzialna za interakcje z ligandem oraz region bogaty w cysteinę. Część wewnątrzkomórkowa składa się z trzech domen: przybłonowej (funkcje regulatorowe), kinazowej oraz C-końcowej, zawierającej miejsca przyłączania białek sygnałowych i adaptorowych (Ryc. 4) [147].



Rycina 4. Schemat struktury receptora MET

MRS – sekwencja pokrewna do sekwencji MET (ang. *MET related sequence*) Opracowano na podstawie Trusolino i wsp.[147]

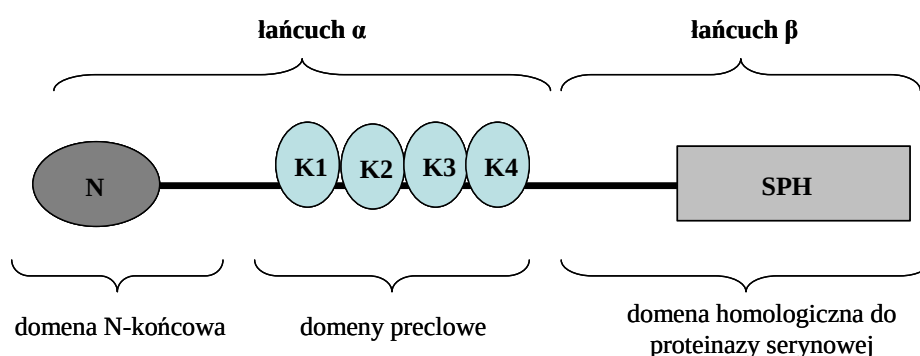
Fosforylacja reszt tyrozynowych C-końcowej części receptora MET następuje po związaniu z HGF oraz powoduje rekrutację białek adaptorowych i sygnałowych, a na dalszym etapie aktywację wielu szlaków przekazywania sygnału [113].

W warunkach patologicznych, dysregulacja sygnałowania poprzez receptor MET związana jest z gorszym rokowaniem. MET jest współodpowiedzialny za

przerzutowanie komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ich: i) migracji, ii) sekrecji enzymów proteolitycznych, iii) zdolności do przeżycia w naczyniach krwionośnych oraz iv) zdolności do zatrzymania ich w łożysku kapilarnym [14].

4.2.2 Czynniki wzrostu hepatocytów

Czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*; HGF) zwany również czynnikiem rozproszenia (ang. *Scatter Factor*; SF) jest naturalnym ligandem dla receptora MET. Zbudowany jest z dwóch łańcuchów: ciężkiej podjednostki α (ok. 60 kDa) i lekkiej β (ok. 30 kDa), które połączone są wiązaniem dwusiarczkowym (Ryc. 5).



Rycina 5. Schemat HGF

Opracowano na podstawie Trusolino i wsp. SPH (ang. *Serine Proteinase Homology* - SPH)[147]

HGF należy do rodziny białek plazminogenu. Członkowie tej rodziny charakteryzują się obecnością domeny proteiny serynowej, przynajmniej jednej domeny preclowej (ang. *kringle domain*) oraz części aktywnej. W przeciwieństwie do innych przedstawicieli rodziny plazminogenu, HGF nie posiada aktywności enzymatycznej. Zawiera on część N-kończową, 4 domeny preclowe (K1-K4) oraz domenę homologiczną do proteiny serynowej, ale nie posiadającą aktywności enzymatycznej [87, 147]. W warunkach fizjologicznych HGF może być produkowany przez szereg komórek, np. fibroblasty, komórki nabłonka i śródbłonka, komórki gromadzące tłuszcz w wątrobie oraz komórki podścieliska szpiku [152].

4.2.3 Rola osi HGF-MET w komórkach prawidłowych

HGF po związaniu do receptora MET powoduje jego fosforylację i przejściową aktywację kinazy tyrozynowej, a następnie aktywację kaskady przekazywania sygnału. Oś ta działa przez systemy białek adaptorowych i sygnałowych [56, 121]. Aktywacja receptora MET może odbywać się na drodze autokrynnej lub parakrynnej, może również zachodzić niezależnie od wiązania HGF, w wyniku jego zwiększonej ekspresji, mutacji lub spontanicznej dimeryzacji receptora.

Wśród wielu funkcji, jakie spełnia oś HGF-MET, należy wymienić jej udział w:

- Mitogenezie, wzroście, proliferacji i morfogenezie
- Embriogenezie [148]
- Procesie gojenia ran i regeneracji tkankowej [105]
- Promowaniu inwazyjności i przerzutowaniu komórek nowotworowych
- Formowaniu sieci tubulo-kształtnych, wzroście neuronów [121]
- Represji adhezji międzykomórkowej
- Migracji komórek mięśniowych, kontroli przemiany komórkowo-mezenchymalnej (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*; EMT),
- Hamowaniu apoptozy

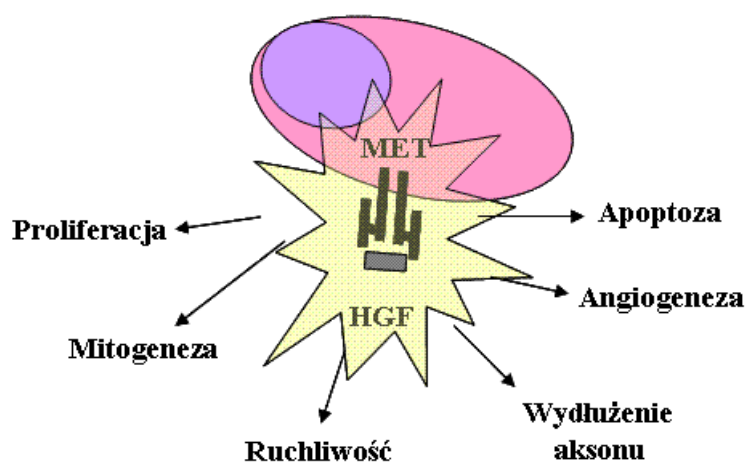
4.2.4 Rola osi HGF-MET w komórkach nowotworowych

W komórkach nowotworowych, MET może być aktywowany konstytutywnie bez przyłączenia HGF. Aktywacja osi HGF-MET następuje po stymulacji FGF, IL-1, lub TGF β [100], w warunkach indukcji onkogenami Ras, Ret, Ets lub pod wpływem hipoksji [63]. Szlak HGF-MET pełni funkcję proangiogenną, indukując produkcję IL-8 oraz VEGF [32,164]. Poprzez fosforylację kadheryn i ich degradację powoduje modyfikację połączeń międzykomórkowych [83,161]. Jednocześnie w komórkach nowotworowych, dzięki fosforylacji kinazy kontaktów zogniskowanych (ang. *Focal Adhesion Kinase*; FAK), promuje migrację [92], a w skutek aktywacji metaloproteinaz i aktywatora plazminogenu, przechodzenie przez ścianę naczynia [83]. Działanie antyapoptotyczne następuje poprzez aktywację kinaz AKT i MAP [158].

Nadekspresję lub nadmierną aktywację HGF-MET wykazano w nowotworach nabłonkowych i mezenchymalnych, takich jak: rak piersi, jajnika, przewodu pokarmowego, płuc i prostaty oraz glejakach, mięsakiach i szpiczaku mnogim [10].

4.2.4.1 Rola osi HGF-MET w komórkach szpiczakowych

Wśród wielu czynników aktywujących komórki szpiczakowe, jednym z ważniejszych jest HGF, który działając poprzez receptor MET stymuluje proliferację oraz hamuje apoptozę komórek MM [68]. Obecność receptora MET została potwierdzona w 100% komórek szpiczakowych, na poziomie mRNA i białka [14]. Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, iż komórki MM mogą również produkować HGF. Ponieważ HGF jest wydzielany także przez komórki podścieliska szpiku kostnego, możliwa jest zarówno auto jak i parakrynną stymulacja komórek nowotworowych. HGF stymuluje wydzielanie szeregu białek przez komórki szpiczakowe, w tym IL-11, która ma działanie osteolityczne [59]. W warunkach patologicznych dysregulacja sygnałowania poprzez receptor MET związana jest z gorszym rokowaniem. Rola MET w patogenezie szpiczaka została przedstawiona na rycinie nr 6.



Rycina 6. Rola MET w patogenezie szpiczaka

MET jest współodpowiedzialny za przerzutowanie komórek nowotworowych, poprzez zwiększenie ich: i) migracji, ii) sekrecji enzymów proteolitycznych, iii) zdolności do przeżycia w naczyniach krwionośnych oraz iv) zdolności do zatrzymania w łożysku kapilarnym [152]. Razem z innymi czynnikami motogennymi, w tym osi

SDF-1-CXCR4, bierze udział w zasiedlaniu odległych tkanek przez komórki nowotworowe i stymuluje ich wzrost w obcym dla nich mikrośrodowisku [42].

Doniesienia dotyczące roli osi HGF-MET zachęcają do badań nad wykorzystaniem jej inhibitorów w terapii.

4.2.5 Inhibitory osi HGF-MET

Oś HGF-MET odgrywa istotną rolę w powstawaniu, progresji i przerzutowaniu nowotworów, stąd też pojawiły się próby blokowania przekazywania sygnału pomiędzy HGF, a MET. Do metod tych zaliczamy:

- hamowanie przyłączania HGF do receptora MET,
- zapobieganie dimeryzacji receptora MET,
- hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej receptora MET,
- hamowanie ekspresji HGF lub MET.

Zablokowanie interakcji pomiędzy receptorem, a jego ligandem może nastąpić po zastosowaniu kompetycyjnych antagonistów HGF lub przeciwciał skierowanych przeciwko HGF lub MET. NK4 jest skróconą formą HGF i współzawodniczy z nim o miejsce wiązania MET, nie powodując jednak aktywacji receptora [24]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że NK4 hamuje zależną od HGF migrację i inwazyjność komórek nowotworowych *in vitro* [25]. Inna grupa badaczy przeprowadziła badania, w których zaobserwowano zahamowanie wzrostu, inwazyjności i przerzutowania nowotworów w modelu mysim [79]. Kolejnym sposobem zahamowania receptora MET jest zastosowanie neutralizujących przeciwciał przeciw HGF. W badaniach przeprowadzonych na modelu mysim zahamowanie przy użyciu takich przeciwciał doprowadziło do regresji ludzkich nowotworów [91]. Zastosowanie przeciwciał do receptora MET stanowi również bardzo dobrą strategię zahamowania wzrostu nowotworów nabłonkowych [149].

Stosowanie inhibitorów dimeryzacji jest ważne w przypadku, gdy nowotwory uniezależnią się od konieczności wiązania HGF, w celu aktywacji receptora MET. Zwiększona ekspresja samego receptora MET może doprowadzić do dimeryzacji i aktywacji [37]. Domena semaforynowa jest niezbędna dla dimeryzacji receptora MET. Grupa Kong-Beltran wykazała, że zrekombinowana, rozpuszczalna domena semaforynowa blokuje zależną i niezależną od HGF fosforylację receptora MET [78].

Aby zahamować aktywność kinazy tyrozynowej MET oraz interakcji z białkami sygnałowymi, można zastosować niskocząsteczkowe inhibitory, takie jak: geldanamycyny, K252a czy związki indolinonu.

Dotychczas przeprowadzone badania dotyczyły głównie nieszczipczakowych linii komórkowych, z zastosowaniem przede wszystkim niskocząsteczkowych inhibitorów MET, takich jak geldanamycyna i jej analogi (17-AAG, 17-DMAG) [18, 19] oraz PHA665752 [59].

Do obniżenia ekspresji MET lub HGF używane są również antysensy lub rybozomy. Antysensy to jednoniciowe cząsteczki RNA lub DNA, składające się z 15-25 nukleotydów, indukują one degradację komplementarnej sekwencji mRNA lub blokują jej translację. Po zablokowaniu genu *MET*, co powoduje spadek ekspresji receptora MET, dochodzi do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych [139]. Abounader i wsp. wykazali, że rybozomy, naturalnie występujące cząsteczki RNA katalizujące specyficzne cięcie mRNA - redukują ekspresję *MET* i *HGF* i powodują zahamowanie aktywacji receptora MET, migrację i formowanie kolonii komórek nowotworowych *in vitro* [1].

Technika posttranskrypcyjnego wyciszania genów wykorzystująca zjawisko interferencji RNA (RNAi) przy pomocy małych interferujących cząsteczek RNA (ang. *short interfering RNA*; siRNA), obejmuje naturalny proces hamowania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA. Ekspresja danego genu jest blokowana poprzez wprowadzenie siRNA o sekwencji komplementarnej do docelowego RNA. Przy użyciu wektora adenowirusowego kodującego siRNA przeciwko MET, zahamowano jego ekspresję w liniach komórkowych raka żołądka, prostaty i glejaka, przez co spadła ich aktywność mitogenna i motogenna. Wyciszenie genu *MET* spowodowało także indukcję apoptozy [12].

4.3 Białka szoku cieplnego 90

Białko szoku cieplnego 90 (ang. *heat shock protein*; HSP90) stanowi ok. 1-2% wszystkich białek komórkowych. Proteina ta odgrywa istotną rolę w zachowaniu homeostazy zarówno w warunkach fizjologicznych jak i pod wpływem stresu. HSP90 stabilizuje strukturę wielu kluczowych białek komórkowych takich jak receptory, kinazy białkowe czy czynniki transkrypcyjne. HSP90 umożliwia białkom zaangażowanym w procesy przekazywania sygnału utrzymywanie aktywnej konformacji, podatnej na stymulację (np. kinazy cytoplazmatyczne) czy wiązanie liganda (np. receptory hormonów steroidowych), tym samym ułatwiając szybką odpowiedź na sygnały zewnątrzkomórkowe [155, 114, 129].

Funkcje HSP90 spełniane są dzięki aktywności ATPazowej, poprzez zależne od ATP cykliczne przyłączanie i uwalnianie białek tworzących kompleks oraz białek docelowych dla HSP90 [115]. Białko docelowe dla HSP90 wiąże się z kompleksem białkowym HSP70/HSP40, a następnie, za pośrednictwem kompleksu organizującego białka HSP20 i HSP90 (ang. *HSP20-HSP90 organizing protein*; HOP) do HSP90. Zmiany konformacyjne HSP90, indukowane wymianą związanego ADP na ATP, prowadzą do oddysocjowania kompleksu HSP70/HSP40 i HOP oraz rekrutacji kolejnych białek opiekuńczych, takich jak p23, imunofiliny czy Cdc37. Zmiana repertuaru białek towarzyszących HSP90 umożliwia fałdowanie, stabilizację oraz przejściowe utrzymywanie w aktywnej konformacji białek docelowych. Brak odpowiedniej stymulacji czy związania liganda przez białko docelowe, prowadzi do wymiany zestawu białek opiekuńczych, w wyniku hydrolizy ATP. Przywrócone do formy nieaktywnej białko docelowe podlega ubikwitynacji, a następnie degradacji [136].

4.3.1 Rola HSP90 w komórkach prawidłowych

HSP90 jest konserwatywnym białkiem odpowiedzialnym za prawidłowe fałdowanie i stabilizację struktury innych białek. HSP są wydzielane w odpowiedzi na stres (czynniki infekcyjne, temperatura, metale ciężkie, zakwaszenie) i biorą udział w przekazywaniu sygnału w komórce [47]. HSP90 współpracuje z innymi białkami opiekuńczymi (tworząc z nimi kompleksy) w utrzymaniu aktywnej formy białek

docelowych oraz kierowaniu ich na drogę degradacji, w przypadku występowania w nieprawidłowej konformacji. HSP90 wyróżnia się spośród innych białek szoku cieplnego, ponieważ większość jego białek docelowych stanowią kinazy lub czynniki transkrypcyjne zaangażowane w przekazywanie sygnałów [47].

4.3.2 Rola HSP90 w komórkach nowotworowych

W komórkach nowotworowych HSP90 najczęściej występuje w kompleksach, które prowadzą do stabilizacji zmutowanych form białek, a poprzez silne wiązanie się do białka opiekuńczego, unikają degradacji [47]. HSP90 produkowane są w nadmiarze i ulegają mutacjom przybierając konformacyjnie niestabilne formy. Komórki nowotworowe wydają się być zatem szczególnie zależne od działalności HSP90. Przykładowo, mutacje w obrębie kinazy tyrozynowej SRC prowadzą do powstania konstytutywnie aktywowanej, konformacyjnie niestabilnej formy v-SRC. Wykazano, że zmutowane v-SRC, w porównaniu do niezmutowanego c-SRC, wiąże się silniej z HSP90 [106]. Innym białkiem jest p53 (odpowiedzialne za kontrolę cyklu komórkowego), którego poziom regulowany jest przez interakcje z HSP90. Zmutowane p53 silnie wiąże się z HSP90, unikając w ten sposób ubiquitynacji, a następnie degradacji [11].

Białka docelowe dla HSP90 regulują szereg procesów warunkujących wzrost i rozśiew komórek nowotworowych, wpływając na: (i) stymulowanie procesu angiogenezy (HIF1 α , MET, Src, VEGF), (ii) kontrolę cyklu komórkowego (cdk4, cdk6, cykliny D), (iii) zahamowanie apoptozy (AKT, IGF-1R), (iv) przeżywalność i inwazyjność (MMP-2 i urokinaza) [52].

Rolą HSP90 w komórkach nowotworowych jest utrzymanie prawidłowej homeostazy, pomimo niesprzyjających warunków (niedotlenienie, niedożywienie) oraz intensywnej produkcji nieprawidłowych białek [98]. Dlatego uważa się, że poziom białek opiekuńczych w komórkach nowotworowych może korelować ze stopniem ich złośliwości. Podwyższoną aktywność HSP90 zanotowano w większości nowotworów [54, 160]. Stąd też próba zastosowania inhibitorów HSP w leczeniu chorób rozrostowych [47, 85].

4.3.3 Inhibitory HSP90

Najnowsze strategie terapeutyczne oparte są o wykorzystanie dwóch różnych podejść: stworzenia leków celowanych, mających za zadanie wybiórcze hamowanie aktywności białek kodowanych przez onkogeny (np. Gleevec hamujący kinazę BCR/ABL) oraz leków uniwersalnych i kompleksowych, celujących w całą sieć szlaków komórkowych, biorących udział w podtrzymaniu nowotworowego fenotypu. Inhibitory białek HSP90 stwarzają możliwość równoczesnego, kompleksowego blokowania zmienionych nowotworowo białek, a tym samym hamowania rozwoju nowotworu na wielu poziomach jednocześnie.

4.3.3.1 Geldanamycyna

Geldanamycyna (GA), zaliczana do antybiotyków ansamycynowych, po raz pierwszy została wyizolowana w latach 70 z hodowli promieniowca *Streptomyces hygroscopicus*. W 1993 roku Whitesell i wsp. stwierdzili, iż GA specyficznie hamuje powstawanie kompleksów HSP90-v-SRC, sugerując istotną rolę HSP90 w procesie transformacji nowotworowej [154]. Dalsze badania wykazały, że GA powoduje obniżenie ekspresji także wielu innych białek zaangażowanych w proces nowotworzenia, takich jak zmutowane p53, zmutowany B-Raf, Akt, Bcr-Abl czy ErbB2 [101]. Prodromou i wsp., badając naturę interakcji pomiędzy HSP90 i GA, wykazali, że GA współzawodniczy z ATP o miejsce wiązania nukleotydów w HSP90 [116].

GA wiąże się do N-końcowej części miejsca wiązania nukleotydów, uniemożliwiając tym samym zachodzenie zmian konformacyjnych warunkowanych przemianami ATP i zapobiegając tym samym oddysocjowaniu białek docelowych HSP90. Uwięzione w strukturach kompleksu białka docelowe HSP90 ulegają ubikwitynacji, a następnie degradacji [49, 107].

Przeciwnowotworowe działanie GA wynika przede wszystkim z:

- hamowania aktywności białek promujących proliferację, takich jak RAF-1,
- obniżenia ekspresji zmutowanych lub produkowanych w nadmiarze białek onkogennych,
- hamowania aktywności białek warunkujących przeżywanie komórek, np. AKT, blokowania cyklu komórkowego,

- hamowania angiogenezy
- obniżenia inwazyjności i zdolności do przerzutowania [114].

W przypadku mięsaka prążkowanokomórkowego (ang. rhabdomyosarcoma; RMS) stwierdzono, iż GA powoduje obniżenie ekspresji białek komórkowych takich jak: AKT, STAT-3 czy MET. W wyniku działania GA obserwowano zahamowanie proliferacji, wynikające z indukcji apoptozy i zablokowania cyklu komórkowego oraz ograniczenie zależnej od MET inwazyjności [85]. Również w przypadku szpiczaka mnogiego wykazano, iż GA powoduje zmniejszenie ekspresji takich czynników, jak: IGF-1R i IL-6R, deplecję kinaz wzrostowych (np. AKT, I κ B (IKK) i RAF-1) i białek przeciwapoptotycznych (FLIP, XIAP, cIAP i telomerazy) oraz działa hamująco na indukowaną przez cytokiny aktywację NF- κ B [95]. GA indukuje apoptozę linii komórkowych oraz komórek pacjentów z MM, opornych na deksametazon, antracykliny, talidomid, ImiDs oraz PS-341. Przeciwnowotworowe działanie GA wykazano również w przypadku nowotworów takich jak rak: prostaty, okrężnicy, piersi czy czerniaku [129].

4.4 Mikrośrodowisko szpiku kostnego

Fakt, że w większości przypadków rozwój szpiczaka następuje w obrębie szpiku kostnego, sugeruje, że kluczową rolę w stymulacji wzrostu i przetrwania komórek MM, odgrywają sygnały z mikrośrodowiska szpiku [29, 42]. Jak dotąd, sygnały te oraz związane z nimi przekaźniki wewnątrzkomórkowe, które mogą stanowić potencjalny cel interwencji terapeutycznych, nie zostały całkowicie zbadane.

4.4.1 Mezenchymalne komórki macierzyste

Szpick kostny to źródło mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *Mesenchymal Stem Cells*; MSC), które stanowią niewielką frakcję całkowitej puli komórek zasiedlających nisze szpikowe. MSC to heterogenna populacja somatycznych komórek macierzystych, które wykazują wysoki potencjał proliferacyjny i zdolność do różnicowania.

Friedenstein jako pierwszy wyizolował i scharakteryzował MSC oraz wykazał, że posiadają potencjał do różnicowania w mezenchymalne linie komórkowe, takie jak: osteocyty, adipocyty i chondrocyty [41].

MSC to komórki trudne do scharakteryzowania pod względem ekspresji antygenów powierzchniowych, przeprowadzone barwienia potwierdziły obecność takich molekuł jak: CD44, CD105 (SH2; endogлина), CD106 (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule*; VCAM-1), CD166 (ang. *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*; ALCAM), CD29, CD73 (SH3 i SH4), CD90 (Thy-1), CD117, STRO-1 [13, 21, 27, 48], nie wykazano natomiast ekspresji markerów charakterystycznych dla linii hematopoetycznej, czyli: CD45, CD34, CD14, CD11, CD31, CD33 [110]. Wykazano, że MSC hodowane w niskiej gęstości szybciej proliferują i wydzielają czynnik Dkkopf 1, który jest odpowiedzialny za podtrzymanie nie zróżnicowanego fenotypu MSC. Jednak, gdy hodowla osiąga maksymalną gęstość, ekspresja Wnt-5a znosi efekt działania Dkk1 [46].

4.4.2 Rola mikrośrodowiska w szpiczaku

Komórki szpiczakowe oddziałują z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego, w którego skład wchodzi: komórki endotelialne, komórki stromy, komórki mezenchymalne, osteoklasty, osteoblasty, komórki układu immunologicznego, komórki tłuszczowe i macierz zewnątrzkomórkowa. Oddziaływania te są odpowiedzialne za migrację (ang. *homing*) komórek do specyficznych nisz w szpiku kostnym, proliferację, przeżycie i oporność komórek MM na chemioterapię [26]. Niekontrolowana proliferacja patologicznych plazmocytów, produkujących nadmierne ilości monoklonalnych immunoglobulin oraz oddziaływania komórek MM z mikrośrodowiskiem, są powodem anemii, upośledzenia układu immunologicznego, nieprawidłowej hematopoezy, zaburzonej funkcji nerek oraz zmian osteolitycznych kości. Ważnym aspektem wpływającym na proliferację i przeżywalność komórek MM może być fakt, iż komórki te znajdują się w bezpośrednim kontakcie z podścieliskiem, poprzez receptory integrynowe [42].

Na wzrost komórek MM wpływają również wydzielane przez podścielisko szpiku cytokiny czy czynniki wzrostu, takie jak:

- interleukina 6 (IL-6),
- czynnik wzrostu hepatocytów (HGF),
- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF),
- insulinopodobny czynnik wzrostu 1(ang. *Insulinlike Growth Factor*; IGF-1)
- transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming Growth Factor β* ; TGF β)
- oraz inne czynniki wpływające na zmiany w strukturze kości [111].

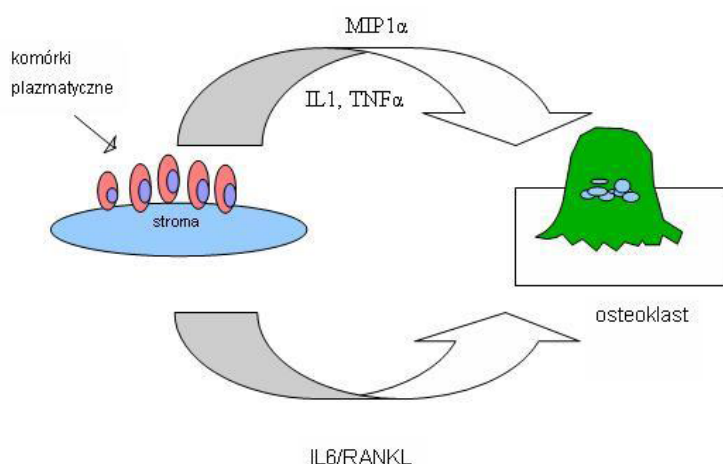
Badania nad MM obejmują złożone procesy związane z destrukcją kości na drodze osteoklastogenezy w niszach, w których akumulują się komórki szpiczakowe, wydzielające w nadmiarze czynniki aktywujące osteoklasty, a ich poziom koreluje z ilością nieprawidłowo funkcjonujących osteoblastów [131].

4.4.3 Osteogeneza

Różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w osteoblasty, polega na traktowaniu ich mieszaniną zawierającą β -glicerofosforan, kwas askorbinowy i deksametazon, przez okres 2-3 tygodni [28]. Czynniki biorącymi udział w regulacji osteogenezy, są białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Proteins*; BMP) [15, 82], TGF- β , insulino-podobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor*; IGF), FGF-2, leptyna oraz peptyd pokrewny do hormonu przytarczyc (ang. *Parathyroid Hormone related Peptide*; PTHrP) [89]. Rola tych białek polega na regulacji wydzielania białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ekspresji genów niezbędnych do przebudowy kości poprzez aktywację osteoklastów. Do najbardziej aktywnych genów w procesie osteogenezy zalicza się: Cbfa1/Runx2, Osterix, Δ FosB, Fra-1, Aj18 oraz Osf1 [163]. MSC podczas osteo-różnicowania wykazują zwiększoną aktywność alkalicznej fosfatazy i odkładają złogi fosforanu wapnia. Złogi te można uwidoczniać stosując barwnik alizaryn red lub metodę von Kossa [28].

4.4.4 Osteoklastogeneza

Osteoklastogeneza to bardzo ważny proces, odpowiedzialny za destrukcję kości u pacjentów chorych na MM. Do czynników indukujących formowanie osteoklastów należą: IL1 (ang. *Interleukin 1*), PTHrP, RANKL (ang. *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), limfotoksyna, TNF α (ang. *Tumor Necrosis Factor α*), HGF, IL6, MMP1, MMP2, MMP9 (ang. *Matrix Metalloproteinases 1,2,9*) oraz IGF-BP4 (ang. *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4*). MIP-1 α (ang. *Macrophage Inflammatory Factor 1 α*) produkowany jest przez komórki szpiczakowe, a jego poziom koreluje z zaawansowaniem choroby (Ryc. 7) [17].



Rycina 7. Oddziaływanie komórek plazmatycznych z mikrośrodowiskiem. Opracowano na podstawie Silvestris F.i współpracowników [17].

Obecność IL6 jest wykrywana w osoczu pacjentów z MM i odgrywa ważną rolę w szpiczaku mnogim. Czynnikiem ten jest potencjalnym stymulatorem formowania osteoklastów i indukuje wzrost komórek szpiczakowych u ok. 30% pacjentów [81]. IL6 działa jako czynnik antyapoptotyczny dla komórek plazmatycznych, a adhezja pomiędzy komórkami plazmatycznymi a stromą powoduje wzrost produkcji tego czynnika przez komórki podścieliska. Oprócz bezpośredniego wpływu na proliferację osteoklastów, IL6 może również wzmacniać efekt innych czynników wpływających na osteoklastogenezę, tj. RANKL, PTRrP czy MIP-1α. Z drugiej strony Devlin i in. pokazali, że IL6 może pośredniczyć w wydzielaniu cytokin, które stymulują formowanie osteoklastów, takich jak: IL1, TNFα [30].

TNFα, zidentyfikowany w nadsączu hodowli komórek mononuklearnych, wyizolowanych ze szpiku pacjentów z MM, jest stymulatorem osteoklastogenezы zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Stosując metodę dwukolorowej immunofluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* u pacjentów chorych na MM i MGUS pokazano zarówno spadek ekspresji IL1 jak i nadmierną ekspresję TNFα [124]. Limfotoksyna (ang. *Tumor Necrosis Factor β*; TNFβ) wiąże się z receptorem TNFα i może indukować osteoblastogenezę *in vitro*, a po podaniu do myszy, hiperkalcemię [99]. TNFβ jest produkowany przez komórki wyizolowane z materiału pacjentów chorych na szpiczaka oraz szpiczakowe linie komórkowe. Obserwowano również niski poziom tego czynnika w osoczu szpiku chorych.

PTHrP może indukować formowanie osteoklastów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [99], poprzez stymulację ekspresji RANKL przez komórki stromy w szpiku kostnym i osteoklasty.

Wiele zespołów badawczych wykazało korelację pomiędzy poziomem HGF, wydzielanym przez komórki szpiczakowe, a stopniem zaawansowania MM. Czynnikiem ten wpływa również na indukcję sekrecji IL-11 przez ludzkie osteoblasty, a ta indukuje tworzenie osteoklastów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [57].

Kolejnym czynnikiem, poprzez który dochodzi do lizy kości w MM, jest RANKL, należący do rodziny czynników martwicy nowotworów. RANKL występuje jako białko błonowe na powierzchni osteoblastów, osteocytów i komórkach stromy w szpiku kostnym. Czynniki takie: jak IL-1, IL-11, czy prostaglandyna E2, działając pośrednio przez komórki stromy, zwiększają produkcję RANKL.

Stosując metodę ELISA, zaobserwowano zwiększony poziom MIP-1 α w świeżo pobranym szpiku chorych na MM. MIP-1 α odgrywa znaczącą rolę we wzroście i zagnieżdżaniu komórek szpiczakowych w szpiku kostnym. Ponadto, czynnik ten będąc chemoatraktantem dla osteoklastów, powoduje ich migrację do miejsca zagnieżdżenia komórek MM [51].

MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase* – 9) może niszczyć przestrzeń kostną oraz narażać strukturę kości na działanie osteoklastów. Komórki szpiczakowe oraz stromy produkują MMP-9, MMP-1 i MMP-2, co może prowadzić do destrukcji kości [5].

4.4.4.1 Zaburzenia osteoblastogenezy

Oprócz złożonych procesów prowadzących do nadmiernej osteolizy w szpiczaku mnogim zaburzeniu ulega również proces osteoblastogenezy.

Komórki szpiczakowe wydzielają ligandy sprzyjające apoptozie osteoblastów, takie jak: Fas-L czy TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) oraz białko Dkk1. W procesie osteoblastogenezy, u chorych na szpiczaka mnogiego dochodzi do zaburzenia bardzo ważnego szlaku sygnałowania Wnt- β -katenina. Wydzielane przez komórki plazmatyczne białko Dkk1 hamuje dojrzewanie prawidłowych osteoblastów. Dzieje się tak, ponieważ Dkk1 działając przez białko Kremens wewnątrz cytoplazmy, wpływa na receptory LRP, powodując ich internalizację do cytoplazmy, przez co

przestają one być koreceptorem dla receptora Frizzled 7 razy przebijającego przez błonę, który to z kolei nie może przyłączyć Wnt. Zaburzenie szlaku Wnt prowadzi do zahamowania tworzenia cytoplazmatycznej β -kateniny, która odgrywa ważną rolę w dojrzewaniu osteoblastów budujących kości [153].

Do inhibitorów dojrzewania osteoblastów wydzielanych przez komórki plazmatyczne zaliczamy również: sFRPs (ang. *Frizzled Proteins*), Noggin, Gremlin oraz IL-7. Wpływają one na dysregulację głównych czynników transkrypcyjnych Runx2/Cbfa1 w komórkach stromy. Zmiany te w istotny sposób zaburzają aktywację wielu funkcji komórkowych, prowadzących do dojrzewania komórek w osteoblasty.

4.4.5 Mikrofragmenty

Zarówno prawidłowe jak i nowotworowe komórki złuszczaą błony komórkowe i wydzielają koliste fragmenty błon, które zostały nazwane mikrofragmentami (MFB) [38]. Mikrofragmenty wydzielone z nieuszkodzonych komórek są zazwyczaj mniejsze od ciałek apoptotycznych, wydzielanych z obumierających komórek.

Ilość wydzielanych mikrofragmentów rośnie podczas:

- aktywacji komórek,
- hipoksji i napromieniania,
- uszkodzenia spowodowanego produkcją wolnych form tlenu,
- ekspozycji na białka pochodzące z aktywowanej kaskady komplementu [60].

Mikrofragmenty mogą pełnić różne funkcje:

- stymulować inne komórki przez ekspresję na ich powierzchni ligandów będących „kompleksem sygnałowania”,
- przenosić receptory powierzchniowe z jednej komórki na drugą,
- dostarczać białka, mRNA i bioaktywne tłuszcze do komórek docelowych,
- przenosić cząstki infekcyjne (np. HIV, priony),
- prawdopodobnie również przenosić całe organella (np. mitochondria) do innych komórek [118].

Wykorzystując cytometrię przepływową do analizy linii komórek prawidłowych i nowotworowych, obserwuje się małe struktury, które były uważane za fragmenty komórek, „śmieci” czy gruz komórkowy. Ilość tych niewielkich fragmentów jest

zależna od linii komórkowej [7]. Badania z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały, że te „śmieci” są wzbogacone w mikrofragmenty błonowe.

Podobne procesy, jak podczas hodowli komórkowych *in vitro*, zachodzą w środowisku *in vivo* i mikrofragmenty wydzielane przez komórki nowotworowe obecne są zarówno w mikrośrodku danego nowotworu jak i w krążącej krwi obwodowej [75, 45, 142, 94, 94, 74].

Rola mikrofragmentów produkowanych przez komórki raka płuc została zbadana, między innymi, w rozwoju guza nowotworowego oraz powstawaniu przerzutów. Przeprowadzone badania potwierdzają, że MFB mogą przyczyniać się do progresji tego nowotworu i tworzenia odległych przerzutów [67].

Mikrofragmenty są ważnymi cząsteczkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórek, modulując ich funkcje. Aktywują kaskadę przekazywania sygnału do wnętrza komórki, poprzez cząsteczki MAPK p42/44, AKT i białko STAT, co skutkuje proliferacją i zahamowaniem apoptozy [118]. Ponadto mikrofragmenty nowotworowe aktywują wydzielanie przez komórki podścieliska czynników stymulujących rozwój naczyń krwionośnych oraz wzrost proliferacji komórek śródbłonna.

Dane literaturowe opisują również rolę mikrofragmentów w przenoszeniu receptorów pomiędzy komórkami. Ważnym odkryciem dokonany na płytkach krwi, było przeniesienie prezentowanych przez komórki płytek krwi cząsteczek adhezyjnych na komórki hematopoetyczne, a przez to zwiększenie ich adhezji do fibrynogenu i endotelium [4, 66]. Badania te poparte zostały obserwacją, że mikrofragmenty mogą przenosić antygen CD41 ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integryna) z płytek krwi na komórki endotelialne [6]. Podobne mechanizmy pośredniczą w przypadku przeniesionych na komórki nowotworowe mikrofragmentów pochodzących ze zaktywowanych płytek krwi, przez co zwiększały adhezję komórek raka płuca do endotelium oraz zdolności do przerzutów w doświadczeniach *in vivo* po przeszczepie do myszy syngenicznych [67]. Komórki nowotworowe opłaszczane mikrofragmentami przeszczepione do myszy wykazywały większą liczbę ognisk przerzutowych, niż komórki bez opłaszczenia.

Wiele z krążących mikrofragmentów, których poziom był podwyższony w krwi obwodowej pacjentów chorych na nowotwory żołądka, korelował ze zwiększoną liczbą przerzutów oraz gorszą prognozą [75]. Mikrofragmenty produkowane przez komórki nowotworowe stymulują wydzielanie różnych czynników proangiopoetycznych przez fibroblasty, działają jako chemoatraktanty i zwiększają proliferację komórek

endotelialnych oraz promują proces angiogenezy [67]. W praktycznym zastosowaniu, mikrofragmenty mogą służyć jako czynnik diagnostyczny, poziom MFB może korelować oraz być miarą stanu zapalnego. MFB mogą również służyć jako rodzaj fizjologicznego narzędzia do dostarczania różnych molekuł do komórek, a po opłaszczeniu powierzchni komórek mikrofragmentami wykazującymi ekspresję pożądanых receptorów, można zwiększyć zasiedlanie komórek po przeszczepach. Mikrofragmenty dostarczone przez komórki nowotworowe mogłyby służyć w szczególnych sytuacjach jako narzędzie w budowaniu odpowiedzi immunologicznej na komórki nowotworowe, albo przeciwnie, indukować tolerancję dla przeszczepianych organów [60].

5 CELE PRACY

Brak skutecznych sposobów leczenia szpiczaka mnogiego rodzi potrzebę poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych. W prezentowanej pracy postanowiono ocenić przydatność, dla potencjalnej terapii MM, następujących strategii: użycia siRNA do blokowania receptora MET, odpowiedzialnego między innymi za inwazyjność i przerzutowanie komórek nowotworowych oraz użycia inhibitorów HSP90 (geldanamycyny i jej pochodnych) celujących w sieć szlaków komórkowych biorących udział w podtrzymywaniu nowotworowego fenotypu. Ważnym elementem w poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój MM jest mikrośrodowisko szpiku kostnego oraz czynniki wpływające na jego modyfikację. Dlatego kolejnym krokiem w celu lepszego poznania biologii szpiczaka mnogiego była charakterystyka mikrośrodowiska szpiku kostnego pacjentów chorych na MM oraz zbadanie roli mikrofragmentów błonowych.

Podsumowując powyższe stwierdzenia, sformułowano następujące cele pracy:

1. Ocena efektów zablokowania sygnałowania receptora MET poprzez siRNA w komórkach linii szpiczaka mnogiego *in vitro* i *in vivo*.
2. Ocena wpływu geldanamycyny i jej pochodnych na wzrost i inwazyjność komórek linii szpiczakowych oraz komórki CD138+ uzyskane ze szpiku kostnego pacjentów chorych na MM.
3. Ocena wpływu mikrośrodowiska szpiku na komórki szpiczakowe.
4. Określenie wpływu mikrofragmentów błonowych wytwarzanych przez komórki szpiczakowe na mikrośrodowisko szpiku kostnego.

6 MATERIAŁY I METODY

6.1 Hodowle komórkowe

6.1.1 Hodowla szpiczakowych linii komórkowych

Hodowle komórkowe linii szpiczaka mnogiego prowadzono w medium RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) z dodatkiem surowicy bydlecej (ang. *Fetal Bovine Serum*; FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 2 mM L-glutaminy i antybiotyków: 100 IU/ml penicyliny i 10 µg/ml streptomycyny (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% wilgotności. Linie komórkowe pasażowano 2 razy w tygodniu.

Nazwy i warunki hodowli linii szpiczakowych przedstawiono w Tabeli 1

linia	% FBS	IL-6 (ng/ml)
U266	15	-
RPMI	20	-
INA6	10	2
ANBL	10	4
CAG	10	-

Tabela 1 Modyfikacje warunków hodowli w zależności od linii szpiczakowej

6.1.2 Materiał kliniczny

Próbki szpiku kostnego zostały pobrane od chorych na MM po wyrażeniu pisemnej zgody przez pacjentów. Szpik kostny był pobierany drogą biopsji aspiracyjnej z tylnego kolca talerza kości biodrowej do jałowych probówek typu Vacutainer (Becton Dickinson) na antykoagulant (EDTA lub heparyna). Zgoda komisji bioetycznej na pobranie i wykorzystanie aspiratów szpiku kostnego od chorych na szpiczaka mnogiego nr KBET/408/B/2003.

6.1.2.1 Izolacja i hodowla pierwotnych komórek szpiczakowych

Pierwotne komórki szpiczakowe izolowano ze świeżych aspiratów szpiku kostnego pacjentów chorych na MM, które uzyskano z Kliniki Hematologii UJCM. Frakcję komórek jednojądrzastych szpiku kostnego, uzyskano poprzez wirowanie całkowitego szpiku na gradiencie fikolu (1000 x g, 30 min), a następnie po inkubacji (15min 4⁰C) z przeciwciałami anty CD138⁺ sprzężonymi z kulkami magnetycznymi i izolowano przy pomocy systemu MiniMacs (Miltenyi, Biotec, Auburn, CA, USA). W ten sposób wyizolowane komórki hodowano w obecności 10% FBS oraz 2 ng/ml IL6.

Czystość otrzymanych w wyniku izolacji komórek oceniano cytofluorometrycznie (FACS Canto, Becton Dickinson, Niemcy), z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anty-CD138⁺ znakowanych fikoerytryną (ang. *Phycoerythrin*; PE) (BD PharMingen, San Diego, USA).

6.1.2.2 Izolacja i hodowla komórek prawidłowych

W badaniach wykorzystano mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells*; MSC) pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *Bone Marrow-MSC*; BM-MSC) zdrowych dawców oraz pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego (MMBM-MSC).

BM-MSC izolowano ze szpiku kostnego zdrowych dawców, bądź chorych na szpiczaka wg protokołu opisanego przez Friedensteina i wsp [41] z frakcji komórek jednojądrzastych szpiku kostnego, uzyskanej poprzez wirowanie całkowitego szpiku na gradiencie fikolu (1000 x g, 30 min), a następnie selekcjonowanie przez adhezję do powierzchni plastiku. Komórki jednojądrzaste w liczbie 4 x 10⁵/cm² wysiewano na butelki plastikowe (Sarstedt AG & Co., Germany).

Hodowle BM-MSC i MMBM-MSC prowadzono w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich) wzbogaconej 10% FBS, przeznaczonej do hodowli MSC (Stem Cell Technologies), z dodatkiem antybiotyku (PAA Laboratories GmbH) w 37°C w atmosferze 5% CO₂ i wilgotności 95%. Po osiągnięciu 90% gęstości komórki pasażowano z użyciem 0,05% trypsyny (Trypsyn-EDTA, PAA Laboratories GmbH) i wysiano w ilości 1 x 10⁴/cm² do nowych butelek hodowlanych.

6.2 Transfekcja komórek

W osobnych probówkach przygotowywano roztwór Lipofectamine2000 w 50 μ l medium OptiMEM I (Invitrogen) bez FBS i antybiotyków oraz 1 μ g siRNA w 50 μ l medium OptiMEM I bez FBS i antybiotyków, łączono i pozostawiano na 20 min. w celu sformowania kompleksów siRNA-Lipofectamine2000. Do zawiesiny $0,5 \times 10^5$ komórek U266 lub 1×10^5 komórek INA-6 w medium hodowlanym bez antybiotyków dodawano przygotowane wcześniej kompleksy, wysiewano i inkubowano w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% wilgotności.

6.3 Uzyskanie linii komórkowych pozbawionych receptora MET

Metodą seryjnych rozcieńczeń ustalono najniższą toksyczną dawkę blastycydyny (Invivogen) dla komórek U266 oraz INA-6. Dla linii U266 ustalono dawkę 10 μ g/ml, a dla linii INA-6 4 μ g/ml.

Komórki linii U266 i INA-6 wysiano odpowiednio w stężeniu 3×10^4 i przeprowadzono transdukcję konstruktem lentiwirusowym. 10 μ l cząsteczek wirusa zawieszono w 1 ml RPMI z 10% FBS i dodano do komórek, w obecności 6 μ g/ml bromku heksadimetryny (Polybrene; Sigma). Po 48 godz. od transdukcji wprowadzono blastycydynę o odpowiednim stężeniu. Medium z blastycydyną wymieniano co 3-4 dni. Po 12 dniach obserwowano martwe lub apoptotyczne komórki szpiczakowe nie odporne na blastycydynę.

Ustalono nazewnictwo wyselekcjonowanych linii dodając do nazwy linii wyjściowej indeks shMET lub shLacZ w zależności od zastosowanego wirusa. Dla łatwiejszego odróżnienia, liniom wyjściowym dodano indeks WT (ang. *Wild Type*; typ dziki).

6.4 Ocena wyciszenia receptora MET w modelu mysim

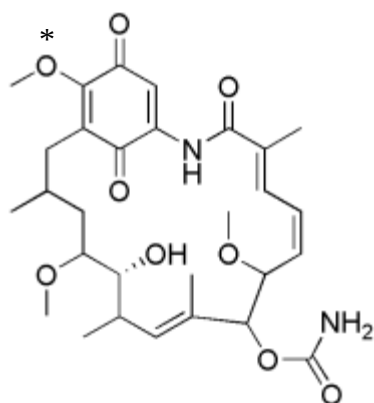
Do badań *in vivo* wykorzystano myszy cukrzycowe bez objawów otyłości z wrodzonym defektem odporności typu komórkowego (ang. *Non Obese Diabetes Severe Combined Immunodeficiency*; NOD-SCID) zakupione z Jackson Laboratories, Portland, ME, USA. Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskano zgodę Lokalnej

Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach [Uchwała nr 61/2006 z dnia 6 lipca 2006].

Myszy NOD-SCID były napromieniane dawką 300 cGy przy użyciu GammaCell. Po upływie 24 godz. do zatoki ocznej podawano komórki linii wtU266, *shMET*-U266 i *shLacZ*-U266 w ilości 5×10^6 . W trakcie przebiegu doświadczenia sporządzono krzywe przeżycia myszy, a po zgonie z badanych myszy izolowano kości długie, które utrwalano w paraformaldehydzie, a następnie zatapiono w bloczkach parafinowych i przygotowano preparaty histochemiczne.

6.5 Geldanamycyny

Geldanamycyna (GA), 17AAG, 17DMAG, 17AEP-GA i 17DMAP-GA zakupione zostały w firmie Invivogen (San Diego, CA, USA). GA, 17AAG rozpuszczane były w DMSO (Merck, Darmstadt, Germany), a 17DMAG, 17AEP-GA i 17DMAP-GA w wodzie. Wzory chemiczne oraz pełne nazwy GA i jej pochodnych zamieszczono na rycinie 8 i w tabeli 2.



Rycina 8. Wzór chemiczny geldanamycyny Gwiazdką oznaczono miejsce wprowadzania modyfikacji przy węglu 17

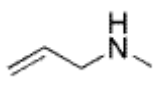
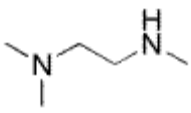
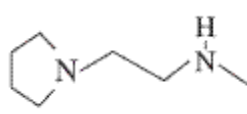
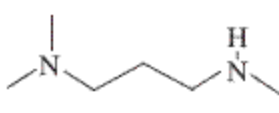
Nazwa	Skrót	Rodzaj podstawnika przy C17
17-Allylamino- 17-demethoxygeldanamycin	17AAG	
17-(Dimethylaminoethylamino)- 17-demethoxygeldanamycin	17DMAG	
17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]amino- 17-demethoxygeldanamycin	17AEP-GA	
17-(Dimethylaminopropylamino)- 17-demethoxygeldanamycin	17DMAP-GA	

Tabela 2. Modyfikacje geldanamycyny

6.6 Ocena proliferacji/przeżywalności za pomocą testu MTS

Ocenę przeżywalności komórek wykonywano za pomocą testu kolorymetrycznego MTS (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI, USA). Sól tetrazolowa (MTS), w wyniku oksyredukcyjnej działalności mitochondriów, ulega redukcji do barwnych formazanów. Powstający produkt barwny, odzwierciedlający liczbę aktywnych metabolicznie komórek, oceniano przy pomocy czytnika EL800 (BIO-TEK Instruments, USA) przy długości fali 490 nm.

6.7 Wykrywanie apoptozy

Apoptozę oceniano za pomocą testu wiązania Aneksyny V z równoczesnym wykorzystaniem jodku propidyny (ang. *Propidium Iodide*; PI). Aneksyna V wiąże się z fosfatydyloseryną, obecną na powierzchni komórek apoptotycznych. Jodek propidyny wchodzi do wnętrza komórek dzięki utracie integralności błon i barwi komórki nekrotyczne lub w późnych stadiach apoptozy. Komórki płukano roztworem zimnego

buforowanego roztworu soli fizjologicznej (ang. *Phosphate Buffered Saline*; PBS). Osady komórkowe zawieszano w 100 µl buforu wiążącego (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, USA) i dodawano 5 µl znakowanej fikoerytryną Aneksyny V i 10 µl PI (Becton Dickinson Pharmingen). Po 15 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, dodawano po 400 µl buforu wiążącego i analizowano za pomocą cytofluorometru przepływowego FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Analizę wyników wykonywano przy użyciu programu FASC Diva (Becton Dickinson).

6.8 Analiza cyklu komórkowego

Dystrybucję liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oceniano na podstawie pomiarów zawartości DNA wyznakowanego fluorescencyjnie jodkiem propidyny. Próbkę do analizy w cytometrze przepływowym przygotowywano poprzez utrwalanie komórek w 75% wodnym roztworze etanolu i inkubowano przynajmniej 12 godz. w 4°C. Następnie próbkę trawiono RNazą [50 µg/ml] (ICN Polfa Rzeszów, Polska) przez 30 min. w 37°C, a następnie inkubowano z PI [50 µg/ml] (Sigma) rozcieńczonym w roztworze cytrynianu sodu (Sigma), przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Analizę wykonywano przy użyciu cytometru przepływowego FacsCanto (Becton Dickinson). Analizę wyników prowadzono za pomocą programu Facs Diva.

6.9 Ocena ekspresji białek

W celu oznaczenia ekspresji białek wykorzystano metodę Western Blot oraz immunohistochemiczne barwienia preparatów histologicznych.

6.9.1 Oznaczanie stężenia białka

Komórki lizowano na lodzie przez 10 min. buforem M-Per (Pierce, Rockford, IL, USA) z dodatkiem inhibitorów proteinaz i fosfataz: 10 mg/ml aprotyniny, 1 mg/ml pepstatyny A, 10 mg/ml leupeptyny, 1 M NaF, 10 mM pirogronianu sodu, 500 mM EDTA i 10 mg/ml PMSF (Sigma). Pomiaru stężenia dokonywano metodą Bradforda

przy użyciu odczynnika Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) i czytnika EL800. Stężenie białka w próbkach określono w oparciu o krzywą wzorcową do której wyznaczenia użyto albuminy.

6.9.2 Ocena ekspresji białek metodą Western Blot

Wyizolowane białka denaturowano w obecności Bond-Braker (Pierce) i buforu obciążającego (NuPage LDS Sample Buffer; Invitrogen) przez 10 min. w 70°C.

Przygotowane próbki zawierające po 10 µg białka nakładano i rozdzielano w żelu poliakrylamidowym z 10% SDS (SDS-PAGE) przy napięciu 150 V przez 100 min. Kolejnym etapem był transfer na membranę nitrocelulozową PVDF (BioRad) przy napięciu 100 V przez 60 min. Jako markera wielkości stosowano Precision Protein Standard (BioRad).

Obecność białek MET, AKT, MAP i HSP90 wykrywano z użyciem króliczych przeciwciał monoklonalnych anti-MET (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA), anti-AKT, anti-MAP i anti-HSP90 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Jako przeciwciał drugorzędowych używano IgG anti króliczych i anti mysich związanych z peroksydazą chrzanową (ang. *Horse Radish Peroxidase*; HRP) (Santa Cruz Biotech.). Ilość rozdzielanych produktów kontrolowana była przy użyciu króliczych przeciwciał anti GAPDH (Santa Cruz Biotech.).

Fosforylację kinaz MAPK p44/42 (Tyr204/Thr202) i AKT (Ser473) badana była przy użyciu mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko fosforylowanym MAPK p44/42 oraz króliczych przeciwciał przeciwko kinazie AKT (Cell Signaling). Jako przeciwciał drugorzędowych używano IgG anti mysich i anti króliczych związanych z HRP. Ilość rozdzielanych produktów kontrolowana była przy użyciu króliczych przeciwciał anti GAPDH (Santa Cruz Biotech.). Po wykonaniu standardowych płukań, membrany winylowe (PVDF) pokrywano chemiluminescencyjnym substratem dla HRP (ECL Reagent; Amersham Life Sci., Little Chalfont, Wielka Brytania) i poddawano ekspozycji kliszę fotograficzną (Hyper Film ECL; Amersham Life Sci.).

6.9.3 Immunohistochemiczna detekcja białek w preparatach histologicznych

Skrawki trepanobiopatów szpiku kostnego pacjentów z MM uzyskano z Zakładu Patomorfologii UJCM. Zostały przygotowane z bloczków parafinowych pochodzących od pacjentów leczonych w Klinice Hematologii UJCM w Krakowie. Preparaty histologiczne z mikronowymi skrawkami parafinowymi trepanobiopatów poddane zostały w pierwszym kroku deparafinacji i uwodnieniu. Etap ten obejmował inkubację w ksylenie i alkoholu etylowym. Barwienie przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu: DAKO LSAB2 System + Kit (DakoCytomation).

Preparaty barwiono przy użyciu monoklonalnych przeciwciał anty MET (w rozcieńczeniu 1:100) (DakoCytomation). W celu wizualizacji reakcji antygen-przeciwciała nałożono kroplę Streptawidyny, a następnie *chromogen activating agent*. Uzyskane preparaty barwiono hematoksyliną i zatopiono w glicerolożelu. Ocenę przeprowadzono w mikroskopie świetlnym Olympus.

6.9.4 Barwienie immunohistochemiczne komórek ustalonych linii szpiczakowych

W celu barwienia immunohistochemicznego komórek linii szpiczaka na obecność receptora MET wykonano preparaty cytospinowe. Następnie procedura była wspólna z barwieniem skrawków (6.9.3).

6.10 Indukcja i ocena różnicowania MSC w osteoblasty

BM-MSc różnicowano w osteoblasty po trzecim pasażu. W celu osteo-indukcji, komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości $3-5 \times 10^4$ /dołek i hodowano w medium różnicującym (DMEM, 10% FBS, 0,1 mM deksametazon, 50 µg/ml fosforan askorbinowy i 10µM β-glicerofosforan) przez 21 dni, z dwukrotną zmianą medium w ciągu tygodnia. Aby uwidocznić złogi fosforanu wapnia odkładane przez osteoblasty, hodowle, po utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie (2 min), wybarwiano za pomocą alizarynu red S (Sigma) przez 2 min, następnie płukano 70% alkoholem etylowym. Wybarwione złogi fosforanu wapnia uwidacziano przy użyciu mikroskopu Olympus i fotografowano za pomocą kamery Olympus.

Analogiczne eksperymenty przeprowadzono w obecności MM-MFB (20 ng/ml) w medium różnicującym.

6.11 Analiza fenotypu MSC – cytometria przepływowa

Komórki BM-MSK i MMBM-MSK znajdujące się na trzecim pasażu poddane były analizie cytofluorymetrycznej na obecność antygenów powierzchniowych typowych dla MSC: CD73, CD166, CD271 oraz charakterystycznych dla linii hematopoetycznej: CD45 i CD34 oraz CXCR4. Komórki w liczbie 1×10^5 zawieszono w 100 μ l PBS z 2% FBS barwiono z odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym (Becton Dickinson) przez 30 min w 4°C, w ciemności, a następnie zbierano za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto (Becton Dickinson) i analizowano przy użyciu oprogramowania FACS Diva (Becton Dickinson).

6.12 Izolacja mikrofragmentów błonowych

Mikrofragmenty (MFB) uwalniane z błon zewnątrzkomórkowych izolowano stosując metodę wirowań. W celu wykluczenia wpływu czynników dostarczanych z medium hodowlanego wykonano trzykrotny cykl płukania i wirowania (I-2500obr/10min, II-14000g/1godz., III-14000/1godz.).

6.13 Ocena ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

Analizę ekspresji genów wykonano w celu porównania genotypów MSC pochodzących od zdrowych dawców oraz pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego, jak również w celu sprawdzenia ekspresji genów w komórkach poddanych ekspozycji na mikrofragmenty błonowe.

6.13.1 Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji

RNA izolowano za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Stężenie i czystość otrzymanego RNA oceniano przez pomiar absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm z wykorzystaniem spektrofotometru DU 640B (Beckman

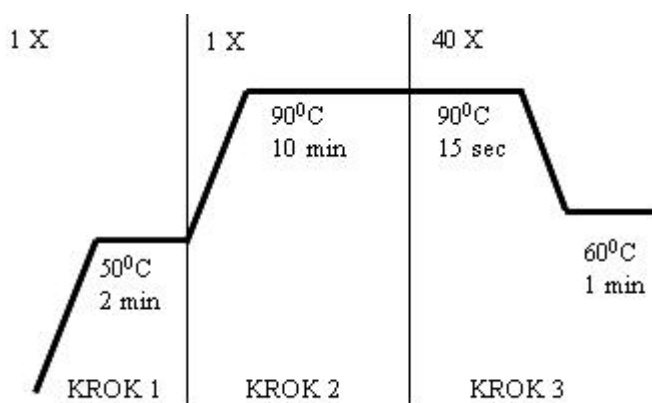
Coulter, Fullerton, CA, USA). RNA przepisywano na cDNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy MMLV (Promega) i niespecyficznych starterów (ang. *random primers*) (Promega).

6.13.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Ocenę ekspresji genów przeprowadzono za pomocą ilościowej metody PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) w oparciu o specyficzne sondy TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) w aparacie ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Mieszanina reakcyjna zawierała składniki przedstawione w Tabeli 3, a wykaz sond użytych do doświadczeń w Tabeli 4. Na rycinie nr. 9 przedstawiono schemat reakcji qRT PCR.

TaqMan PCR Master Mix	25 µl
cDNA	100 ng
sonda 20x	2,5 µl
Woda	do końcowej objętości 50 µl

Tabela 3. Składniki mieszaniny reakcyjnej użytej w reakcji qRT-PCR



Rycina 9. Warunki reakcji qRT PC

Sonda TaqMan	Numer (Applied Biosystems)
RUNX2	Hs00231692_ml
PPAR γ	Hs01115513_ml
MET	Hs01565589_m1
HGF	Hs00300159_m1
α COL1	Hs01076780_ml
OSTEOCALC	Hs01587814_ml
PTHr	Hs00896835_ml
MMP2	Hs00234579_m1
MMP9	Hs00234579_m1
TGF β	Hs00998133_m1
IL-8	Hs00174103_m1
IL-11	Hs00899845_ml
IL-1	Hs01055413_ml
VEGF	Hs00173626_m1
FGF2/ β FGF	Hs00266645_m1
HSP90	Hs00743767_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

Tabela 4. Sondy użyte do qRT PCR

Do obliczenia wyników wykorzystano metodę analizy relatywnej ekspresji genu – $\Delta\Delta C_t$, opartą na porównaniu wartości C_t genu badanego i referencyjnego.

6.14 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania *Microsoft Excel* oraz *GraphPad Prism 4.02.*. Eksperymenty wykonywane były, w co najmniej 3 powtórzeniach. Do zeprezentowania w pracy doktorskiej, spośród danych jakościowych (Western Blot, zdjęcia mikroskopowe), wybrano wyniki najbardziej reprezentatywne. Wyniki ilościowe, przedstawiono na wykresach lub w tabelach i wyrażono, jako średnią arytmetyczną z błędem oznaczającym odchylenie standardowe lub błąd standardowy. W podpisach pod wykresami podano ilość powtórzeń, w jakich wykonano eksperymenty i liczebność próby w pojedynczym eksperymencie. Istotność statystyczną różnic między grupami sprawdzano testem t-Studenta lub jednokierunkową analizą wariancji, na poziomie istotności 0,05.

7 WYNIKI

7.1 Rola osi HGF-MET w komórkach szpiczakowych

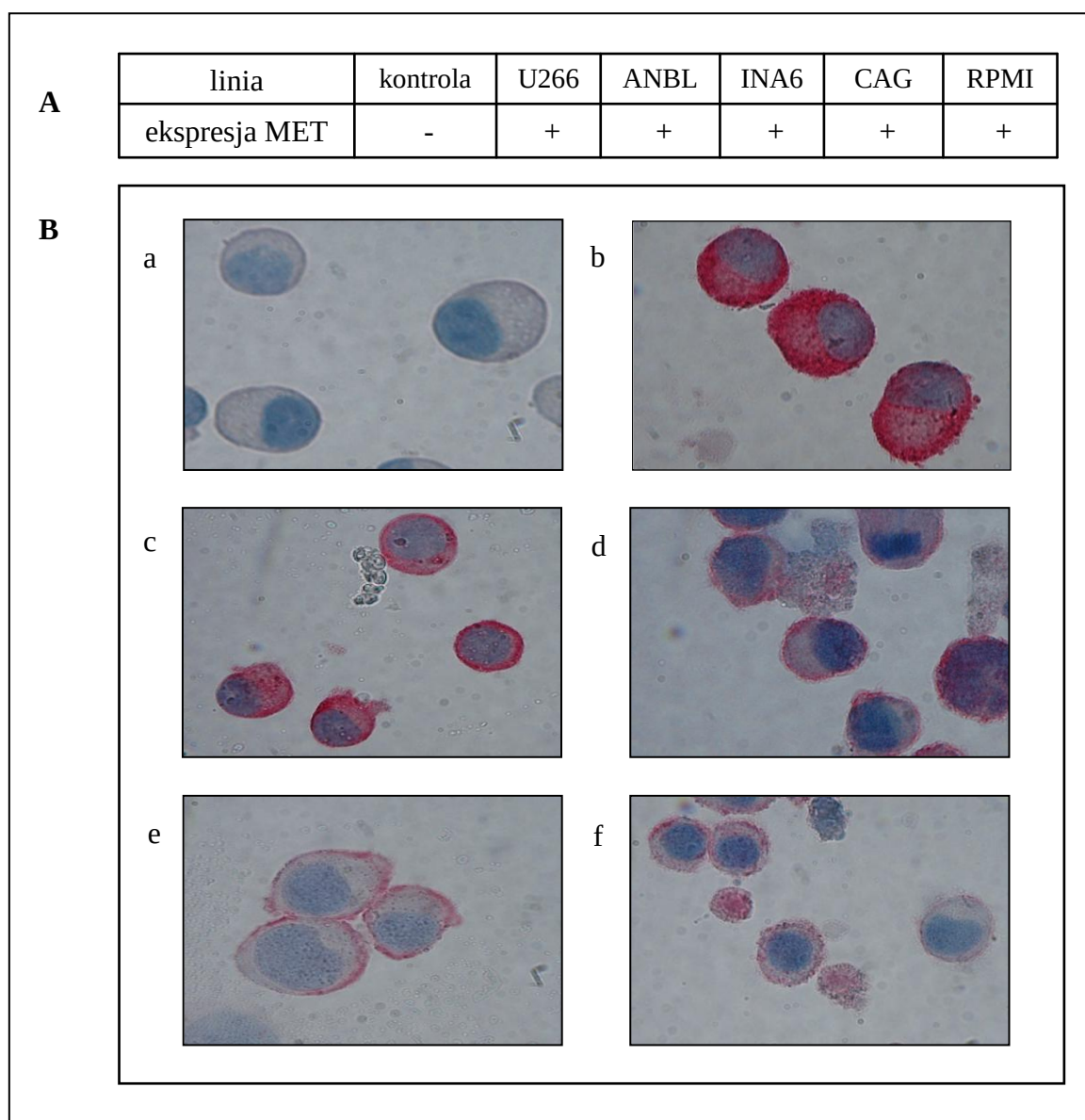
W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano ekspresję receptora MET na komórkach linii szpiczaka mnogiego, zarówno na poziomie mRNA jak i białka.

7.1.1 Obecność mRNA dla MET w komórkach linii MM

W celu zbadania obecności mRNA dla receptora MET w 5 liniach komórek szpiczaka mnogiego U266, ANBL, INA6, CAG oraz RPMI wykonano 3 niezależne eksperymenty z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym. Za kontrolę negatywną posłużyło mRNA wyizolowane z jednojądrzastych komórek krwi pępowinowej (Ryc. 10A).

7.1.1.1 Obecność receptora MET na powierzchni komórek linii MM

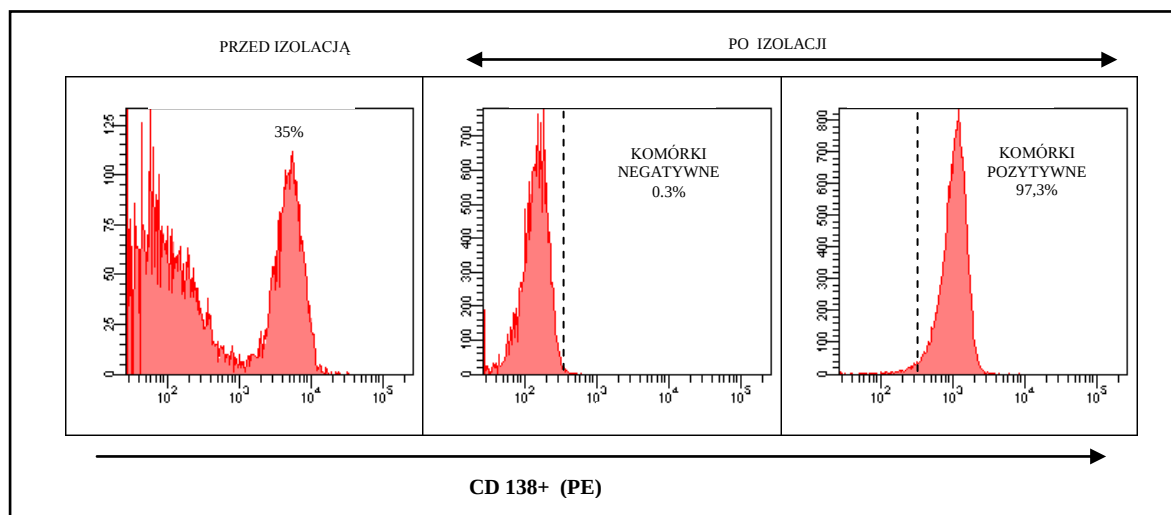
Przy użyciu metody cytospin przygotowano preparaty i przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne komórek linii ludzkiego szpiczaka. Wykazano ekspresję receptora MET na wszystkich przebadanych liniach. Kontrolę negatywną stanowiły preparaty komórek wszystkich badanych linii, które nie były inkubowane z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko MET, ale z odpowiednią kontrolą immunoglobulinową (Ryc. 10B).



Rycina 10. A Obecność mRNA dla MET w komórkach linii MM, B Barwienie immunohistochemiczne komórek linii szpiczaka mnogiego na obecność receptora MET
a komórki kontrolne b-f komórki badanych linii odpowiednio: U266, ANBL, INA6, CAG, RPMI. Zdjęcia reprezentatywne. Powiększenie mikroskopu 200x.

7.1.2 Izolacja komórek posiadających na powierzchni receptor CD138+

Aspiraty szpiku pochodzące od chorych na szpiczaka mnogiego oraz kontrolne poddano wstępnemu oczyszczeniu na gradiencie wielocukrów do komórek jednojądrzastych, a następnie komórki CD138⁺ izolowano przy pomocy systemu MiniMacs. Przy użyciu cytometru przepływowego FACS Canto analizowano czystość przeprowadzonych izolacji (Ryc. 11).

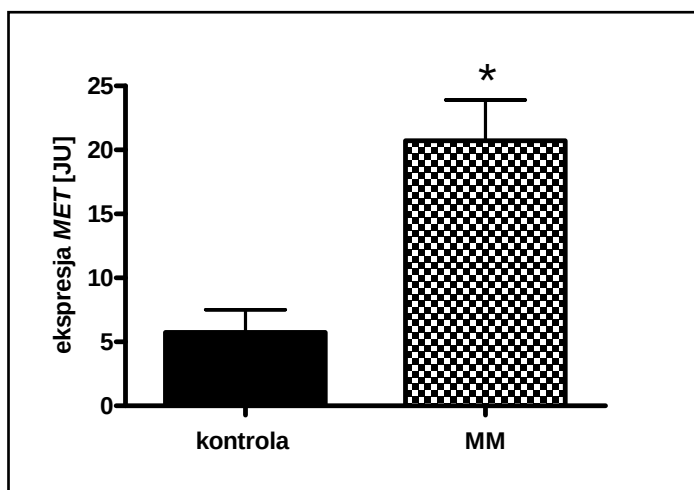


Rycina 11. Czystość izolacji komórek CD138+ z aspitarów szpiku kostnego

Rysunek przedstawia przykładową izolację komórek CD138+, czystość przeprowadzonych izolacji wynosiła 92-99%.

7.1.3 Obecność mRNA dla MET w komórkach pacjentów MM

Zbadano ekspresję MET w wyizolowanych od pacjentów komórkach CD138+ stosując metodę real time PCR. Eksperyment potwierdził znacząco wyższą ekspresję MET w przypadku chorych na szpiczaka mnogiego (Ryc. 12).



Rycina 12. Ekspresja MET w komórkach CD138+ wyizolowanych od zdrowych dawców i chorych na szpiczaka

W przypadku komórek kontrolnych grupa obejmowała 5 próbek (n=5), natomiast w przypadku komórek MM grupa liczyła 7 pacjentów (n=7) *p<0,005.

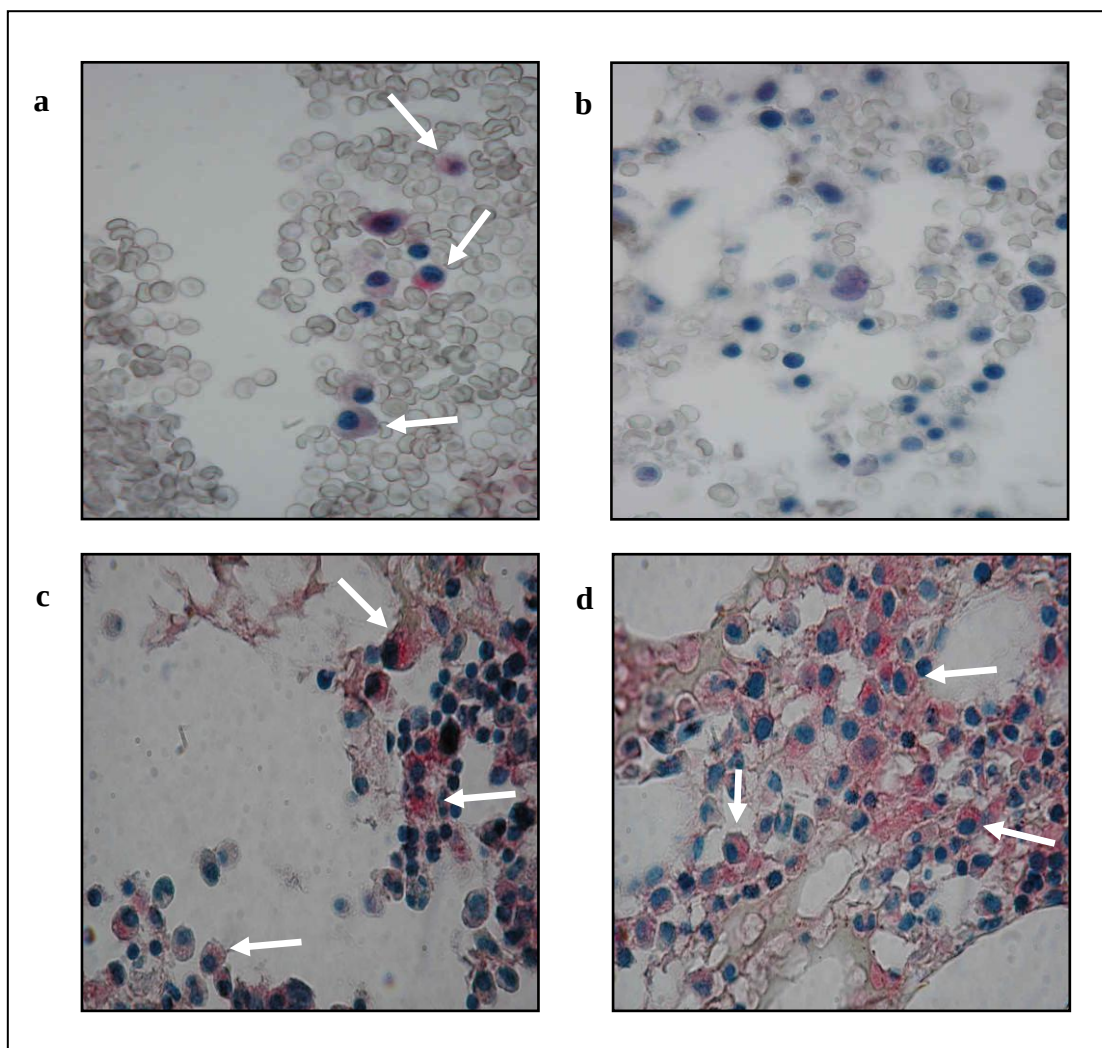
7.1.3.1 Obecność receptora MET na komórkach pacjenów MM

Parafinowe skrawki trepanobiopatów pochodzące od pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego otrzymano dzięki uprzejmości Kliniki Hematologii CMUJ. Na podstawie danych klinicznych, a głównie odpowiedzi klinicznej na leczenie otrzymany materiał podzielono na dwie grupy. Do pierwszej zaliczono: chorych ze słabą odpowiedzią kliniczną na leczenie, do drugiej: chorych z dobrą odpowiedzią na zastosowane leczenie. Wykonano barwienia analogicznie jak w przypadku preparatów cytopinowych linii komórkowych. Po analizie 40 trepanobiopatów – dla każdego pacjenta po 2 preparaty (przed i po leczeniu), ekspresję receptora MET stwierdzono u wszystkich pacjentów ze świeżo rozpoznaną chorobą. W przypadku pacjentów z klinicznie złą odpowiedzią na leczenie wszystkie trepanobiopaty (10) prezentowały ekspresję receptora MET, natomiast u pacjentów z dobrą odpowiedzią na leczenie komórki z ekspresją receptora MET zaobserwowano tylko u 3 z 10 pacjenów. Wyniki barwienia i oceny wybarwionych skrawków przedstawiono w tabeli 5, a przykładowe zdjęcia na rycinie nr 13.

Numer pacjenta	Słaba odpowiedź		Numer pacjenta	Dobra odpowiedź	
	Przed leczeniem	Po leczeniu		Przed Leczeniem	Po leczeniu
1	+	+	1'	+	-
2	+	+	2'	+	-
3	+	+	3'	+	-
4	+	+	4'	+	-
5	+	+	5'	+	+
6	+	+	6'	+	+
7	+	+	7'	+	-
8	+	+	8'	+	+
9	+	+	9'	+	-
10	+	+	10'	+	-

Tabela 5. Ekspresja MET przed i po leczeniu cyklem chemioterapii ze słabą i dobrą odpowiedzią kliniczną na zastosowane leczenie.

+ komórki MET pozytywne, - komórki MET negatywne



Rycina 13. Nacieki plazmocytoów w preparatach parafinowych trepanobiopsatów pochodzących od pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego. Barwienie immunohistochemiczne na obecność receptora MET a i c – przed leczeniem, b i d – po leczeniu podstawowym cyklem chemioterapii. a i b pacjent z dobrą odpowiedzią na leczenie, c i d – pacjent ze słabą odpowiedzią kliniczną na zastosowane konwencjonalne leczenie. Zdjęcia reprezentatywne. Powiększenie mikroskopu 100x.

7.1.4 Wykorzystanie interferencji RNA do blokowania osi HGF-MET w komórkach MM

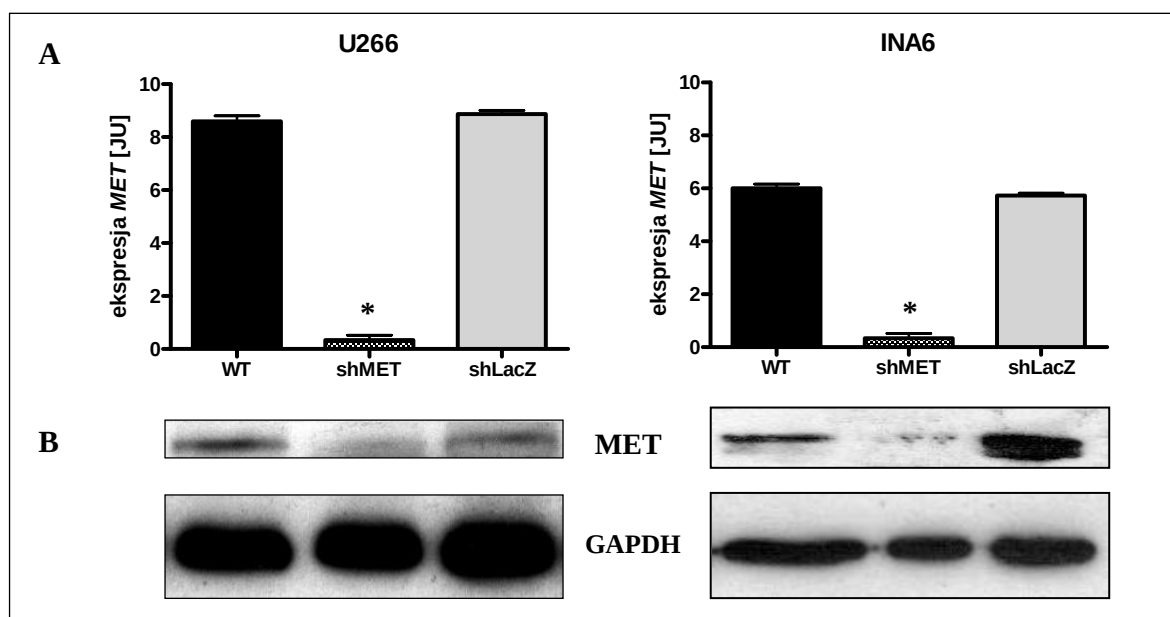
Za pomocą transdukcji wektorem lentiwirusowym skierowanym przeciwko MET, można spowodować znaczące zahamowanie ekspresji genu, które pozwala na otrzymanie linii komórkowych na stałe pozbawionych ekspresji tego receptora.

Wektor lentiwirusowy wykorzystany do doświadczeń oparto o 19 nukleotydową sekwencję siRNA skierowanego przeciw MET 5'- AGU CCG AGA UGA AUG UGA ATT -3'. Jako wektor kontrolny wykorzystano konstrukt zawierający shRNA skierowane przeciw LacZ (gen kodujący bakteryjną β -galaktozydazę).

Zbadano czy stosując konstrukt lentiwirusowy skierowany przeciw mRNA dla receptora MET, można skutecznie obniżyć ekspresję receptora MET zarówno na poziomie mRNA jak i białka w komórkach linii szpiczakowej.

7.1.4.1 Charakterystyka linii MM z receptorem MET i pozbawionych tego receptora

Linie komórkowe U266 i INA6 transdukowano wektorem lentiwirusowym niosącym shRNA skierowane przeciwko MET i LacZ. Wyselekcjonowane pod względem oporności na blastocydynę komórki zbadano w celu określenia ekspresji mRNA genu MET i poziomu białka MET. W liniach transdukowanych wektorem shMET stwierdzono znaczący spadek ekspresji mRNA dla genu MET (Ryc. 14 A). Metoda PCR w czasie rzeczywistym wykazała niską ekspresję MET w stosunku do linii wyjściowych. Spadek poziomu mRNA odzwierciedlał się w obniżeniu ekspresji receptora MET (Ryc. 14 B). Technika Western Blot wykryło znaczący spadek ilości białka MET w porównaniu do linii wyjściowych. W liniach transdukowanych wektorem shLacZ nie stwierdzono natomiast obniżenia zarówno ekspresji mRNA jak i białka MET.

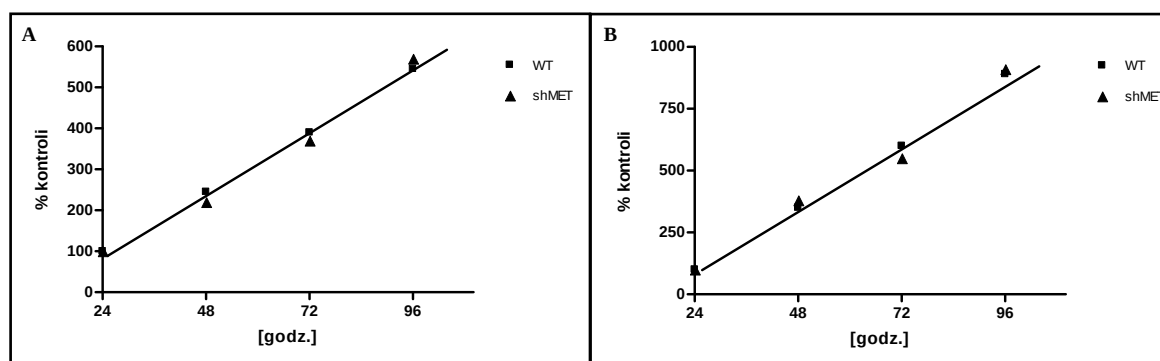


Rycina 14. Ekspresja MET w transdukowanych liniach U266 i INA6.

Ekspresja mRNA dla MET (panel A) i receptora MET (panel B) w liniach transdukowanych wektorem lentiwirusowym. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych pomiarów. *; $p < 0,0001$ w porównaniu z komórkami shLacZ iWT.

7.1.4.2 Zablokowanie osi HGF-MET nie wpływa na wzrost komórek U266 i INA6

Sprawdzono czy obniżenie ekspresji receptora MET wpływa na wzrost transdukowanych komórek U266 i INA6. Komórki typu dzikiego i transdukowane, wysiewano w kompletnej pożywce RPMI na płytki hodowlane 6-dołkowe w koncentracji 2×10^4 /dołek, a następnie liczono w przyjętych odstępach czasowych. Liczbę komórek po 24 godz. przyjęto jako 100% i do tej wartości porównywano kolejno liczbę komórek po 48, 72 i 96 godz. hodowli. Nie stwierdzono różnic w tempie wzrostu pomiędzy komórkami typu dzikiego, a transdukowanymi wektorem (Ryc. 15).



Rycina 15. Porównanie tempa wzrostu komórek typu dzikiego i komórek transdukowanych wektorem lentiwirusowym.

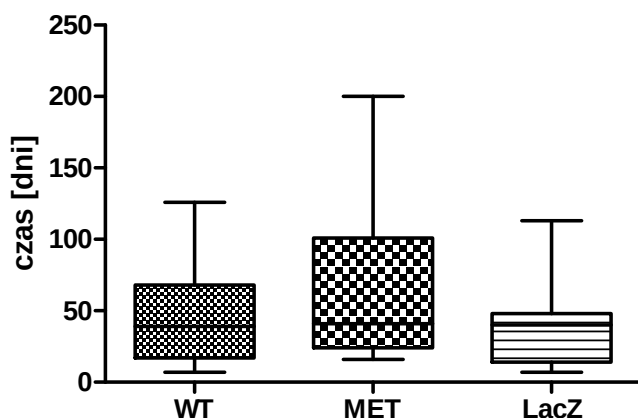
A – porównanie linii U266^{WT} i U266^{shMET}, B – porównanie linii INA6^{WT} i INA6^{shMET}.

7.1.4.3 Zablokowanie osi HGF-MET zwiększa przeżycie myszy NOD-SCID

HGF, wydzielany między innymi przez komórki podścieliska szpiku kostnego, jest silnym chemoatraktantem komórek nowotworowych. Upośledzenie możliwości odpowiedzi na gradient HGF, uzyskane przez obniżenie ekspresji receptora MET, może wpływać na zdolność komórek nowotworowych do migracji i zasiedlania szpiku kostnego. Zbadano zatem, czy wyciszenie receptora MET wpływa na przeżycie myszy NOD-SCID.

Przeprowadzono 3 niezależne doświadczenia z losowo przydzielonymi do 3 grup myszami: WT, MET i LacZ (5 myszy na grupę). Komórki U266 typu dzikiego, komórki o obniżonej ekspresji receptora MET oraz transdukowane wektorem lentiwirusowym LacZ podawano w ilości 5×10^6 napromienionym myszom do unaczynienia oka.

Obniżona ekspresja MET w komórkach szpiczakowych prowadziła do zwiększenia przeżywalności zwierząt. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie. Mediany przeżywalności wynosiły odpowiednio WT – 40 dni, MET – 62 dni, LacZ – 43 dni (Ryc. 16).



Rycina 16. Wpływ obniżenia ekspresji MET w komórkach U266 na przeżywalność myszy NOD – SCID.

7.2 Wpływ GA na wzrost komórek

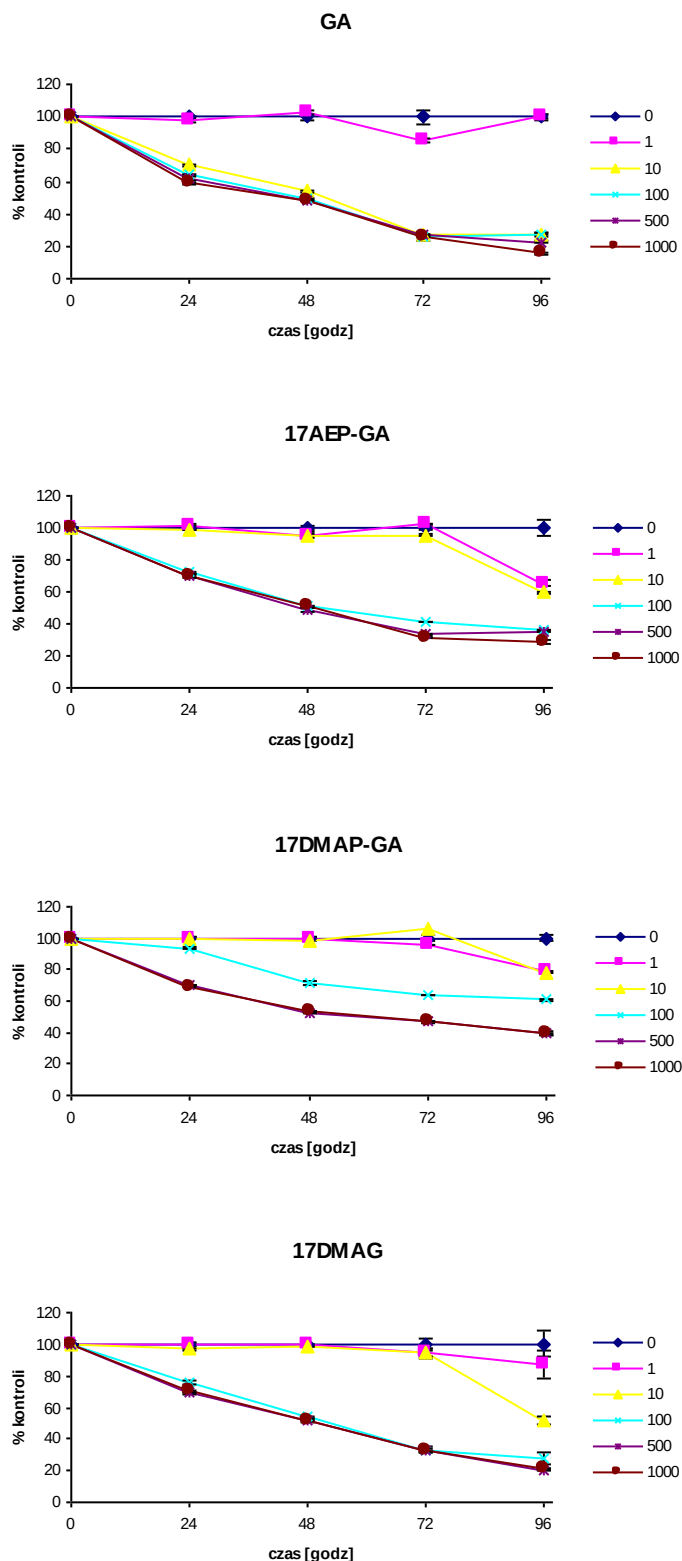
W pierwszym cyklu doświadczeń sprawdzono jak blokowanie białka HSP90 może wpływać na wzrost komórek szpiczakowych.

7.2.1 GA i jej pochodne hamują wzrost komórek linii szpiczakowych

Blokowanie białka HSP90 może wpływać na wiele procesów komórkowych, między innymi na wzrost. Aby określić efekt działania geldanamycyny na wzrost komórek szpiczakowych linii U266, RPMI, CAG wysiewano w kompletnej pożywce RPMI na płytki hodowlane 96-dółkowe (1×10^3 /dółek), a następnie dodawano GA w stężeniach 1, 10, 100, 500 i 1000 nM, po 24, 48, 72 i 96 godz. ekspozycji na inhibitor przeprowadzono test MTS. Wyniki przedstawiono, jako % kontroli, gdzie, jako kontrolę przyjęto komórki niepoddane działaniu GA. Przeprowadzono trzy niezależne eksperymenty.

Stwierdzono, że GA i analogi wpływają negatywnie na komórki MM hamując ich wzrost w sposób zależny od czasu i dawki (Ryc. 17). Zaobserwowano również, że w zależności od użytej linii MM efekt działania GA oraz analogów jest różny (Ryc. 18).

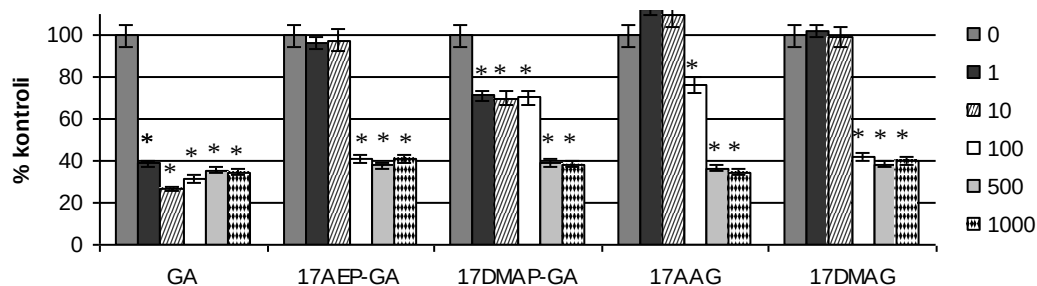
Komórki linii szpiczakowych odpowiadały zahamowaniem proliferacji po zastosowaniu 10 nM GA i 100 nM analogów. Zbadano również czy wpływ GA i analogów na komórki MM jest zależny od czasu ekspozycji. Stwierdzono, że zahamowanie wzrostu MM postępuje wraz z długością inkubacji z inhibitorem. Pierwsze znaczące efekty działania GA na komórki U266 obserwowano już po 24 godz. inkubacji dla dawki 10 nM, natomiast w przypadku analogów dla dawki 100 nM. Zahamowanie wzrostu U266 postępowało wraz z długością inkubacji z inhibitorem. Podobne efekty działania GA i analogów zaobserwowano stosując inne szpiczakowe linie komórkowe (RPMI i CAG). Do dalszych doświadczeń wybrano linię U266 i dawkę 100 nM.



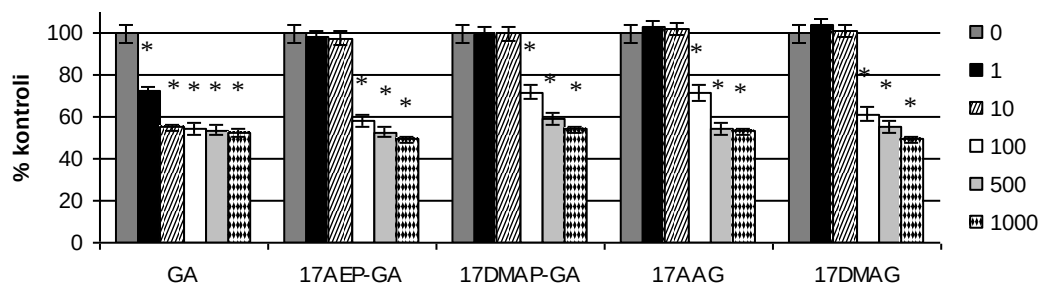
Rycina 17. Wpływ GA i analogów na linię U266 po 24, 48, 72 i 96 godz. inkubacji. Komórki linii szpiczakowej U266 hodowano w 37°C w obecności różnych stężeń (1-1000 nM) GA i analogów. W kolejnych punktach czasowych użyto metodę MTS do zbadania wzrostu komórek U266. Wyniki przedstawiono, jako % kontroli, gdzie, jako kontrolę przyjęto komórki niepoddane działaniu GA. Wykonano trzy niezależne eksperymenty. Przeprowadzono również

analogiczne eksperymenty na liniach RPMI oraz CAG. $p < 0,001$ w porównaniu z kontrolą dla GA i analogów oraz wszystkich punktów czasowych dla stężeń 100, 500 i 1000 nM.

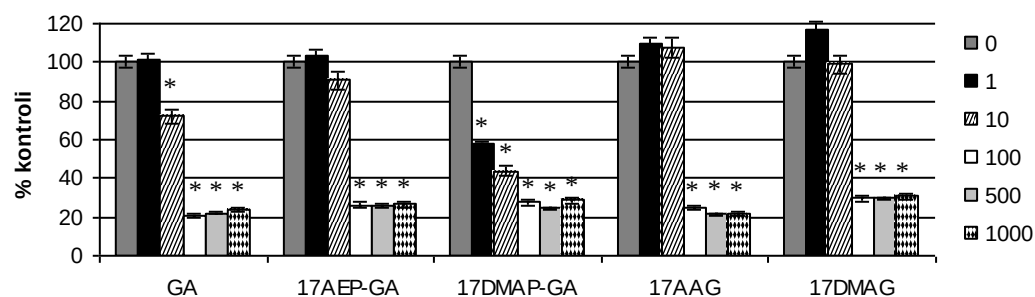
A



B



C

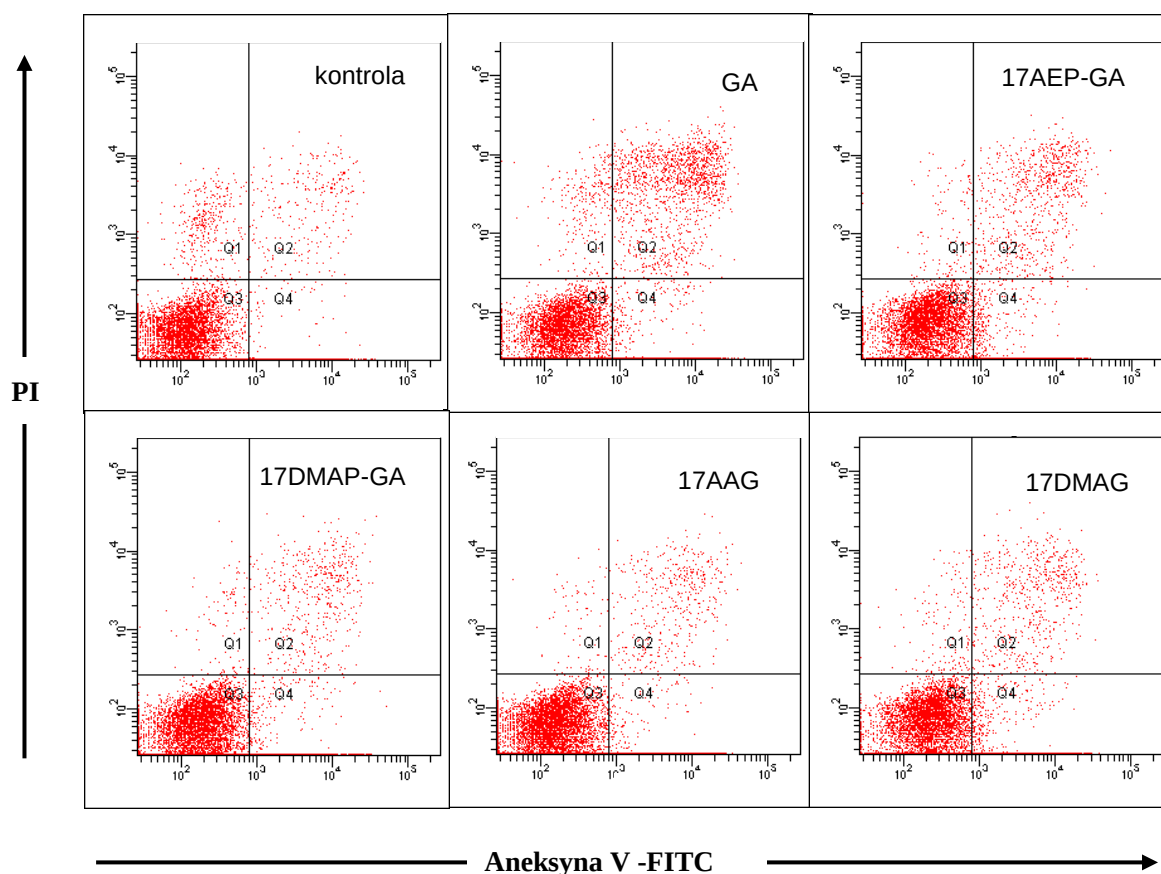


Rycina 18. Wpływ GA i analogów na linie RPMI (A), U266 (B) i CAG (C) po 96 godz. inkubacji. Komórki linii szpiczakowych RPMI U266 oraz CAG poddane 96godz. ekspozycji na działanie GA i analogów poddano analizie metodą MTS. Stężenie GA i analogów użytych w doświadczeniach wynosiło (1-1000 nM). Wyniki przedstawiono, jako % kontroli, gdzie, jako kontrolę przyjęto komórki niepoddane działaniu GA. Wykonano trzy niezależne eksperymenty * $p < 0,005$.

7.2.1.1 GA i jej pochodne wywołują apoptozę komórek szpiczakowych

Zahamowanie wzrostu komórek może wynikać m. in. z indukcji apoptozy oraz zahamowania cyklu komórkowego.

Poprzez barwienie Aneksyną V i jodkiem propidyny zbadano, czy geldanamycyny wywołują apoptozę komórek szpiczakowych. 24 godzinna inkubacja komórek U266 z 100nM GA powodowała pojawienie się populacji komórek zarówno na wczesnych (komórki wiążące Aneksynę V i negatywne pod względem inkorporacji jodku propidyny) jak i późnych etapach apoptozy (komórki wiążące Aneksynę V i gromadzące jodek propidyny) (Ryc. 19).



Rycina 19. Wpływ GA i analogów na apoptozę komórek MM.

Wpływ 24 godz. inkubacji z 100 nM GA i analogów na apoptozę linii U266. Przykładowe wykresy wybrane spośród trzech niezależnych eksperymentów.

48 godz. ekspozycja na 100 nM GA i analogi pogłębiała proces apoptozy, zwiększając odsetek komórek wiążących Aneksynę V. W celu porównania wrażliwości szpiczakowych linii komórkowych zależnych i niezależnych od IL6 przeprowadzono analogiczne eksperymenty na liniach U266 i INA6. Wyniki przedstawiono w Tabeli 6.

	U266		INA6	
	24godz.	48godz.	24godz.	48.godz
GA	+	++	+	+++
17AEP-GA	+	++	+	+++
17DMAP-GA	+	+	+	++
17AAG	+	+	+	++
17DMAG	+	++	+	+++

Zastosowano następujące oznaczenia:

„+” do 30% komórek apoptotycznych,

„++” do 50% komórek apoptotycznych

„+++” powyżej 50% komórek apoptotycznych

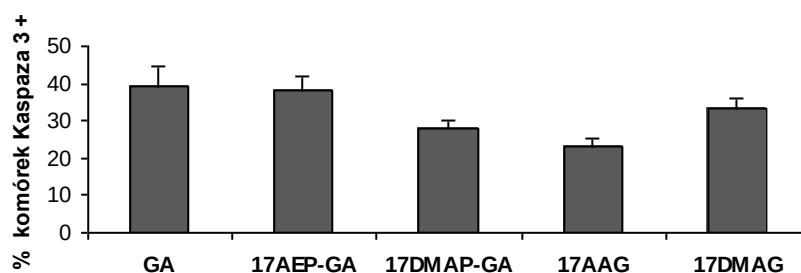
Tabela 6. Wpływ GA na apoptozę komórek MM – wiązanie Aneksyny V.

Wzrost ilości komórek wiążących Aneksynę V w stosunku do kontroli po 24 i 48 godz. ekspozycji na 100 nM dawki GA i jej pochodnych. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów.

17AEP-GA i 17DMAG powodowały apoptozę o zbliżonym nasileniu do działania GA. Linia U266 okazała się być mniej wrażliwa na działanie analogów GA, niż INA6 zależna od IL6. 17DMAP-GA i 17AAG zarówno w przypadku U266 jak i INA6 charakteryzowały się najsłabszym działaniem proapoptotycznym.

Proces programowanej śmierci komórki realizowany jest poprzez aktywację enzymów proteolitycznych – kaspaz, które trawią nieodwracalnie wiele białek cytoplazmatycznych i jądrowych. W przeprowadzonych doświadczeniach zbadano czy GA i jej pochodne powodują aktywację Kaspazy-3.

Zaobserwowano, że w wyniku działania GA i jej pochodnych dochodzi do aktywacji Kaspazy-3 (Ryc. 20). Największy odsetek komórek przejawiających badane cechy apoptozy, zaobserwowano po inkubacji 48 godz. z GA, 17AEP-GA i 17DMAG.

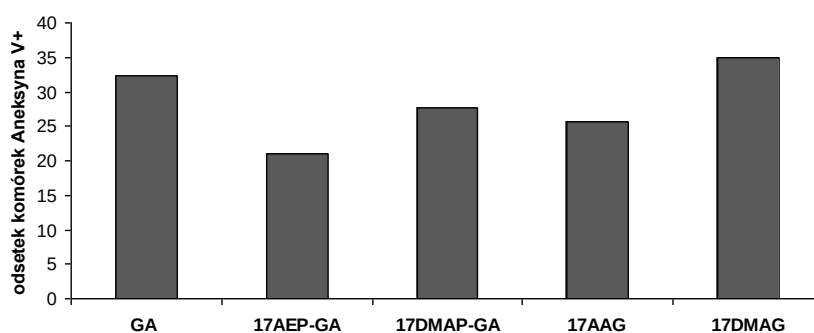


Rycina 20. Wpływ GA i jej pochodnych na aktywność Kaspazy-3 w komórkach U266. Wzrost ilości komórek o zaktywowanej Kaspazie-3 w stosunku do kontroli po 48 godz. ekspozycji na 100 nM dawki GA i jej pochodnych. Wyniki pochodzą z dwóch niezależnych eksperymentów.

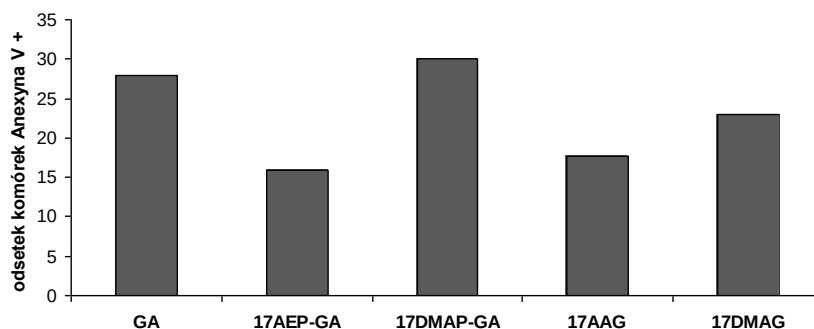
7.2.1.2 GA i jej pochodne wywołują apoptozę komórek szpiczakowych pochodzących od pacjentów

Wyizolowane komórki CD138+ ze szpiku pacjentów chorych na szpiczaka poddano analizie apoptozy. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty (Ryc. 21).

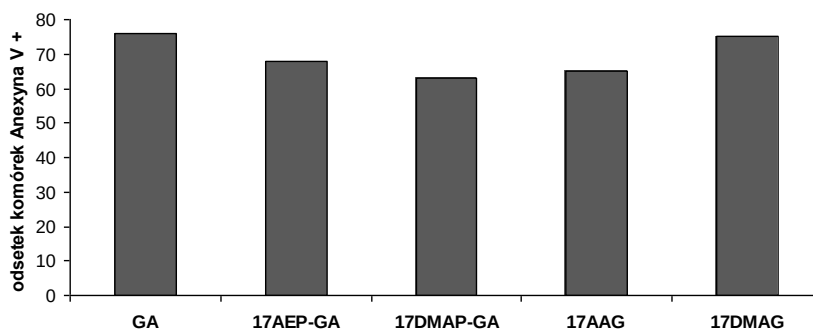
Eksperyment 1



Eksperyment 2



Eksperyment 3

**Rycina 21. Wpływ GA na apoptozę komórek MM – wiązanie Aneksyny V.**

Wzrost ilości komórek wiążących Aneksynę V w stosunku do kontroli po 48 godz. ekspozycji na 100 nM dawki GA i jej pochodnych. Wyniki przedstawiają analizę 3 niezależnych pacjentów.

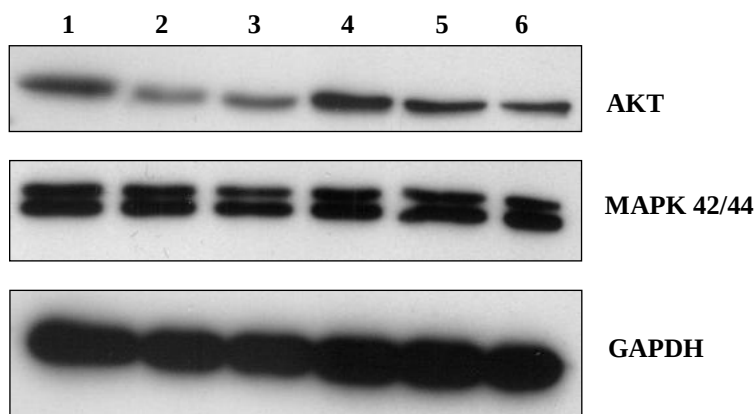
Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazują największy odsetek komórek przejawiających cechy apoptozy po inkubacji 48 godz. z GA i 17DMAG.

7.2.1.3 GA i jej pochodne obniżają ekspresję białka AKT

Wśród wielu białek komórkowych bardzo duże znaczenie odgrywają białka zaangażowane w regulację procesu kontrolowanej śmierci.

Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty badające poziom kinazy AKT jednego z najważniejszych białek kontrolujących proces apoptozy oraz MAP 42/44 mającego wpływ na wpływ na ekspresję genów, podziały, różnicowanie, ruch i apoptozę komórek.

Analizę aktywności kinaz AKT i MAP 42/44 wykonano wykorzystując komórki U266 inkubując je 24 i 48 godz. z 100 nM GA i jej pochodnymi. Przy pomocy metody Western Blot zbadano ekspresję białek. Po 24 godz. inkubacji nie zaobserwowano znaczących zmian w ekspresji białek (dane nie prezentowane w pracy), natomiast po 48 godz. najsilniejsze efekty widoczne były dla białka AKT po zastosowaniu GA i 17AEP-GA (Ryc. 22). Najsilniejsze efekty obserwowano po zastosowaniu GA, 17AEP-GA i 17DMAG.



Rycina 22. Wpływ GA i jej pochodnych na ekspresję białka AKT i MAP.

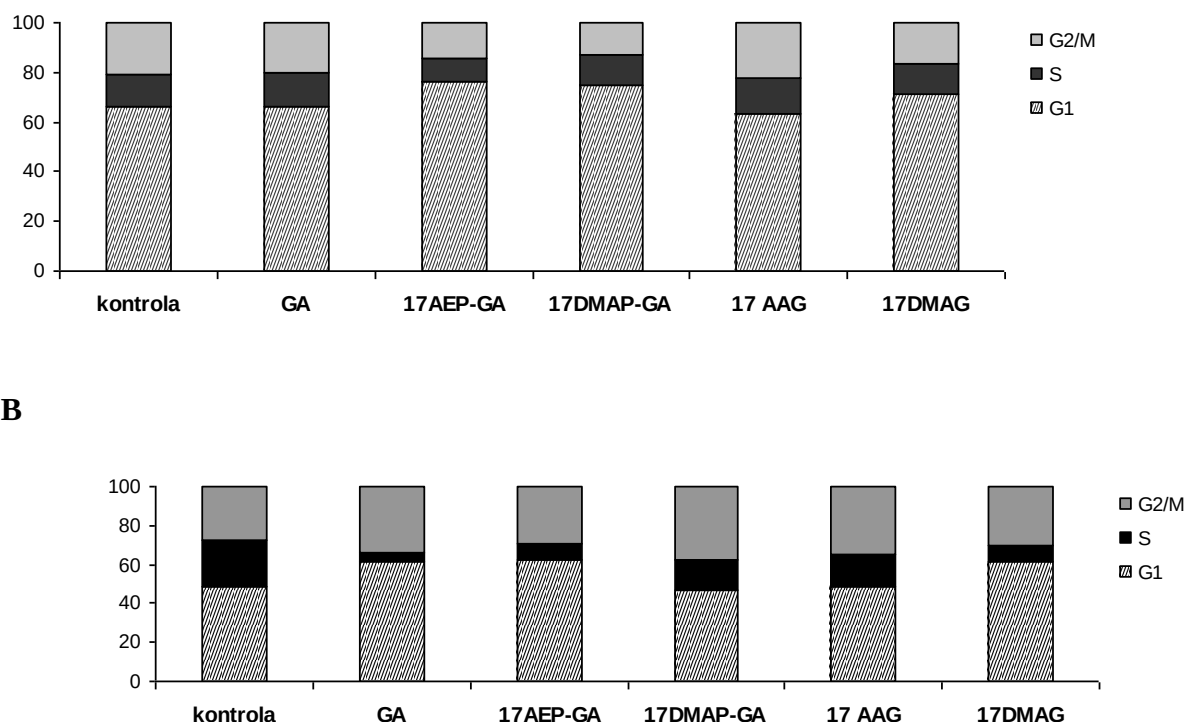
1-kontrola, 2-GA, 3-17AEP-GA, 4-17DMAP-GA, 5-17AAG, 6-17DMAG. GAPDH- kontrolne konstytutywne białko

7.2.1.4 GA i jej pochodne powodują blokadę cyklu komórkowego komórek szpiczakowych

Zahamowanie wzrostu komórek, może być również spowodowane zahamowaniem cyklu komórkowego. Przy użyciu barwienia jodkiem propidyny dokonano analizy cyklu komórkowego po 48 godz. inkubacji z GA i jej pochodnymi. Wykonano trzy niezależne eksperymenty.

Stwierdzono, że 100 nM 17AEP-GA i 17-DMAP-GA powoduje zaburzenia cyklu komórkowego. W komórkach U266 zaobserwowano blokadę w fazie G1 manifestującą się prawie 2-krotnym wzrostem odsetka komórek w tej fazie cyklu i równoczesnym spadkiem odsetka komórek w fazie G2/M (Ryc. 23 A). W przypadku linii INA6 blokada dotyczyła zarówno fazy G1 jak i G2/M. Inkubacja z GA powodowała zwiększenie odsetka komórek w fazie G1 o około 15%, podobnie jak w fazie G2/M, natomiast ilość komórek w fazie S spadała (Ryc. 23 B). Podobny mechanizm zaobserwowano w przypadku pochodnych GA, przy czym efekt działania 17AEP-GA i 17DMAG był najsilniejszy.

A



Rycina 23. Wpływ GA i jej pochodnych na cykl komórkowy MM.

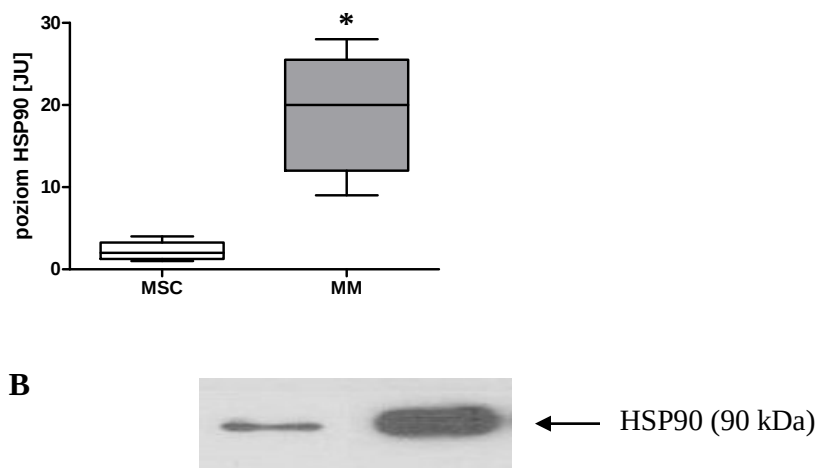
Panel A – linia U266, panel B – linia INA6 (wybrane eksperymenty reprezentacyjne).

7.2.1.5 Ekspresja HSP90 w komórkach MM jest wyższa niż w komórkach prawidłowych

Biorąc pod uwagę, iż komórki prawidłowe i nowotworowe wykazują zróżnicowaną wrażliwość na działanie GA i jej pochodnych, zbadano czy zjawisko to może wynikać z różnic w poziomie ekspresji HSP90.

Z komórek MSC oraz komórek MM pozyskanych z materiału pochodzącego od pacjentów wyizolowano mRNA i białka. Następnie, metoda PCR w czasie rzeczywistym zbadano poziom ekspresji mRNA dla HSP90. Ilość białka HSP90 w komórkach prawidłowych i nowotworowych porównano przy pomocy techniki Western Blot. Zaobserwowano, że komórki nowotworowe mają wyższą ekspresję HSP90 w stosunku do komórek prawidłowych zarówno na poziomie mRNA jak i białka (Ryc. 24 A i B).

A

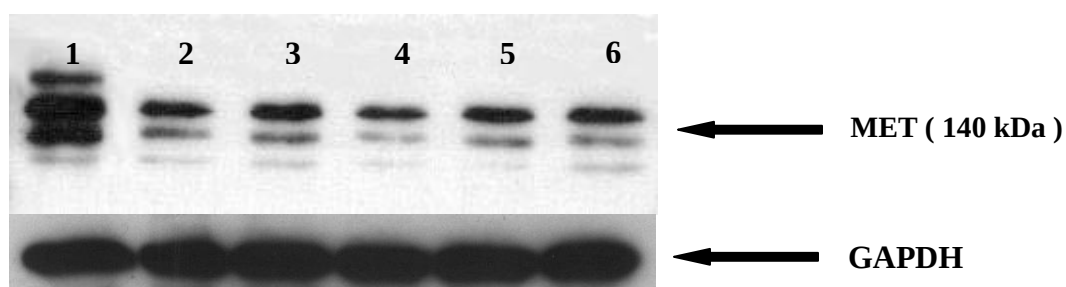


Rycina 24. Ekspresja HSP90 w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

A – ekspresja mRNA dla HSP90, B – ekspresja białka HSP90. *; $p < 0,05$ w porównaniu z poziomem HSP90 w komórkach prawidłowych. W przypadku komórek prawidłowych obejmowały one 4 próbki ($n=4$), natomiast w przypadku komórek MM, grupa liczyła 7 pacjentów ($n=7$).

7.2.2 GA i jej pochodne zmniejszają ekspresję receptora MET w komórkach MM

Receptor MET wchodzi w interakcje z białkiem HSP90. Zbadano zatem, czy inhibitory HSP90 wpływają na ekspresję receptora MET w komórkach MM. Po 48 godz. inkubacji z GA i analogami, metodą Western Blot, określono poziom białka MET. Stwierdzono, że geldanamycyny obniżają ekspresję receptora MET w linii szpiczakowej U266 (Ryc. 25).



Rycina 25. Wpływ GA i jej pochodnych na ekspresję białka MET w komórkach MM
1-kontrola, 2-GA, 3-17DMAP-GA, 4-17DMAG, 5-17AAG, 6-17AEP-GA.

7.3 Wpływ mikrośrodowiska szpiku kostnego na rozwój szpiczaka mnogiego

Badania dotyczące roli mikrośrodowiska szpiku kostnego przeprowadzono na populacji komórek mezenchymalnych, które posiadają potencjał różnicowania w komórki kościotwórcze zdolne do tworzenia prawidłowej struktury tkanki kostnej.

W tej części projektu badawczego porównano właściwości MSC izolowanych ze szpiku kostnego pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego z grupą kontrolną zdrowych dawców. Analizę oparto na potencjale do wzrostu komórek mezenchymalnych oraz ocenie ekspresji genów.

7.3.1 Charakterystyka komórek MSCs

Przeprowadzono izolację komórek jednojądrzastych z aspiratów szpiku kostnego. Wyizolowane komórki wysiano w medium różnicującym DMEM w celu hodowli komórek MSCs. Taką samą procedurę zastosowano dla materiału pochodzącego od pacjentów chorych na szpiczaka oraz próbek kontrolnych. Selekcjonowano komórki adherentne o fenotypie MSCs.

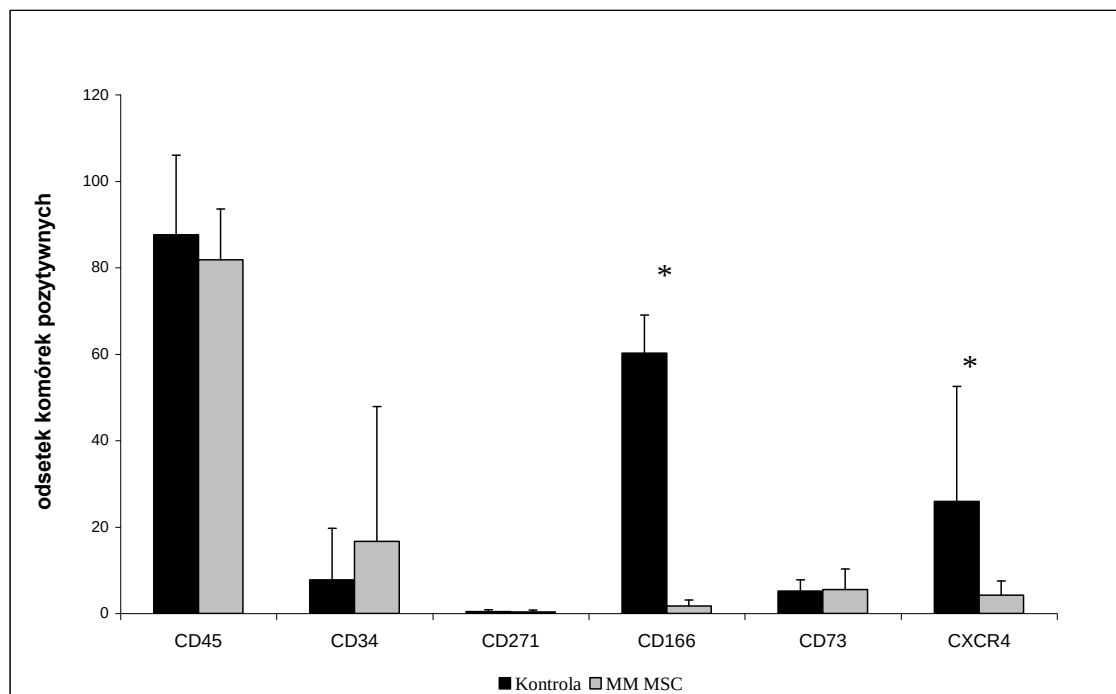
Podczas przeprowadzanych hodowli zaobserwowano mniejszą liczbę komórek przyklejających się do podłoża w przypadku komórek mezenchymalnych pochodzących od chorych na szpiczaka (MM MSC). Komórki MM-MSC proliferowały wolniej, niż MSC kontrolne.

7.3.1.1 Analiza fenotypowa komórek MSCs

W celu sprawdzenia profilu antygenowego MSC wyizolowanych z aspiratów szpiku chorych na szpiczaka oraz zdrowych dawców dokonano analizy cytofluorymetrycznej. Komórki scharakteryzowano pod względem obecności antygenów typowych dla MSC: CD166, CD73 i CD271 oraz antygenów typowych dla linii hematopoetycznej: CD45, CD34 oraz CXCR4.

W tym celu komórki inkubowano z odpowiednim przeciwciałem i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACS Canto. Aby zweryfikować fenotyp wyizolowanych komórek przeprowadzono analizę dla 5 pacjentów w każdej z grup. Jak wskazują wyniki, MM-MSC wykazywały zbliżony fenotyp względem takich antygenów powierzchniowych jak CD271 i CD73. Różnice istotne statystycznie stwierdzono w przypadku CD166 i CXCR4.

Jednocześnie stwierdzono, że komórki te posiadały markery typowe dla komórek krwiotwórczych, gdyż ekspresja antygenów: CD45 i CD34 występowała na dość wysokim poziomie.

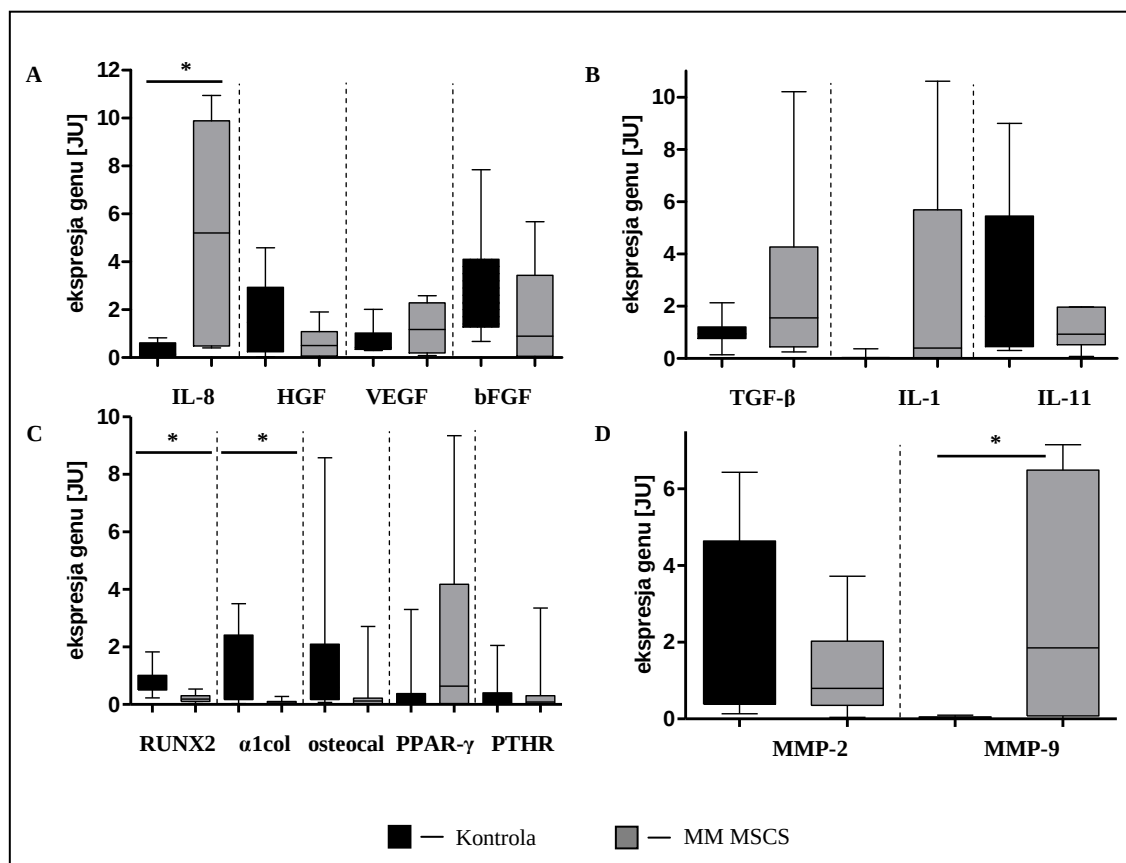


Rycina 27. Porównanie profilu antygenowego MSC kontrolnych oraz MM MSC. Komórki barwiono za pomocą odpowiednich przeciwciał i analizowano metodą FACS. Uzyskano różnice statystycznie istotne dla antygeny CD166 oraz CXCR4; N=5, *p<0,05

7.3.1.2 Analiza genotypu

MSC po 3 pasażu poddano analizie genotypowej wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym. Sprawdzono poziom ekspresji genów zaangażowanych w różnicowanie w osteocyty, w tym, dla genów aktywnych we wczesnych etapach różnicowania, czyli Runx2 i PPAR- γ oraz charakterystycznych dla późnych etapów, w tym dla osteokalcyny czy kolagenu- α (Ryc. 26 C), genów metaloproteinaz 2 i 9, które degradują zdenaturowany kolagen i składniki błony komórkowej (Ryc. 26 D). Przeprowadzono również analizę IL11 będącej cytokiną produkowaną przez osteoblasty, eozynofile i komórki podścieliska szpiku kostnego, IL1 – cytokiny prozapalnej i transformującego czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β – TGF- β) biorącego udział w regulacji proliferacji i różnicowania komórek osteogennych

(Ryc. 26 B), oraz panelu genów związanych z angiogenezą (IL8, HGF, VEGF i bFGF) (Ryc. 26 A). Uzyskane wartości przeliczano względem kontroli endogennej GAPDH i przedstawiono na wykresach w jednostkach umownych.



Rycina 26. Analiza poziomu ekspresji genów MM MSC i MSC po 3 pasażu.

Komórki hodowano na płytkach 6-dółkowych w pożywce DMEM z 10% FBS dla MSC, 2 mM L-glutaminą i antybiotykami. Po 3 pasażu komórki lizowano za pomocą buforu RLT i izolowano z nich RNA zestawem RNeasy Mini Kit (Qiagen), które przepisywano na cDNA i wykorzystywano do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki normalizowano względem kontroli wewnętrznej GAPDH.

Wykresy przedstawiają poziom mRNA dla genów: A - IL8, HGF, VEGF ; B – TGF-β, IL-1, IL-11 ; C - RUNX2, α1col, osteocal, PPAR-γ, PTHR; D – MMP-2, MMP-9

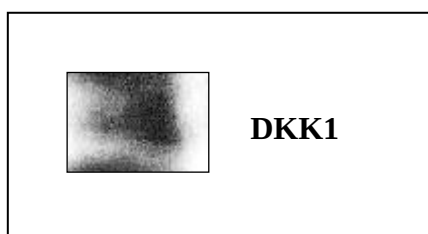
Słupki na wykresach przedstawiają zakres wyników od 25% do 75% percentyla, a linia pozioma symbolizuje medianę. Linia pozioma wskazuje zakres wartości od minimum do maksimum. N=10; JU- jednostki umowne, * p<0,05.

Analizując poziom ekspresji poszczególnych genów zaobserwowano istotny statystycznie wzrost dla IL-8 i MMP-9 w MM MSC. Pozostałe zauważalne wzrosty w ekspresji genów TGF-β, IL-1, VEGF czy PPAR-γ nie wykazywały istotności statystycznej.

Z kolei poziom ekspresji genów RUNX2 i α1col spadł znacząco w porównaniu do poziomu w kontrolnych komórkach mezenchymalnych.

7.3.2 Charakterystyka mikrofragmentów błonowych

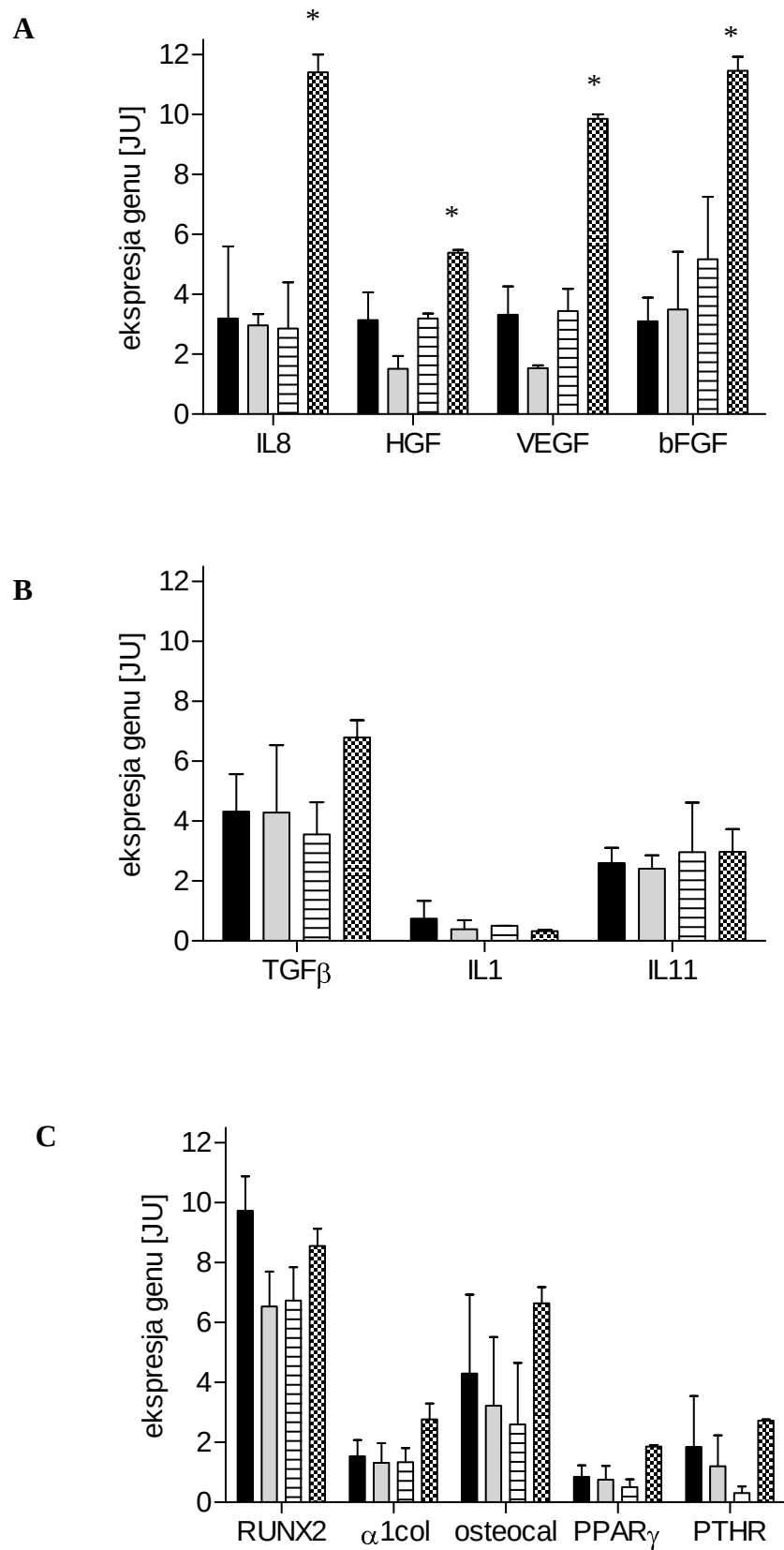
W celu wyizolowania mikrofragmentów błonowych (MFB) z nadsączy hodowanej linii szpiczakowej U266 zastosowano metodę trzykrotnych wirowań. Wyizolowane w ten sposób mikrofragmenty przygotowano do analizy przy pomocy natywnej metody Western Blot w i liacie białkowym potwierdzono ekspresję białka Dikkopf-1 zaangażowanego w szlak sygnałowania WNT, a przez to procesy osteolizy kości (Rycina 28).



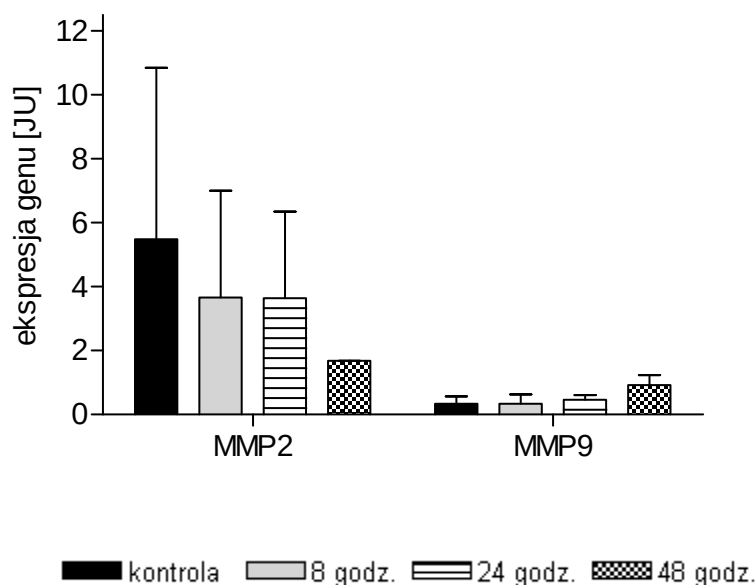
Rycina 28. Ekspresja DKK1 w lizatach MFB

7.3.2.1 Wpływ stymulacji komórek MSCs przez mikrofragmeny błonowe na różnicę w ekspresji genów

W celu zbadania wpływu szpiczakowych mikrofragmentów błonowych na komórki mezenchymalne przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty. Stymulacja MM MFB o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ została przeprowadzona na komórkach mezenchymalnych po 3 pasażu. Analizę genotypową przeprowadzono wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym dla 3 punktów czasowych 8, 24 i 48 godz. Na rycinie nr 29 przedstawiono wykresy dla poszczególnych paneli genów (zastosowano analogiczny zestaw sond jak w porównaniu genotypu MM MSC i MSC).



D



Rycina 29. Analiza poziomu ekspresji genów MSC i MSC po 8, 24 i 48 godz. stymulacji MM MFB.

Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych w pożywce DMEM z 10% FBS dla MSC, 2 mM L-glutaminą i antybiotykami. Po 3 pasażu komórki poddano stymulacji MM MFB w stężeniu 20 µg/ml. Po zakończeniu stymulacji komórki lizowano za pomocą buforu RLT i izolowano z nich RNA zestawem RNeasy Mini Kit (Qiagen), które przepisywano na cDNA i wykorzystywano do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki normalizowano względem kontroli wewnętrznej GAPDH

Wykresy przedstawiają poziom mRNA dla genów: A – IL-8, HGF, VEGF ; B - TGF β, IL-1, IL-11 ; C - RUNX2, α1col, osteocal, PPAR-γ, PTHR; D – MMP-2, MMP-9, *p<0.05

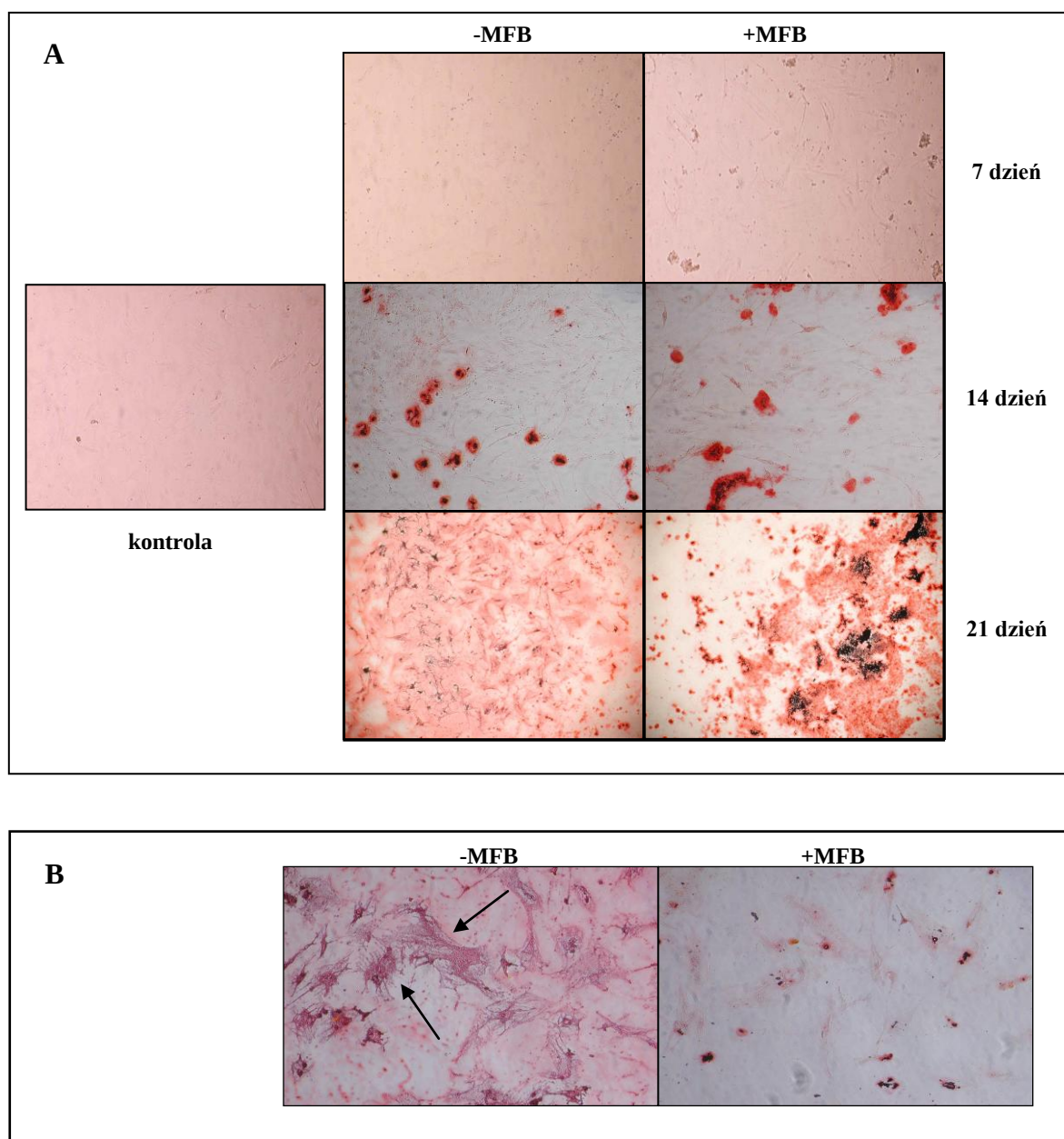
Największe wzrosty w ekspresji genów zaobserwowano po 48 godzinnej stymulacji. Dla IL-8, HGF, VEGF i βFGF były to różnice istotne statystycznie

7.3.3 Różnicowanie MSC w obecności lub braku obecności mikrofragmentów błonowych

Aby porównać potencjał MSC do różnicowania w osteoblasty komórki będące na 3 pasażu poddano osteoindukcji.

W tym celu $3-5 \times 10^4$ komórek wysiewano na płytki 6-dołkowe i prowadzono hodowlę przez 7, 14 i 21 dni w medium różnicującym, zawierającym deksametazon, β-glicerofosforan oraz kwas askorbinowy. Pożywkę zmieniano raz w tygodniu. Po tym czasie, wydzielone przez komórki złogi fosforanu wapnia wybarwiono za pomocą

alizarynu red S. Proces osteoindukcji prowadzony był również w obecności MM MFB (Ryc. 30).



Rycina 30. Osteoindukcja MSC w obecności MM MFB.

Komórki hodowano przez 7, 14 i 21 dni w medium różnicującym (DMEM z 10% FBS, deksametazon, β -glicerofosforan oraz kwas askorbinowy). Następnie komórki utrwalono w 4% paraformaldehynie i złogi fosforanu wapnia wybarwiono za pomocą alizarynu red S. Doświadczenie przeprowadzono przy 3 pasażu komórek. Oznaczenia: **+ MFB**- różnicowanie przeprowadzone w obecności 20 μ l/ml szpiczakowych mikrofragmentów błonowych, **-MFB**- różnicowanie bez udziału dodatkowych czynników **Kontrola** – komórki nie zróżnicowane. Zdjęcia wykonano przy powiększeniu mikroskopu 100X (A) oraz powiększeniu mikroskopu 200X (B). Przedstawiono zdjęcia reprezentatywne.

Otrzymane rezultaty pokazują, że komórki MSC poddane różnicowaniu w obecności MM MFB obumierają i nie jest możliwe ich różnicowanie w osteoblasty i obserwacja złogów fosforanowych.

8 DYSKUSJA

8.1 Komórki linii szpiczakowych i wyizolowane od pacjentów chorych na MM wykazują ekspresję MET na poziomie mRNA i białka

W przedstawionej pracy wykazano ekspresję mRNA i białka MET we wszystkich szpiczakowych liniach komórkowych (Ryc. 10 i 14).

Eksperyment potwierdzający obecność receptora MET na materiale pochodzącym od 20 pacjentów chorych na MM przeprowadzono na 40 skrawkach trepanobiopsatów szpiku kostnego pacjentów chorych na MM (20 przed leczeniem i 20 po leczeniu). Wszystkie preparaty zdiagnozowanych pacjentów przed rozpoczęciem leczeniem wykazywały obecność receptora MET na powierzchni. Barwienia trepanobiopsatów pochodzących od tych samych pacjentów wykonano powtórnie po odbytym leczeniu i w zależności od odpowiedzi na zastosowaną terapię przydzielono do 2 grup: z dobrą oraz złą odpowiedzią. Wszystkie skrawki pacjentów zaliczonych do grupy ze złą odpowiedzią prezentowały receptor MET na swojej powierzchni, natomiast w grupie z dobrą odpowiedzią jedynie 3 z 10 pacjentów wykazywało ekspresję receptora MET. Badania przeprowadzono metodą barwień immunohistochemicznych (Tabela 5, Ryc. 9).

Ze świeżo pobranych aspiratów szpiku chorych na szpiczaka wyizolowano komórki CD138 i dokonano analizy poziomu mRNA dla genu MET, jako grupa kontrolna posłużyły komórki wyizolowane ze szpiku zdrowych dawców. Zaobserwowano podwyższony poziom MET u chorych na MM, różnice w poziomie ekspresji genu były istotne statystycznie.

Badania te potwierdzają obecność MET zarówno na poziomie mRNA i białka we wszystkich ustalonych liniach komórkowych jak i materiale klinicznym chorych na szpiczaka mnogiego. W preparatach pacjentów z dobrą odpowiedzią na leczenie poziom receptora MET był niewykrywalny, co sugeruje celowość dalszych badań związanych z wyciszeniem tego białka.

8.2 Interferencja RNA pozwala na skuteczne zablokowanie osi HGF-MET

Wiele grup badawczych prowadzi badania nad specyficznym wyciszeniem receptora MET. Hov i współpracownicy testowali PHA-665752 małą cząsteczkę działającą bezpośrednio na receptor MET. Badania przeprowadzono na linii

szpiczakowej ANBL6. Zaobserwowali oni zahamowanie proliferacji, migracji i adhezji po zastosowaniu tego inhibitora i jego potencjalne wykorzystanie w terapiach celowanych w leczeniu szpiczaka mnogiego [59]. Poszukiwanie nowych metod zablokowania receptora MET było również celem niniejszej pracy.

Wykorzystanie zjawiska interferencji RNA pozwala na specyficzne obniżenie ekspresji danego genu. W warunkach *in vitro* siRNA można dostarczać do komórki bezpośrednio [35] lub w postaci wektorów ekspresyjnych zawierających shRNA [126]. Zastosowanie systemów wirusowych pozwala na osiągnięcie długotrwałych efektów wyciszenia oraz zapewnia wysoką powtarzalność uzyskiwanych wyników.

W przeprowadzonych badaniach w celu zmniejszenia ekspresji mRNA dla MET użyto systemu lentiwirusowego. Stwierdzono, że transdukcja komórek U266 oraz INA6 przygotowanym na bazie uprzednio testowanego siRNA wektorem pozwala skutecznie wyciszyć ekspresję MET zarówno na poziomie mRNA jak i białka (Ryc. 14). W wyniku dalszych analiz stwierdzono, że transdukowane linie komórkowe U266 i INA6 nie wykazują różnic w tempie wzrostu w porównaniu z typem dzikim (Ryc. 15). Taulli badając komórki mięsaka prąkowanokomórkowego transdukowane wektorem lentiwirusowym zawierającym shRNA skierowane przeciwko receptorowi MET, obserwował nie tylko zahamowanie migracji, ale i proliferacji komórek [143]. Zaistniałe różnice wynikają prawdopodobnie z zastosowania różnych układów eksperymentalnych oraz różnych typów nowotworów. Taulli i wsp. wykorzystali wektor indukowany obecnością doksocykliny oceniając wpływ zahamowania receptora MET na przestrzeni 5 dni od indukcji RNAi. W niniejszej pracy natomiast zastosowano linie o konstytutywnie obniżonej ekspresji receptora MET, a doświadczenia prowadzono po upływie co najmniej 3 tygodni od wprowadzenia wektora. Prawdopodobnie wydłużenie czasu ekspozycji na shRNA pozwoliło komórkom na wypracowanie mechanizmu pozwalającego na uniknięcie apoptozy, jednak hipoteza ta nie została doświadczalnie potwierdzona.

W prezentowanej pracy postawiono pytanie, czy zablokowanie osi HGF – MET przy pomocy wektorów lentiwirusowych może stanowić potencjalną terapię leczenia szpiczaka mnogiego.

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, czy zablokowanie osi HGF-MET wpływa na przeżywalność myszy NOD - SCID. Podzielone na 3 grupy myszy po zaszczepieniu linią U266 typu dzikiego (WT) oraz transdukowanych (MET i LacZ) obserwowano i odnotowywano dzień śmierci po przeszczepie.

Komórki podścieliska szpiku kostnego myszy w wyniku napromienienia silnie zwiększają produkcję HGF, który jest chemoatraktantem dla komórek z ekspresją receptora MET na powierzchni [65]. Wskutek wzrastającego gradientu HGF, podane do krwioobiegu komórki MM osiedlają się w szpiku kostnym. W prezentowanej pracy wykazano, że zablokowanie osi HGF-MET w komórkach MM powoduje utratę zdolności zasiedlania szpiku kostnego myszy NOD-SCID.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazują, że w przypadku grupy z wyciszoną ekspresją receptora MET myszy przeżywały najdłużej (Ryc. 16), natomiast w barwieniach histochemicznych potwierdzono infiltrację szpiku kostnego kości długich przez atypowe komórki jedynie w przypadku myszy zaszczepionych linią U266 typu dzikiego. Obniżenie ekspresji receptora MET w komórkach szpiczakowych powoduje prawdopodobnie utratę zdolności do ukierunkowanej migracji w kierunku HGF. W przeprowadzonych doświadczeniach nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek szpiczakowych z obniżoną ekspresją receptora MET.

8.3 Geldanamycyna hamuje wzrost komórek MM.

Przeciwnowotworowe działanie GA wynika przede wszystkim z i) hamowania aktywności białek promujących proliferację, takich jak RAF-1, ii) obniżenia ekspresji zmutowanych lub produkowanych w nadmiarze białek onkogennych, iii) hamowania aktywności białek warunkujących przeżywanie komórek, np. AKT, iv) blokowania cyklu komórkowego, v) hamowania angiogenezy oraz vi) obniżenia inwazyjności i zdolności do przerzutowania [152, 123, 76, 12, 8]. W prezentowanej pracy sprawdzono wpływ GA na niektóre z wyżej wymienionych procesów, m.in. proliferację komórek MM, apoptozę, cykl komórkowy, ekspresję kinazy AKT oraz ekspresję białka onkogennego MET.

W dotychczasowych publikacjach wykazano zróżnicowaną wrażliwość na działanie GA w badaniach *in vitro* w różnych nowotworach. Dla linii komórkowych glejaka IC₅₀ (50% zahamowania wzrostu) oszacowano na 0,4 – 3 nM, linii raka piersi na 2 – 20 nM, linii drobnokomórkowego raka płuc na 50-100 nM, linii raka jajnika 2000 nM, a w przypadku linii białaczki limfocytarnej pomiędzy 10, a 700 nM [53, 69, 93, 159]. Efekt biologiczny, jaki wywołuje GA dotyczy szerokiego spektrum szlaków wewnątrzkomórkowych nadzorowanych przez HSP90. Komórki nowotworowe

wykazują zróżnicowaną zmienność genetyczną, co w efekcie wiąże się z różnym profilem białkowym, a to może wpływać na podatność komórek na działanie GA [90].

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że GA powoduje zahamowanie proliferacji komórek MM (Ryc. 17). Wykazano, że badane linie komórkowe MM charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością (Rycina 18). Wybrane stężenie 100 nM dla linii U266 nie odbiega od zakresu wartości dawek geldanamycyny wyznaczonych dla innych linii komórkowych.

Zmienność genetyczna komórek nowotworowych może prowadzić nie tylko do zróżnicowanej wrażliwości na działanie GA, ale także powodować odmienne efekty biologiczne [90]. Wykazano, iż GA może indukować zahamowanie cyklu komórkowego na różnych jego etapach [8], wywoływać apoptozę czy różnicowanie się komórek [103].

W komórkach MM wykazano, że już 24 godz. inkubacja z GA powoduje pojawienie się wczesnych oznak apoptozy, takich jak zaburzenie symetrii błony komórkowej. Uruchomienie programu apoptozy związane jest z aktywacją kaspaz, wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. Stwierdzono, że w wyniku działania GA, w komórkach MM dochodzi do aktywacji kaspazy-3. Zależną od GA aktywację kaspazy-3 prowadzącą do apoptotycznej śmierci, wykazano wcześniej także w przypadku linii komórkowych komórek białaczkowych [76].

GA, wchodząc w interakcje z białkiem HSP90, inicjuje zależną od ubikwityny degradację wielu białek komórkowych, takich jak AKT, RAF-1 czy CDK-4 [23]. Podobnie jak w przypadku linii komórkowych kostniakomięsaka czy nerwiaka [3, 76], wykazano, iż GA znacząco obniża ekspresję białka AKT w linii komórkowej U266 (Rycina 22). Kinaza AKT należy do białek kontrolujących proces programowanej śmierci komórki. Aktywacja kinazy AKT prowadzi równocześnie do indukcji czynników antyapoptotycznych, takich jak NFkB oraz hamowania czynników proapoptotycznych, np. BAD [16]. Obniżenie ekspresji AKT zaburza równowagę sygnałów kontrolujących przeżywalność komórki, a w konsekwencji może prowadzić do apoptozy. Wydaje się więc, że jedną z przyczyn zależnej od GA apoptozy komórek MM, może być obniżenie ekspresji białka AKT.

Innym z przejawów działalności GA jest zahamowanie cyklu komórkowego, przy czym mechanizm tej blokady zależy od typu nowotworu, a bardzo często nawet od typu linii komórkowej. Najczęściej obserwuje się blokadę fazy G₂/M powodującą akumulację komórek w tej fazie spowodowaną niemożnością zakończenia pełnego

podziału mitotycznego [73, 108]. Rzadziej odnotowuje się blokadę w fazie G_1 [138]. Srethapakdi i wsp. wykazali, że w liniach komórkowych raka piersi wystąpienie blokady w fazie G_1 , wywołane zahamowaniem białka HSP90, koreluje z obecnością funkcjonalnego białka RB [138].

Również w przypadku MM, GA powoduje zahamowanie cyklu komórkowego, przy czym mechanizm tego zjawiska wydaje się być odmienny dla różnych komórek. W przypadku linii U266 zaobserwowano akumulację komórek w fazie G_1 , podczas gdy w przypadku linii INA6 odnotowano także blokadę w fazie G_2/M . Możliwe, że przyczyną tego zjawiska są różnice genetyczne pomiędzy tymi komórkami.

Receptor MET jest jednym z białek docelowych dla HSP90 [23]. Webb i wsp. zademonstrowali, że GA powoduje obniżenie ekspresji receptora MET w komórkach nowotworowych, powodując tym samym zahamowanie zależnej od HGF aktywacji plazminogenu typu urokinazowego [152]. Zaburzenia aktywacji plazminy mogą prowadzić do upośledzenia procesu trawienia macierzy zewnątrzkomórkowej, a co za tym idzie ograniczenia zdolności do przerzutowania komórek nowotworowych. Obniżenie ekspresji receptora MET może również wpływać na zahamowanie aktywności migracyjnej komórek nowotworowych, jak wykazano na przykładzie drobnokomórkowego raka płuc [93].

W przeprowadzonych badaniach 100 nM GA powoduje obniżenie ekspresji białka MET w komórkach U266.

8.4 Pochodne geldanamycyny wpływają w podobny sposób na komórki szpiczakowe jak GA

Mimo zachęcających rezultatów, jakie uzyskano w badaniach *in vitro*, GA w modelach zwierzęcych okazała się być toksyczna, szczególnie dla komórek wątroby [140]. Jedną z przyczyn tego zjawiska może być obecność grupy metoksy przy 17 atomie węgla w pierścieniu benzochinonowym GA. Ponieważ grupa ta nie wchodzi w interakcje z białkiem HSP90, dokonano szeregu modyfikacji w obrębie tego podstawnika [145]. 17AAG, jeden z pierwszych analogów GA, okazało się mieć znacznie zmniejszone działanie toksyczne przy zachowanych właściwościach przeciwnowotworowych i obecnie jest w trakcie wielu badań klinicznych [125]. Entuzjazm związany z potencjalnym zastosowaniem 17AAG w klinice został osłabiony z powodu nierozpuszczalności tego związku w roztworach wodnych. Kolejnym,

intensywnie badany analogiem GA jest 17DMAG, który wydaje się mieć wszystkie zalety 17AAG oraz dodatkowo doskonałą rozpuszczalność w wodzie.

W przeprowadzonych doświadczeniach porównano działanie GA oraz jej pochodnych: 17AAG i 17DMAG, objętych już badaniami klinicznymi zarówno fazy I jak i II oraz 17AEP-GA i 17DMAP-GA, na temat których nie ma jeszcze doniesień literaturowych.

Sprawdzono czy pochodne GA, mimo wprowadzonych modyfikacji, zachowują przeciwnowotworowe właściwości w stosunku do komórek MM.

Stwierdzono, że badane pochodne GA hamują wzrost komórek MM, a efekt ich działania nasila się wraz z długością ekspozycji. Podobnie jak w przypadku GA, analogi inicjują proces apoptozy, wywołując m.in. aktywację kaspazy-3. Zaobserwowano również spadek ekspresji antyapoptotycznego białka AKT. Ponadto, pochodne GA powodują blokadę cyklu komórkowego. Analogiczne działanie pochodnych potwierdzono również badając ekspresję białka MET. Na podstawie wymienionych wyżej obserwacji wywnioskowano, że mechanizm działania GA i jej pochodnych jest podobny.

Zbliżone właściwości biologiczne GA i 17AAG wynikające z wiązania się do białka HSP90 wykazano także na przykładzie linii komórkowych raka piersi [125].

Shulte i wsp. pokazali, że GA i 17AAG mają nie tylko podobne właściwości biologiczne, ale charakteryzują się także porównywalną aktywnością przeciwnowotworową [125]. Z kolei Smith i wsp. dowiedli, że 17DMAG średnio 3-krotnie silniej niż 17AAG hamuje proliferację różnych typów komórek nowotworowych, włączając czerniaka, raka pęcherza moczowego, jelita grubego, trzustki, płuc, prostaty czy sutka [136].

W przypadku komórek U266 wykazano istotne różnice we wrażliwości tych komórek na działanie GA i jej pochodnych. Na podstawie testu MTS, wywnioskowano, że 17DMAG, 17AEP-GA i 17DMAP-GA mają podobne do GA właściwości przeciwnowotworowe. Mimo, iż stwierdzono, że pochodne GA wiążą się do HSP90 z różnym powinowactwem, nie wykazano jak dotąd korelacji pomiędzy tym faktem, a zdolnością do hamowania wzrostu komórek nowotworowych. Możliwe, iż niejednakowe efekty działania badanych inhibitorów wynikają np. ze zdolności do przenikania do wnętrza komórki [145]. Różnice w zahamowaniu wzrostu komórek MM, w zależności od użytego inhibitora, znalazły także odzwierciedlenie w nasileniu

zjawisk takich jak apoptoza i blokada cyklu komórkowego. Odnotowano również różnice w działaniu inhibitorów na ekspresję białka AKT oraz MET.

Na podstawie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* można stwierdzić, że 17AEP-GA i 17DMAG, są skutecznymi inhibitorami HSP90 o właściwościach porównywalnych z GA. Natomiast 17AAG okazuje się być najmniej skutecznym inhibitorem wzrostu komórek MM.

Przeprowadzono również badania apoptozy na komórkach pochodzących od pacjentów chorych na szpiczaka i po 48 godzinach inkubacji największy odsetek komórek apoptotycznych zaobserwowano po zastosowaniu GA i 17DMAG.

Aby wyeliminować niepożądane działanie na komórki prawidłowe porównano również poziom białek docelowych dla GA i analogów w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych pochodzących od pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego. Różnica w poziomie mRNA oraz białka HSP90 potwierdziła różnice w odpowiedzi komórek prawidłowych i nowotworowych na działanie GA.

8.5 Rola mikrośrodowiska

W przedstawionej pracy wykorzystano szpik kostny jako źródło MSC. Istotne znaczenie dla terapii szpiczaka mnogiego ma poznanie mechanizmów rządzących rozwojem mikrośrodowiska szpiku kostnego w tym schorzeniu, stąd jako cel wybrano komórki mezenchymalne.

Mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego chorych na szpiczaka mnogiego wykazują różnice w porównaniu do charakterystyki fenotypowej MSC zdrowych dawców. Badając profil antygenowy komórek na 3 pasażu wykazano, że zarówno MM MSC jak i MSC posiadają markery CD270 i CD73 na dość niskim poziomie, co było zgodne z wynikami dostępnymi w literaturze [72, 84, 119, 151]. Jedynie dla antygenu CD166 zaobserwowano spadek ekspresji na powierzchni MM MSC. Wykazano również, że MSC, bez względu na źródło izolacji, posiadają antygen CD45, co może wynikać z zanieczyszczenia MSC komórkami hematopoetycznymi. W przypadku ekspresji receptora CXCR4, wykazano, że występuje on na MSC w bardzo wysokim odsetku. Podobne wyniki uzyskali Son i wsp. pokazali, że CXCR4 jest obecny na 21,5% populacji BM-MSC [137]. Z kolei Wynn i wsp. [157] oraz Honczarenko i wsp. [58] pokazują obecność tego receptora na bardzo niskim poziomie. Istnieją też prace wykazujące zupełny brak tego receptora na MSC [150]. Taka rozbieżność

wyników różnych grup badaczy, wskazuje na dużą zmienność pomiędzy komórkami izolowanymi od różnych dawców oraz na istotny wpływ warunków hodowli na ekspresję białek powierzchniowych na MSC, w tym receptora CXCR4. Dane innych badaczy wykazują, że w warunkach hipoksji lub pod wpływem działania określonych cytokin, można zwiększyć ekspresję CXCR4 na MSC [61, 130]. Stwierdzono również, że poziom ekspresji CXCR4 maleje podczas hodowli [58].

W niniejszej pracy porównano również tempo proliferacji MM MSC i MSC. Zaobserwowano znacznie szybsze tempo wzrostu MSC, w porównaniu do MM-MSC. Ponadto MSC pochodzące od zdrowych dawców można dłużej utrzymać w hodowli, a populacja ta posiada zdolność do odkładania złogów fosforanu wapnia. Natomiast MM MSC po 4 pasażu zaprzestawały proliferować i obumierały.

Dane literaturowe wykazują, że w przypadku MSC izolowanych ze szpiku kostnego obserwowano wysoką aktywność genów należących do ścieżki sygnałowania Wnt oraz regulujących różnicowanie [104]. Zbadano, że MSC, bez względu na źródło izolacji, wykazują ekspresję genów Oct4, UTF-1, Nodal oraz Snail2, które są typowe dla embrionalnych komórek macierzystych (*ang. Embryonic Stem Cells –ESC*) [109]. Geny te biorą udział w migracji ESC podczas rozwoju embrionalnego i są niezbędne dla podtrzymania niezróżnicowanego fenotypu tych komórek.

W przeprowadzonych doświadczeniach, stwierdzono istotne różnice w profilu genetycznym MSC pochodzących ze szpiku kostnego chorych na szpiczaka mnogiego oraz zdrowych dawców (Rycina 26). Wykazano, że MM MSC wykazywały znacząco wyższy poziom transkryptu dla IL8 i MMP9, natomiast istotnie niższy poziom dla RUNX2 i $\alpha 1$ col. Nasze dane są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych przez grupę Todoerti wskazującą na różny profil genetyczny mikrośrodowiska chorych na szpiczaka mnogiego i zdrowych dawców [146].

Metaloproteinazy odgrywają główną rolę w degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a MMP-2 i MMP-9 preferencyjnie trawią składniki błony podstawnej. Naukowcy zbadali również, że główną rolę w stymulacji ekspresji MMPs i TIMPs przez MSC odgrywają cytokiny pozapalne, w tym TGF β 1, IL-1 β oraz TNF α . [120]. Metaloproteinaza 9 w zdrowych tkankach wraz z innymi enzymami wpływa na prawidłową przemianę kolagenu typu IV, V, elastyny i zdenaturowanego kolagenu. W przebiegu procesów zapalnych wykazano, że w wyniku stymulacji cytokin prozapalnych dochodzi do nadmiernego wydzielania metaloproteinaz, w tym MMP9, w

komórkach nacieku zapalnego. Badania doświadczalne przeprowadzone na myszach wykazały także, że MMP9 odgrywa rolę w przebiegu angiogenezy [77].

Interleukina 8 to molekula związana z angiogenezą i jej podniesiony poziom w osoczu wykazały badania grupy Negaard i współpracowników, którzy badali również inne czynniki takie jak IL-6 i VEGF w nowotworach hematologicznych i ich korelację z rozwojem mikronaczyń [81].

W prezentowanej pracy wykazano, że poziom ekspresji genów zaangażowanych w osteogenezę, w tym dla genu aktywnego we wczesnych etapach różnicowania, czyli Runx2 był znacząco niższy w komórkach mezenchymalnych pochodzenia szpiczakowego. Zaobserwowano również spadek charakterystycznego dla późnych etapów różnicowania kolagenu- α .

Prawidłowe komórki MSC wykazywały zasadniczo wyższy poziom transkryptu dla Runx2, osteokalcyny PPAR- γ i kolagenu co było zgodne z wynikami Noël i wsp., którzy również badali geny zaangażowane w osteogenezę [104].

W badaniach dotyczących mikrofragmentów błonowych stwierdzono obecność DKK-1 w lizatach białkowych mikrofragmentów wyizolowanych z nadsączy szpiczakowej linii U266. Podwyższony poziom DKK-1 w osoczu towarzyszy zmianom osteolitycznym chorych na szpiczaka mnogiego [128].

W publikacji Tian i współpracowników wykazano, że DKK-1 jest zaangażowany w zahamowanie aktywności osteoblastów w szpiczaku mnogim. DKK-1 jako bardzo ważną składową szlaku sygnałowania Wnt i odgrywa istotną rolę w osteoróżnicowaniu. Autorzy pokazali, że DKK-1 wydzielany przez komórki plazmatyczne w stężeniu powyżej 12 ng/ml hamowały osteoróżnicowanie mysich komórek mezenchymalnych *in vitro*. Ekspresja transkryptu dla genu DKK-1 była silnie skorelowana ze zmianami osteolitycznymi u chorych na szpiczaka [144]. Inna grupa naukowców wykazała natomiast, że DKK-1 nie jest prezentowany przez komórki szpiczakowe sugerując, że białko to nie jest powszechnie eksponowane na komórkach szpiczakowych [34, 162]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że komórki szpiczakowe wydzielają MFB zawierające czynniki hamujące szlak Wnt, którego aktywacja jest niezbędna do prawidłowego rozwoju i modelowania tkanki kostnej.

Wykazane różnice w ekspresji genów związanych z procesem angiogenezy w komórkach mezenchymalnych inkubowanych w obecności szpiczakowych MFB sugerują ważną rolę mikrofragmentów błonowych w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami. Podobnie jak w doświadczeniach porównujących szpiczakowe

MSC do MSC zdrowych dawców zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji genów IL-8, HGF, VEGF i β FGF po 48 godz. inkubacji ze szpiczakowymi MFB, efekt ten wzmacniał się w czasie. Różnica w ekspresji pozostałych genów nie była istotna statystycznie, jednakże dało się zauważyć trend podobny jak w analizie MSC szpiczakowych i MSC prawidłowych. Prawdopodobnie wydłużenie czasu ekspozycji komórek mezenchymalnych na szpiczakowe mikrofragmenty błonowe uwidoczniłoby wpływ na ekspresję genów związanych z osteogenezą.

W badaniach dotyczących osteoróżnicowania stwierdzono, że modyfikacja protokołu różnicowania w dodatkowy składnik jakim były MFB wpływa na ich potencjał osteoróżnicowania. Zostało to sprawdzone poprzez barwienie złogów fosforanu wapnia w 7, 14 i 21 dniu różnicowania. Komórki w obecności MFB nie proliferowały i po 3 tygodniach całkowicie obumierały. Barwienie von Kossa złogów fosforanu wapnia wykazało potencjał osteoróżnicujący w kontrolnych komórkach mezenchymalnych. Przeprowadzone doświadczenia wskazują na negatywny wpływ szpiczakowych MFB na układ kostny, poprzez przenoszenie białkowych inhibitorów szlaku Wnt. Badania te dowodzą odkrycie nowej roli mikrofragmentów błonowych.

Podsumowanie

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że komórki szpiczaka mnogiego zarówno linii komórkowych jak i materiał kliniczny potwierdzają obecność receptora MET na powierzchni, oraz wykazują podwyższony poziom mRNA i białka. Stosując konstrukt lentiwirusowym przygotowano stabilnie stransdukowane linie z obniżoną ekspresją receptora MET. Wpływ zahamowania osi HGF-MET zaobserwowano w badaniach *in vivo* gdzie podanie komórek szpiczakowych z wyciszonym receptorem MET powodowało wydłużenie czasu przeżycia myszy NOD-SCID oraz nie zaobserwowano nacieków z atypowymi komórkami plazmatycznymi w szpiku myszy.

Używając geldanamycyny i analogów zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek MM wynikające przede wszystkim z indukcji apoptozy i blokady cyklu komórkowego. Badane pochodne GA mimo wprowadzonych modyfikacji zachowują silne przeciwnowotworowe właściwości. Możliwe, że dwa analogi GA, 17AEP-GA i 17DMAG ze względu na swoje właściwości mogą okazać się skuteczniejszymi i bezpieczniejszymi chemioterapeutykami, niż dotychczas stosowane 17AAG opisywane w literaturze.

Wykorzystując komórki mezenchymalne izolowane od zdrowych dawców i chorych na szpiczaka wykazano różnice w profilu genetycznym i fenotypie porównywanych populacji komórek. Prezentowane wyniki wskazują na ważną rolę mikrośrodowiska szpiku kostnego w rozwoju szpiczaka mnogiego oraz ich istotny wpływ na zmiany osteolityczne towarzyszące temu nowotworowi.

Stosując mikrofragmenty błonowe wykazano zaburzenia w osteoróżnicowaniu komórek mezenchymalnych oraz ich zaangażowanie w szlak Wnt przez prezentowane białko DKK-1.

Podsumowując, projekt ten stanowi nową propozycję terapii szpiczaka mnogiego z zastosowaniem inhibitorów MET, oraz wykazuje znaczącą rolę mikrośrodowiska szpiku kostnego i wpływ szpiczakowych mikrofragmentów błonowych na zaburzenia osteoblastogenezy.

9 WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań nad wpływem czynnika wzrostu hepatocytów i jego receptora MET oraz komórek podścieliska szpiku kostnego na biologię szpiczaka mnogiego w modelu eksperymentalnym, wyprowadzono następujące wnioski:

1. Komórki ustalonych linii szpiczakowych oraz komórki z materiału klinicznego chorych na szpiczaka wykazują obecność receptora MET na poziomie mRNA i białka.
2. Wykorzystanie interferencji RNA pozwala na zahamowanie receptora MET w komórkach szpiczakowych *in vitro* oraz wpływa na wydłużenie przeżycia myszy.
3. GA poprzez indukcję apoptozy i blokadę cyklu komórkowego hamuje wzrost komórek szpiczakowych, oraz wpływa na obniżenie ekspresji receptora MET.
4. Pochodne GA mają zbliżone do GA właściwości przeciwnowotworowe.
5. MM-MSC wykazują różnice w porównaniu z charakterystyką BM-MSC, w odniesieniu do profilu genetycznego, potencjału do osteo-różnicowania i ekspresji antygenów powierzchniowych.
6. MFB wpływają na zmiany w profilu genetycznym komórek MSC oraz zaburzają ich potencjał do osteoróżnicowania.

10 LITERATURA

1. **Abounader R**, Lal B, Luddy C, Koe G, Davidson B, Rosen EM, Laterra J. In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB J*. 2002 Jan; 16(1):108-10.
2. **Avet-Loiseau H.**, Facon T., Grosbois B., Mograugeas F., Rapp M.J., Harousseau J.L. Miuvielle S., Bataille R. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation. *Blood*, 2002; 99, 2185-2191.
3. **Bagatell R**, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L. Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer*. 2005 Jan 10; 113(2):179-88.
4. **Baj-Krzyworzeka M**, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002 May; 30(5):450-9.
5. **Barille S.**, Bataille R., Raap M.J., et al.: Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol*. 1999; 163:5723-5728.
6. **Barry OP**, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1; 102(1):136-44.
7. **Beaudoin AR**, Grondin G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Nov 13; 1071(3):203-19.
8. **Bedin M**, Gaben AM, Saucier C, Mester J. Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int J Cancer*. 2004 May 1; 109(5):643-52.
9. **Bergsagel P.L.** Prognostic Factors in Multiple Myeloma: It's in the Genes, *Clin. Can. Res.*, 2003; 9, 533-534.
10. **Birchmeier C.**, Birchmeier W., Gherardi E. i wsp. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4, 915-25.
11. **Blagosklonny MV**, Toretzky J, Bohen S, Neckers L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6; 93(16):8379-83.
12. **Blagosklonny MV.** Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia*. 2002 Apr; 16(4):455-62.
13. **Boiret N**, Rapatel C, Veyrat-Masson R, Guillouard L, Guérin J-J, Pigeon P, Descamps S, Boisgard S, Berger MG. Characterization of nonexpanded

- mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol.* 2005; 33:219-25.
14. **Børset M**, Seidel C Hjorth-Hansen H, , et al. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leukemia and Lymphoma*, 1999; 32(3-4), 249-256.
 15. **Cheng H**, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenic proteins (BMPs). *J Bone Surg Am.* 2003; 85:1544-52.
 16. **Cheng JQ**, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2005 Nov 14; 24(50):7482-92.
 17. **Choi S. J.**, Cruz J.C., Craig F, et al.: Macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1a) as a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood* 2000; 96(2):671-675.
 18. **Christensen J.G.**, Burrows J., Salgia R.: c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Letters* 2005; 225: 1-26.
 19. **Christensen JG**, Schreck R, Burrows J et al. A Selective Small Molecule Inhibitor of c-Met Kinase Inhibits c-Met-Dependent Phenotypes in Vitro and Exhibits Cytoreductive Antitumor Activity in Vivo. *Cancer Research* 2003; 63, 7345-7355.
 20. **Cichocki T.**, Litwin J.A., Mirecka J.: Kompendium histologii dla studentów nauk medycznych i przyrodniczych, Collegium Medicum UJ, Kraków 1996.
 21. **Cognet PA**, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999; 181:67-73.
 22. **Cotran R.S.**, Kumar V., Collins T.: Robbins pathologic basis of disease 6th ed., W.B. Saunders Company 1999.
 23. **Dai C**, Whitesell L. HSP90: a rising star on the horizon of anticancer targets. *Future Oncol.* 2005 Aug; 1(4):529-40.
 24. **Date K**, Matsumoto K, Kuba K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 1998; 17: 3045–54.
 25. **Date K**, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett.* 1997 Dec 22; 420(1):1-6.
 26. **De Raeve H.R.**, Vanderkerken K.: The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol.* 2005; 20:1227-1250.
 27. **Dennis JE**, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* 2002; 170:73-82.
 28. **Dennis JE**, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells.* 2002; 20:205-14.

-
29. **Derksen PWB**, Gorter DJJ, Meijer HP et al.: The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 764-774.
 30. **Devlin R.D.**, Reddy S.V., Savano R., Cilberto G., Roodman G.D.: IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25-(OH)₂D₃ on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 393-399.
 31. **Dicker A**, Le Blanc K, Aström G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 2005 Aug 15; 308(2):283-90.
 32. **Dong G**, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Aug 1; 61(15):5911-8.
 33. **Dziankowska-Bartkowiak B**, Żebrowska A, Joss-Wichman E, Kobos J, Waszczykowska E. Stężenie metaloproteinazy 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) w surowicy chorych na twardzinę układową – porównanie z ich ekspresją w chorobowo zmienionej skórze – badania wstępne *Post Dermatol Alergol* 2007; XXIV, 2: 73–81.
 34. **Ehrlich LA**, Ito M, Chung HY, Ghobrial I, Choi SJ, Roodman GD. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 1407 -14.
 35. **Elbashir SM**, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* 2002 Feb; 26(2):199-213.
 36. **Fernand JP** i wsp. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998; 92:3131–3136.
 37. **Ferracini R**, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene.* 1995 Feb 16; 10(4):739-49.
 38. **Fevrier B.**, Raposo G., Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16; 415-421.
 39. **Fonseca R**, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Dávila R, González-Paz N, Kyle RA, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood.* 2003 Oct 1; 102(7):2562-7.
 40. **Fonseca R.**, Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Davies, F.E., Drach, J., Greipp, P.R., Kirsch, I.R., Kuehl, W.M., Hernandez, J.M., Minvielle, S., Pilarski, L.M., Shaughnessy, J.D., Jr., Stewart, A.K., and Avet-

- Loiseau, H. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. Cancer Research. 2004; Vol. 64, pp. 1546–1558.
41. **Friedenstein AJ**, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep; 4(5):267-74.
 42. **Gahrton G**. New therapeutic targets in multiple myeloma. *Lancet* 2004; 364: 1648-1649.
 43. **Gattei V**, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 1999; 104:152-62.
 44. **Gibson J**, Joshua D. Epidemiology of plasma disorders. In: *Myeloma* ed. Dunitz Ltd., London, 2002; 139-150.
 45. **Ginestra A**, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res*. 1999 Jul-Aug; 19(4C):3439-45.
 46. **Glennie S**, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005; 105:2821-7.
 47. **Goetz M.P.**, Toft D.O. Ames M.M. i Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*. 2003; 14, 1169-76.
 48. **Gronthos S**, Zannettino AC, Hay DJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003; 116:1827-35.
 49. **Guo, W.**, Reigan, P., Siegel, D., Zirrolli, J., Gustafson, D. and Ross, D. Formation of 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG) hydroquinone by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role of 17-AAG hydroquinone in heat shock protein 90 inhibition. *Cancer Res*. 2005; 65, 10006–10015.
 50. **Hallek M.**, Bergsagel L., Anderson KC, Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91, 3-21.
 51. **Han J.K.**, Choi S.J., Kurihara N., Oba Y., Roodman G.D.: Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 α): a potential osteoclastogenic factor in myeloma. *Blood*. 2001; 97(1):3349-3353.
 52. **Hanahan D**, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7; 100(1):57-70.
 53. **Hartmann F**, Horak EM, Cho C, Lupu R, Bolen JB, Stetler-Stevenson MA, Pfreundschuh M, Waldmann TA, Horak ID. Effects of the tyrosine-kinase inhibitor geldanamycin on ligand-induced Her-2/neu activation, receptor expression and proliferation of Her-2-positive malignant cell lines. *Int J Cancer*. 1997 Jan 17; 70(2):221-9.
 54. **Hermisson M.**, Strik H., Rieger J. i wsp. Expression and functional activity of heat shock proteins in human glioblastoma multiforme. *Neurology*. 2000; 54, 1357-65.

-
55. **Herold G.**: Medycyna wewnętrzna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
 56. **Hiscox S.** i Jiang W.G. Association of the HGF/SF receptor, MET, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261, 406–11.
 57. **Hjertner O.**, Torgersen M.L., Seidel C., et al.: Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoblasts: a possible role for HGF in myeloma-associated osteolytic bone disease. *Blood.* 1999; 94:3883-3888.
 58. **Honczarenko M.**, Lee Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*, 2006; 24:1030-41.
 59. **Hov H**, Holt RU, Rø TB, Fagerli UM, Hjorth-Hansen H, Baykov V, Christensen JG, Waage A, Sundan A, Børset M. A selective c-met inhibitor blocks an autocrine hepatocyte growth factor growth loop in ANBL-6 cells and prevents migration and adhesion of myeloma cells. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 1; 10(19):6686-94.
 60. **Hugel B**, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005 Feb;20:22-7.
 61. **Hung SC**, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, Prockop DJ. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS ONE.* 2007 May 2; 2(5):e416.
 62. **Inki P**, Jalkanen M. The role of syndecan-1 in malignancies [review]. *Ann Med* 1996; 28:63-7.
 63. **Ivan M.**, Bond J.A., Prat M. i wsp. Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene.* 1997; 14, 2417-23.
 64. **Janicki K.** Hematologia, Warszawa, 2001, PZWL.
 65. **Jankowski K**, Kucia M, Wysoczynski M, Reca R, Zhao D, Trzyna E, Trent J, Peiper S, Zembala M, Ratajczak J, Houghton P, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res.* 2003 Nov 15; 63(22):7926-35.
 66. **Janowska-Wieczorek A**, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood.* 2001 Nov 15; 98(10):3143-9.
 67. **Janowska-Wieczorek A**, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005 Feb 20; 113(5):752-60.
-

-
68. **Jiang W.**, Hiscox S., Matsumoto K., Nakamura T.: Hepatocyte growth factor: scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology* 1999; 29: 209–248.
69. **Jones DT**, Addison E, North JM, Lowdell MW, Hoffbrand AV, Mehta AB, Ganeshaguru K, Folarin NI, Wickremasinghe RG. Geldanamycin and herbimycin A induce apoptotic killing of B chronic lymphocytic leukemia cells and augment the cells' sensitivity to cytotoxic drugs. *Blood*. 2004 Mar 1; 103(5):1855-61.
70. **Jourdan M**, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998; 100:637-46.
71. **Jurczyszyn A**. Cytokiny w patogenezie szpiczaka mnogiego, praca doktorska, 2003; Collegium Medicum UJ, 1-78.
72. **Katz AJ**, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005; 23:412-23.
73. **Kefford R**, Millward M, Hersey P, Brady B, Graham M, Johnson RG, Hannah AL. Phase 2 Trial of Tanespimycin (KOS-953), a Heat Shock Protein-90 (Hsp90) Inhibitor in Patients with Metastatic Melanoma. *ASCO*. 2007 June 3.
74. **Kim CW**, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res*. 2002 Nov 1; 62(21):6312-7.
75. **Kim HK**, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer*. 2003 Jan;39(2):184-91. Erratum in: *Eur J Cancer*. 2003 Nov; 39(17):2569.
76. **Kim S**, Kang J, Hu W, Evers BM, Chung DH. Geldanamycin decreases Raf-1 and Akt levels and induces apoptosis in neuroblastomas. *Int J Cancer*. 2003 Jan 20; 103(3):352-9.
77. **Kokot F.**: Choroby wewnętrzne, Wydawnictwo Lekarski PZWL, Warszawa 1996.
78. **Kong-Beltran M**, Stamos J, Wickramasinghe D. The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell*. 2004; Jul;6(1):75-84.
79. **Kuba K**, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res*. 2000; Dec 1;60(23):6737-43.
80. **Kumar A**, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis *J Natl Cancer Inst* 2009; Jan 21; 101(2):100-6.
-

-
81. **Kurihara N.**, Bercolini D., Suda T., et al.: IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990; 144:4226-4230.
 82. **Lavery K**, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2008; Jul 25;283(30):20948-58.
 83. **Lee K.H.**, Choi E.Y., Hyun M.S. i wsp. Association of extracellular cleavage of E-cadherin mediated by MMP-7 with HGF-induced in vitro invasion in human stomach cancer cells. *Eur Surg Res.* 2007; 39, 208-15.
 84. **Lee RH**, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004; 14(4-6):311-24.
 85. **Lesko E**, Gozdzik J, Kijowski J, Jenner B, Wiecha O, Majka M. HSP90 antagonist, geldanamycin, inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro and seeding into bone marrow in vivo. *Anticancer Drugs.* 2007 Nov; 18(10):1173-81.
 86. **Liang TJ**, Reid AE, Xavier R, Cardiff RD, Wang TC. Transgenic expression of tpr-met oncogene leads to development of mammary hyperplasia and tumors. *J Clin Invest.* 1996 Jun 15; 97(12):2872-7.
 87. **Longati, P.**, Comoglio, P. M., Bardelli, A. Receptor Tyrosine Kinases as Therapeutic Targets: the Model of the MET Oncogene. *Current Drug Targets.* 2001; Vol. 2, pp. 41-55.
 88. **Lust J.A.**, Donovan K.A.: The role of interleukin-1 beta in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999; 13:1117-1125.
 89. **Mackie EJ**. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35:1301-05.
 90. **Maloney A**, Clarke PA, Workman P. Genes and proteins governing the cellular sensitivity to HSP90 inhibitors: a mechanistic perspective. *Curr Cancer Drug Targets.* 2003 Oct; 3(5):331-41.
 91. **Martens T**, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15; 12(20 Pt 1):6144-52.
 92. **Matsumoto K.**, Matsumoto K., Nakamura T. i Kramer RH. i wsp. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 1994; 269, 31807–13.
 93. **Maulik G**, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R. Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2002 Feb; 8(2):620-7.
-

-
94. **McCarty OJ**, Mousa SA, Bray PF, Konstantopoulos K. Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood*. 2000 Sep 1; 96(5):1789-97.
 95. **Mitsiades CS**, Mitsiades N, Poulaki V, Akiyama M, Treon SP, Anderson KC. The HSP90 molecular chaperone as a novel therapeutic target in hematologic malignancies. *Blood* 2001; 98:377a.
 96. **Mitsiades N** i wsp. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 2002; 99: 4525–4530.
 97. **Mitsiades N** i wsp. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003; 101:2377–2380.
 98. **Mosser D.D.** i Morimoto R.I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*. 2004; 23, 2907-18.
 99. **Mundy G.R.** Hypercalcemic factors other than parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1989; 18:795-806.
 100. **Nakamura T**, Matsumoto K, Kiritoshi A. i wsp. Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 1997; 57, 3305–13.
 101. **Neckers L.** Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med*. 2002; 8(4 Suppl):S55-61.
 102. **Negaard HF**, Iversen N, Bowitz-Lothe IM, Sandset PM, Steinsvik B, Ostenstad B, Iversen PO Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors. *Leukemia*. 2009 Jan; 23(1):162-9. Epub 2008 Sep 18.
 103. **Nimmanapalli R**, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res*. 2001 Mar 1; 61(5):1799-804.
 104. **Noël D**, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*. 2008 Apr 15; 314(7):1575-84.
 105. **Nusrat A.**, Parkos C.A., Bacarra A.E. i wsp. Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J Clin Invest*. 1994; 93, 2056-65.
 106. **Oppermann H**, Levinson W, Bishop JM. A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Feb; 78(2):1067-71.
-

107. **Panaretou B**, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J*. 1998 Aug 17; 17(16):4829-36.
108. **Pennacchietti S**, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003 Apr; 3(4):347-61.
109. **Peroni D**, Scambi I, Pasini A, Lisi V, Bifari F, Krampera M, Rigotti G, Sbarbati A, Galiè M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res*. 2008 Feb 1; 314(3):603-15.
110. **Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2; 284(5411):143-7.
111. **Podar K.**, Tai Y.T., Lin B.K., Nasimhan R.P. et al.: Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 7875-7881.
112. **Poglod R**. Adhesion molecules in multiple myeloma *Acta Hematologica Polonica* 2002; 33, 1 29-40.
113. **Ponzetto C**, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*. 1994 Apr 22; 77(2):261-71.
114. **Powers MV**, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec; 13 Suppl 1:S125-35.
115. **Prodromou C**, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*. 2000 Aug 15; 19(16):4383-92.
116. **Prodromou, C.**, Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. and Pearl, L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 1997; 90, 65–75.
117. **Rajkumar CV**. Treatment of myeloma cure vs control *Mayo Clin Proc*. 2008 Oct; 83(10):1142-5.
118. **Ratajczak J.**, Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication, *Leukemia* 2006; 20; 1487-1495.
119. **Rebelatto CK**, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Jul; 233(7):901-13.

-
120. **Ries C**, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007 May 1; 109(9):4055-63.
121. **Rosário M.** i Birchmeier W. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*. 2003; 13, 328-35.
122. **Ryoo J.J.**, Cole C.E., Andeson K.C.: Novel therapies for multiple myeloma, *Blood Reviews*, 2002; 16, 167-174.
123. **Sanderson S**, Valenti M, Gowan S, Patterson L, Ahmad Z, Workman P, Eccles SA. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2006 Mar; 5(3):522-32.
124. **Sati H.I.**, Greaves M., Apperley J.F., Russel R.G., Croucher P.I.: Expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in plasma cells from patients with multiple myeloma. *Br J Hematol*. 1999; 104:350-357.
125. **Schulte TW**, Neckers LM. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998; 42(4):273-9.
126. **Scrabble HJ**, Witte DP, Lampkin BC, Cavenee WK. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature*. 1987 Oct 15-21; 329(6140):645-7.
127. **Sebestyén A**, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 1999; 104:412-9.
128. **Seménov MV**, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem*. 2008 Aug 1; 283(31):21427-32. Epub 2008 May 27.
129. **Sharp, S.** and Workman, P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv. Cancer Res*. 2006; 95, 323–348.
130. **Shi M**, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007; 92(7):897-904.
131. **Silvestris F.**, Lombardi L., De Matteo M., Bruno A., Dammacco F.: Myeloma bone disease: Pathogenic mechanisms and clinical assessment. *Leukemia Research* 2007; 31:129-138.
132. **Singhal, S.** and Mehta, J. Multiple Myeloma. *J. Clin J Am Soc Nephrol*. 2006; 1, pp. 1322–1330.
133. **Skotnicki A.B.**, Jurczyszyn A., Wolska-Smołń T. Szpiczak mnogi – rola wysokodozowanej chemioterapii, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 1999; 8, 3, 189-196.
134. **Skotnicki A.B.**, Nowak W.S.: Podstawy hematologii dla studentów i lekarzy, *Medycyna Praktyczna*, Kraków 1998.
-

-
135. **Skotnicki A.B.**, Wolska-Smoleń T., Jurczyszyn A. Szpiczak mnogi – nowe perspektywy terapeutyczne, *Przegląd Lekarski*, 1999; 56, 67-72.
136. **Smith DF**, Whitesell L, Nair SC, Chen S, Prapapanich V, Rimerman RA. Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol*. 1995 Dec; 15(12):6804-12.
137. **Son BR**, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*. 2006; 24:1254-64.
138. **Srethapakdi M**, Liu F, Tavorath R, Rosen N. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest. *Cancer Res* 2000 Jul 15; 60(14):3940-6.
139. **Stabile LP**, Lyker JS, Huang L, Siegfried JM. Inhibition of human non-small cell lung tumors by a c-Met antisense/U6 expression plasmid strategy. *Gene Ther*. 2004 Feb; 11(3):325-35.
140. **Supko JG**, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995; 36(4):305-15.
141. **Takayama H**, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21; 94(2):701-6.
142. **Taucher S**, Salat A, Gnant M, Kwasny W, Mlineritsch B, Menzel RC, Schmid M, Smola MG, Stierer M, Tausch C, Galid A, Steger G, Jakesz R; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Impact of pretreatment thrombocytosis on survival in primary breast cancer. *Thromb Haemost*. 2003 Jun; 89(6):1098-106.
143. **Taulli R**, Scuoppo C, Bersani F, Accornero P, Forni PE, Miretti S, Grinza A, Allegra P, Schmitt-Ney M, Crepaldi T, Ponzetto C. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 2006 May 1; 66(9):4742-9.
144. **Tian E**, Zhan F, Walker R. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 349:2483-94.
145. **Tian ZQ**, Liu Y, Zhang D, Wang Z, Dong SD, Carreras CW, Zhou Y, Rastelli G, Santi DV, Myles DC. Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2004 Oct 15; 12(20):5317-29.
146. **Todoerti K**, Lisignoli G, Storti P, Agnelli L, Novara F, Manferdini C, Codeluppi K, Colla S, Crugnola M, Abeltino M, Bolzoni M, Sgobba V, Facchini A, Lambertenghi-Delilieri G, Zuffardi O, Rizzoli V, Neri A, Giuliani N. Distinct transcriptional profiles characterize bone microenvironment mesenchymal cells rather than osteoblasts in relationship with multiple myeloma bone disease. *Exp Hematol*. 2010 Feb; 38(2):141-53. Epub 2009 Dec 4.
-

-
147. **Trusolino, L.**, Comoglio P. M. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature Reviews Cancer*. 2002; Vol. 2, pp. 289-300.
 148. **Uehara Y.**, Minowa O., Mori C. i wsp. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 1995; 373, 702-5.
 149. **Vigna E**, Pacchiana G, Mazzone M, Chiriaco C, Fontani L, Basilico C, Pennacchietti S, Comoglio PM. Cancer Res. „Active" cancer immunotherapy by anti-Met antibody gene transfer. 2008 Nov 15;68(22):9176-83.
 150. **Von Lüttichau I**, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R, Nelson PJ. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*. 2005 Jun;14(3):329-36.
 151. **Wagner W**, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005; 33:1402-16.
 152. **Webb C.P.**, Hose C.D., Koochekpour S., Jeffers M., Oskarsson M., Sausville E., et al.: The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network, *Cancer Res*. 60 2000; 342–349.
 153. **Westendorf J.J.**, Kahler R.A., Schroeder T.M.: Wnt sygnaling in osteoblast and bone disease. *Gene* 2004; 314:19-39.
 154. **Whitesell L**, Mimnaugh E G, De Costa B, Myers C E, and Neckers L M Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 August 30; 91(18): 8324–8328.
 155. **Whitesell, L.** and Lindquist, S.L. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5, 761–772.
 156. **Wijdenes J**, Clément C, Klein B, Dore J-M. New B-cell CD antigens. BC29: CD138 (syndecan-1) workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference*; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 249-52.
 157. **Wynn RF**, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104:2643-5.
 158. **Xiao G.H.**, Jeffers M., Bellacosa A. i wsp. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98, 247-52.
-

-
159. **Yang J**, Yang JM, Iannone M, Shih WJ, Lin Y, Hait WN. Disruption of the EF-2 kinase/Hsp90 protein complex: a possible mechanism to inhibit glioblastoma by geldanamycin. *Cancer Res.* 2001 May 15;61(10):4010-6.
 160. **Yano M.**, Naito Z., Yokoyama M. i wsp. Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 1999; 137, 45-51.
 161. **Ye M.**, Hu D., Tu L. i wsp. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49, 497-504.
 162. **Zangari M**, Esseltine D, Lee CK, et al. Response to bortezomib is associated to osteoblastic activation in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2005; 131:7- 3.
 163. **Zelzer E**, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature.* 2003;423:343-8.
 164. **Zhang Y.W.**, Su Y., Volpert O.V., i wsp. (2003): Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12718-23.