

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ MG132'NİN 4T1 MEME VE B16F10 MELANOMA KANSER HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİ

Azmi YERLİKAYA, Harun DOKUDUR, Semih ŞEKER

Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, ayerlikaya@dumlupinar.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.04.2009 Kabul Tarihi: 14.07.2009

ÖZET

Proteozom, tüm ökaryotlar, arkeobakteriler ve bazı bakterilerde bulunan proteolitik aktiviteye sahip bir komplekstir. Çoğu kanserde proteozom aktivitesinde ve alt-birimlerinde yükselmeler sıklıkla görülmektedir. Proteozom inhibitörleri kanser hücre kültürlerinde apoptozisi uyarak anti-tümör aktivite göstermektedirler. Proteozom inhibitörlerini kanser tedavisinde kullanmak için çalışmalar birçok laboratuvarında halen devam etmektedir. Bu çalışmada proteozom inhibitörü MG132'nin 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. Apoptotik hücrelerde yaygın olarak kullanılan morfolojik kriterler ve tripan mavisi testi ile her iki hücre kültürünün MG132'ye hassas olduğunu belirledik. Bulgular, proteozom inhibitörlerinin melanoma ve meme kanseri hücrelerine karşı anti-kanser etki gösterebileceklerini ve bundan dolayı daha ileri düzeyde araştırılması gerektiğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Proteozom, MG132, kanser, sitotoksik etki*

THE CYTOTOXIC EFFECTS OF PROTEASOME INHIBITOR MG132 ON 4T1 BREAST AND B16F10 MELANOMA CANCER CELLS

ABSTRACT

Proteasome is a proteolytic complex found in all eukaryotes, archaeobacteria and some eubacteria. Increases in proteasome activity and subunits are commonly found in many cancers. Proteasome inhibitors exhibits antitumor activities in a number of cancer cell cultures by triggering apoptosis. Studies are currently conducted in many laboratories in order to use proteasome inhibitors in cancer treatment. In this study, we investigated the cytotoxic effects of proteasome inhibitor MG132 on 4T1 breast and B16F10 melanoma cancer cells. It was determined that both cell lines are sensitive to MG132 using morphologic criteria commonly found in apoptotic cells and trypan blue exclusion test. Results suggest that the proteasome inhibitors may show effective anti-cancer effects against melanoma and breast cancers and are therefore warranted to further investigation.

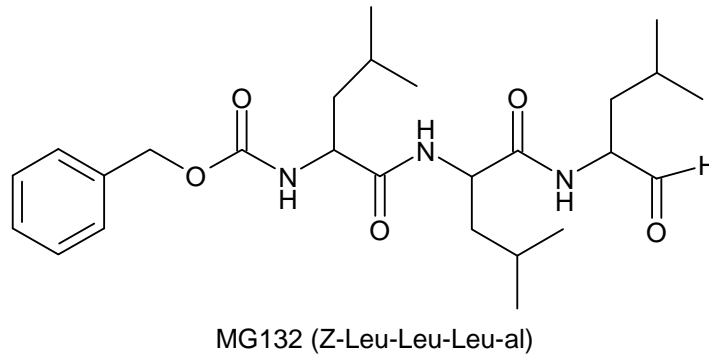
Key Words: *Proteasome, MG132, cancer, cytotoxic effects*

1. GİRİŞ

26S proteozom, normal metabolik şartlar altında kısa ömürlü proteinlerin yıkımından sorumlu ATP-bağımlı multi-katalitik hücre içi bir proteazdır. Ayrıca, 26S proteozom uzun ömürlü proteinlerin yıkımı, bazı proteinlerin işlenmesi (örneğin; transkripsiyon faktörü NF- κ B) ve antijen sunumunda görevlidir [1-3]. Proteozom, hücre ve organizmanın yaşamı için zaruri olan ve arkeobakterilerden ökaryotlara kadar yüksek derecede korunmuş bir proteolitik sistemdir [4]. Yaklaşık 2.5 MDa ağırlığında olup; silindirik bir 20S proteozom kompleksi (kor bölgesi) ve bunun her iki tarafında yer alan iki adet 19S düzenleyici kompleksten meydana gelmektedir. Ökaryotik 20S kompleksi, 7 farklı α ve 7 farklı β alt-biriminden oluşur. Bu β alt-birimleri 20S kompleksinin ortasındaki iki halkayı; α alt-birimleri ise dıştaki iki halkayı oluşturur [2, 5]. 20S kompleksinde üç farklı proteolitik aktivite bulunmaktadır. Bunlar kimotripsin benzeri, tripsin benzeri ve peptidilglutamil benzeri hidrolitik aktivitelerdir [2, 5, 6].

Proteozom inhibitörleri MG132 ve laktasistin ile yapılan çalışmalar hücre içi proteinlerinin yaklaşık % 80-90'ının yıkımı için proteozomun gerekli olduğunu göstermiştir. 26S proteozom tarafından yıkılan proteinler arasında poliamin biyosentez enzimleri; ornitin dekarboksilaz (ODC), S-adenozilmetyonin dekarboksilaz, hücre yaşamında anahtar rol oynayan proteinlerden transkripsiyon faktörü c-Fos, M-, S-, G1- fazı spesifik siklinleri, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri, p53, NF-κB inhibitörü İκB ve onkogenler bulunmaktadır [1, 3, 7-9].

Genellikle substrat proteinlerin 26S proteozoma hedeflenmesi için 76 amino asitlik bir ubiquitin molekülünün substrat proteine eklenmesi gereklidir. Substrat proteine ubiquitin eklenmesi çok basamaklı bir işlemdir. İlk olarak ubiquitin, ubiquitin aktive edici enzime (E1) bağlanır. Ubiquitin buradan ubiquitin konjuge edici enzime (E2) aktarılır. Son olarak ubiquitin ligaz enziminin (E3) türüne bağlı olarak ubiquitin ya direk substrat proteine veya ilk önce E3 ligaz üzerine daha sonra substrat proteine aktarılır [2, 10]. İlk ubiquitin molekülünün eklenmesinden sonra substrat protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri oluşmaktadır [11]. Substrat proteinin 26S proteozomal yıkıma yönlendirilebilmesi için en az dört ubiquitin molekülünden oluşan bir poliubiquitin zinciri gereklidir [12]. MG132, yukarıda belirtilen proteozomun her üç proteolitik aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe etmektedir; bunun yanında yüksek konsantrasyonda kullanıldığında kalpanlar ve katepsin B gibi diğer bazı proteazları da inhibe etmektedir (Şekil 1) [13].



Şekil 1. Proteozom inhibitörü MG132'nin kimyasal yapısı. Yapı, ISIS/DRAW programı ile çizilmiştir.

Bu çalışmada proteozom inhibitörü MG132'nin 4T1 meme ve B16F10 melanoma kanser hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği morfolojik analizler ve tripan mavisi testi ile belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

4T1 meme kanseri ve B16F10 melanoma hücreleri, Doç. Dr. Nuray Erin (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi)'den temin edilmiştir. RPMI-1640 besiyeri, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomisin, tripsin ve MG132 Sigma Aldrich Inc.'dan temin edilmiştir.

2.2. Besiyeri hazırlanışı

RPMI-1640'dan 10.4 gr önce 850 ml dH₂O'da çözüldü, sonra 1N HCl ile pH 4'e ayarlandı. Bu aşamadan sonra steril 20 ml NaHCO₃ (stok % 7.5) ve 22.5 ml glukoz (% 20'lik stokdan), 4 ml HEPES solüsyonu (2.5 M stokdan) ve 1 ml sodyum pirüvat solüsyonu (stok 1M) konulduktan sonra pH 7.1'e 1N NaOH ile ayarlandı. 10 ml Pen/Strep antibiyotik karışımı eklendikten sonra besiyeri hacmi 1L'ye tamamlandı. 1L kapasiteli disposable Millipore filtrasyon sistemi (por çapı 0.22 µm) ile Laminer Flow kabini içinde filtre edildi. Filtre edilen besiyerinin 900 ml'sine 100 ml FBS konuldu. Besiyeri, 4°C'de muhafaza edildi ve kullanılmadan önce 37°C'de yaklaşık 10 dakika kadar ısıtıldı.

2.3. Hücre Kültürleri

4T1 ve B16F10 hücreleri, 37°C'de % 5 CO₂'lik ortam sağlayan HF90 inkübatöründe çoğaltıldılar. Stok kültürler 25 cm² steril Corning Flasklarda ve deney kültürleri ise 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında çoğaltıldılar. Her iki hücre flasklara tutunarak çoğalmaktadırlar. Hücre pasajı çoğunlukla % 70 yoğunlukta yapıldı. Pasaj işlemi için önce besiyeri aspire edildi ve hücreler hemen 1 ml % 0.25'lik tripsin ile yıkandı. Daha sonra 2 ml % 0.25 tripsin flasklara pipetlendi (% 0.25 tripsin, PBS ile hazırlandı). Tripsin muamele süresi 4T1 hücrelerinde ~3 dk, B16F10 hücrelerinde ise ~30 saniye olarak uygulanmıştır. Tripsin, vakum pompasına bağlı pastör pipeti ile aspire edildikten sonra flask yeni besiyeri ile yıkanarak hücreler kaldırıldılar. Ve 1/10 oranında seyreltilerek yeni flasklara ekildiler. Hücrelerin pasajı her üç günde bir periyodik olarak yapıldı.

2.4. Tripan Mavisi Testi

Hücreler 10 µM MG132 veya % 0.1 DMSO (kontrol) ile 24 saat muamele edildikten sonra besiyerindeki kalkan hücreler 2700 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi. Ve daha sonra 500 µl tripsin ile kaldırılan petrilere hücreler ile birleştirildiler. Santrifüj sonunda süpernatantlar atıldı ve pelletler (hücreler) üzerine 500'er µl PBS ilave edildi. Hücreler pipetlenerek çözüldükten sonra 20 µl alındı ve diğer bir ependorftaki 20 µl tripan mavisi (% 0.4 PBS'de) solüsyonuna ilave edildi. Hücreler karıştırıldıktan sonra 5 dk bekletildi. Ve bu süre sonunda 20 µl alımlı thoma lamının her iki kısmında hemisitometrik ölçüm yapıldı. Ölü hücreler tripan mavisi ile maviye boyanırken, canlı hücreler ise boyanmamıştır. % sağkalım hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ Sağkalım} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı/ml}}{\text{Toplam hücre sayısı/ml}} \times 100$$

2.5 Mikroskobik Analizler

10 µM, 50 µM MG132 veya % 0.1 DMSO (kontrol) ile muamele edilen hücre morfolojileri belirtilen zamanlarda motik marka kamera monte edilmiş inverted mikroskop yardımıyla 10x veya 40x büyütülerek kaydedildi.

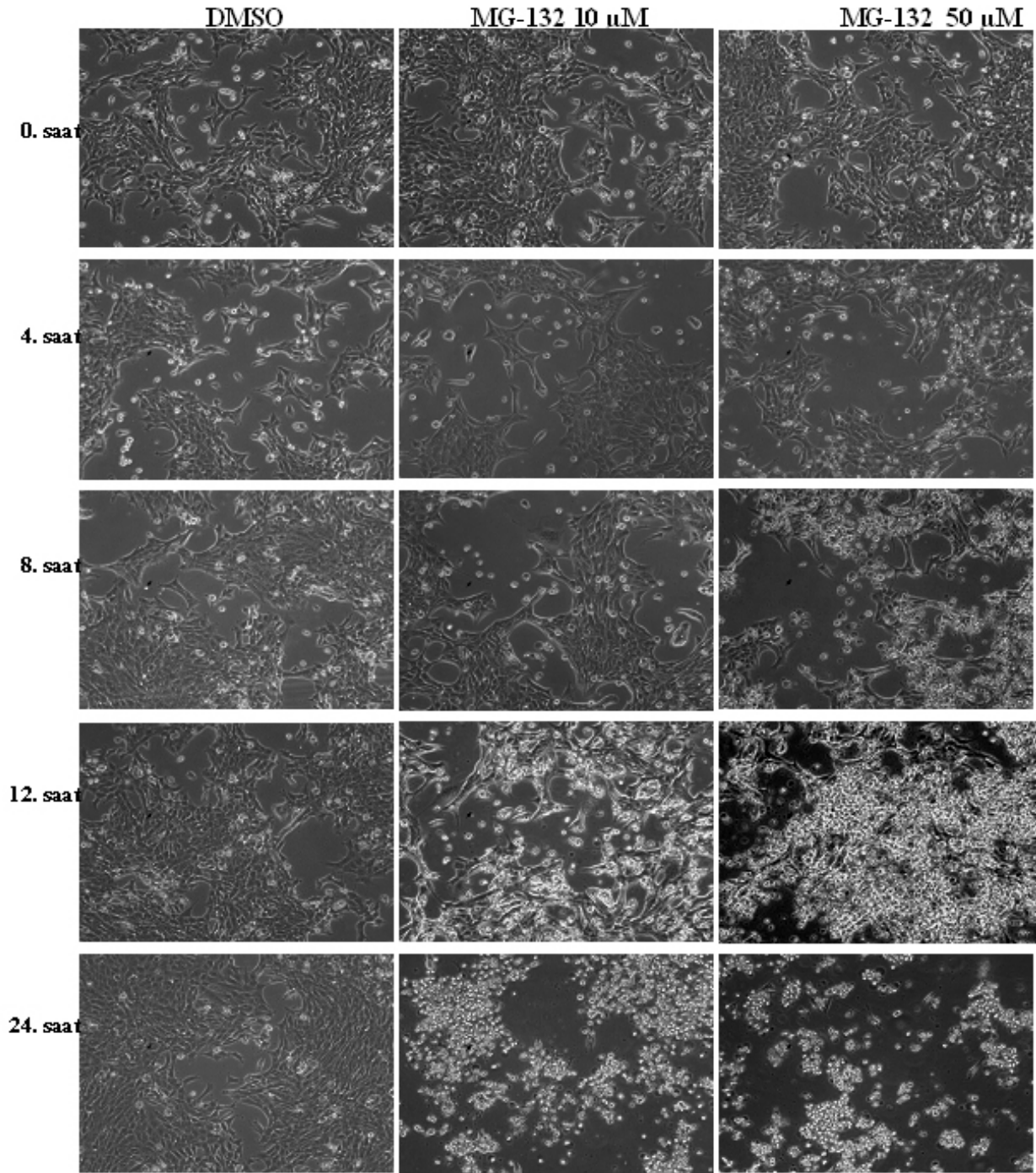
2.6 İstatistik Analizler

Deney grupları arasındaki istatistik önem değeri GraphPad Prism 3.03 programı ile *t-testi* kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n =3), p < 0.05 önemli olarak kabul edilmiştir.

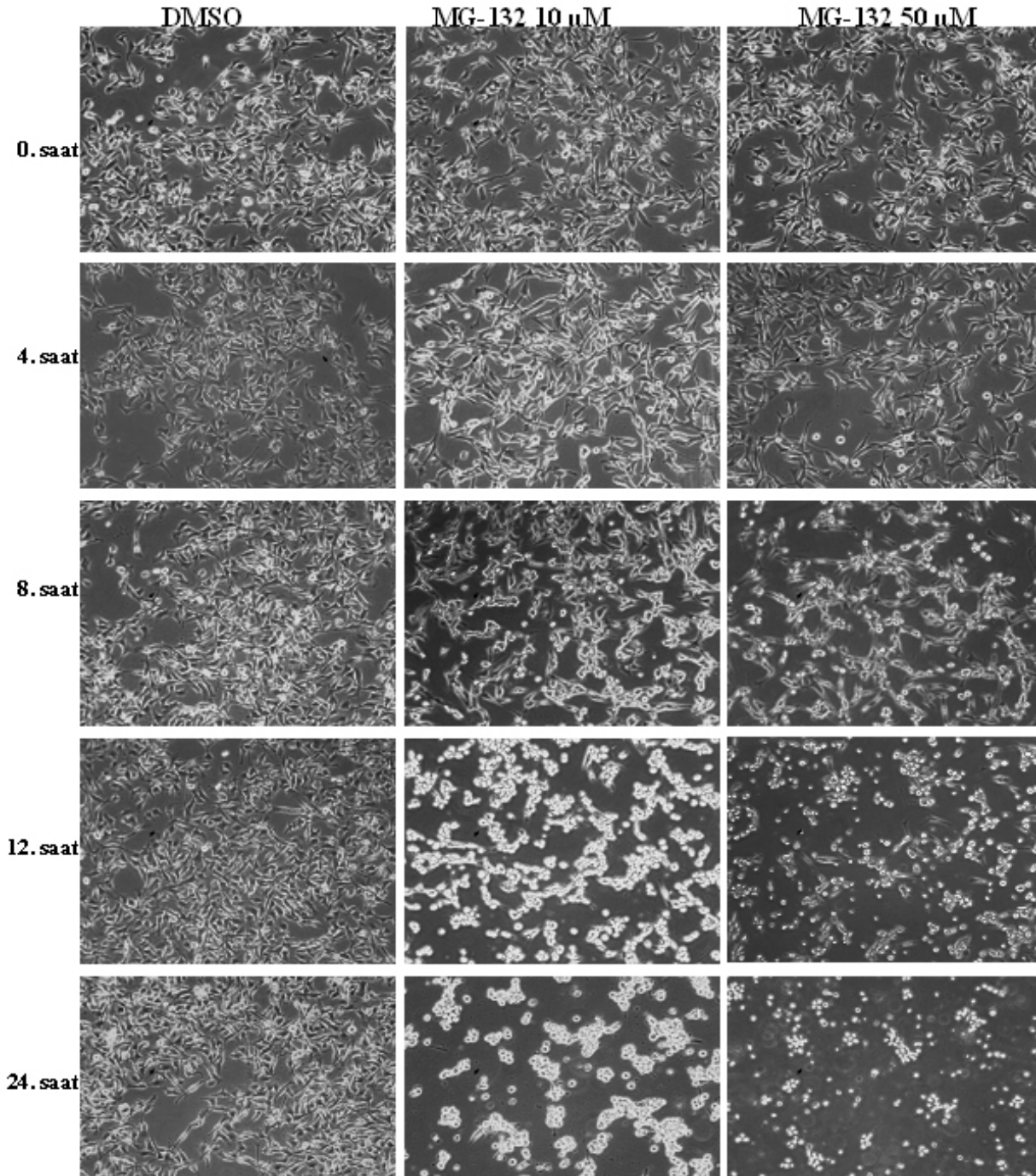
3. BULGULAR

4T1 ve B16F10 hücre kültürleri 35 x 10 mm'lik steril petrilere ekildi. Logaritmik üreme fazına gelen hücreler değişik sürelerde 10 µM, 50 µM proteozom inhibitörü MG132 veya % 0.1 DMSO (kontrol) ile 37 °C'de, % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildiler. Daha sonra aşağıda belirtilen sürelerde ilgili petrilere hücreler inverted mikroskop yardımıyla incelendiler ve morfolojileri kaydedildi. Şekil 2'deki 4T1 hücreleri 10x'lik objektifte incelendiğinde 0. ve 4. saatlerde kontrol ve MG132 muamele edilen gruplarda herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu durumdaki hücrelerin besiyeri ortamında petrinin dibinde hücre uzantılarıyla yapışık vaziyette bulunduğu ve hücrelerin sağlıklı olduğu görülmektedir. Ayrıca, hücrelerin çok büyük bir yüzdesi canlıdır. 50 µM MG132 muamele edilen hücrelerde, 8. saatten itibaren morfolojik değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Bu morfolojik değişimler; hücrelerin küçülüp büzülmesi, uzantılarının kaybolup küresel bir biçim alması ve petri kabının dibine yapışık olarak değil besiyerine asılı olarak bulunmaları biçiminde gözlenmiştir. Bu tür morfolojik değişiklikler 4T1 hücrelerinde 10 µM ile 12. saatten itibaren gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 2). Kontrol grubunda bu tür morfolojik değişiklikler gözlenmemiştir. Şekil 3'de görüldüğü gibi B16F10 hücreleri aynı

şekilde 10x'lik objektifte incelendiğinde 4T1 hücrelerine benzer şekilde 0. ve 4. morfolojilerinde bir değişiklik gözlenmemiştir ve hücrelerin büyük bir yüzdesinin sağlıklı olduğu anlaşılmaktadır.

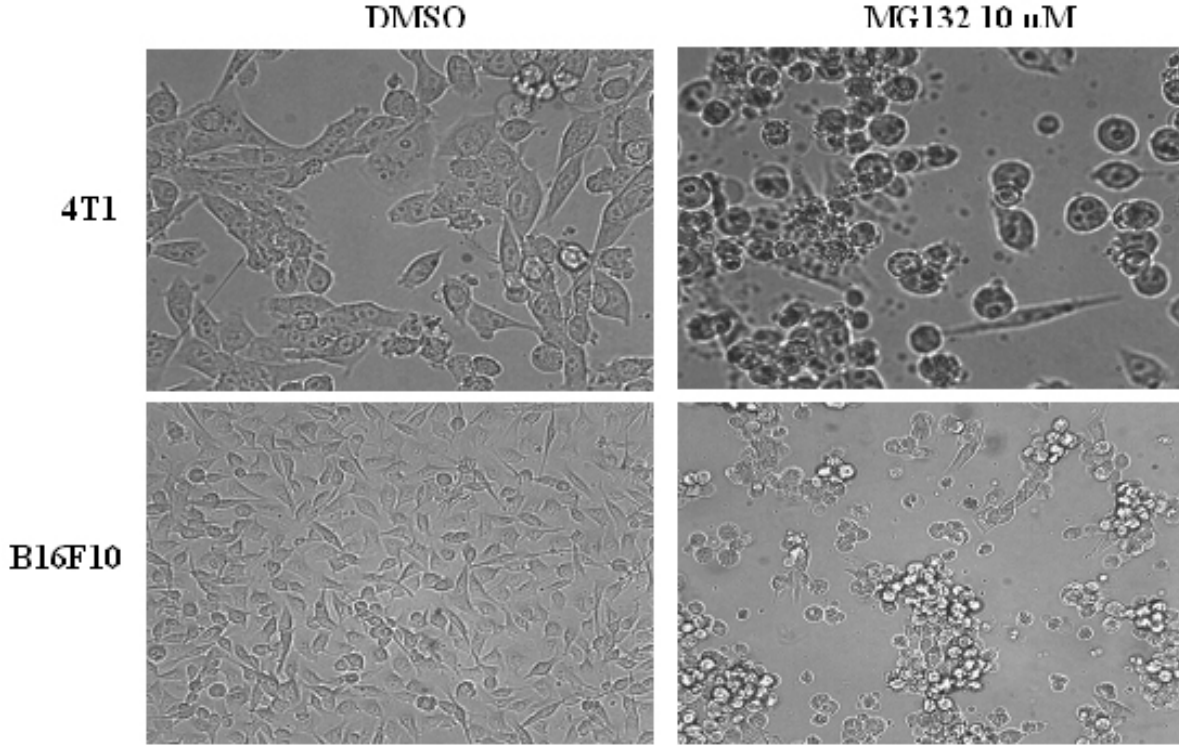


Şekil 2. Proteozom inhibitörü MG132 ile muamele sonucu 4T1 hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler. 4T1 hücrelerinin farklı sürelerde % 0.1 DMSO, 10 µM ve 50 µM MG132 ile muamelesi sonucu oluşan morfolojik değişimler 10x objektifte kaydedilmiştir.



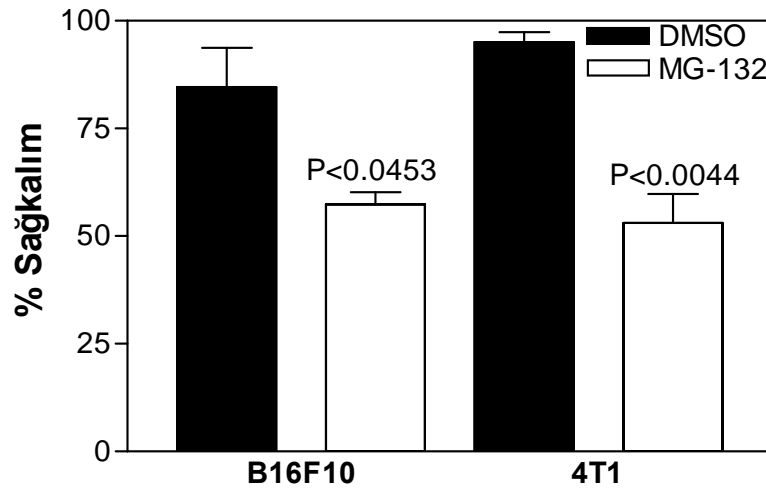
Şekil 3. Proteozom inhibitörü MG132 ile muamele sonucu B16F10 hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler. B16F10 hücrelerinin farklı sürelerde % 0.1 DMSO, 10 µM ve 50 µM MG132 ile muamelesi sonucu oluşan morfolojik değişimler 10x objektifte kaydedilmiştir.

4T1 hücrelerinden farklı olarak 10 µM MG132 muamele edilen B16F10 hücrelerinde 8. saatten itibaren morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Şekil 4'deki 4T1 ve B16F10 hücreleri 40x'lik objektifte incelendiğinde 24. saatte % 0.1 DMSO muamele edilen (kontrol) hücrelerde herhangi bir değişim gözlenmez iken 10 µM MG-132 ile muamele edilmiş 4T1 ve B16F10 hücrelerinde ise morfolojik değişimler daha detaylı gözlenmiştir. Hücrelerin morfolojik değişimlerinden elde edilen sonuca göre her iki hücre kültürünün proteozom inhibitörü MG132'ye karşı hassas olduğu ve her iki hücre kültüründe sitotoksik etki yarattığı anlaşılmaktadır. Proteozom inhibitörü MG-132'nin sitotoksik ve anti-proliferasyon etkileri tripan mavisi ile yaptığımız % sağkalım deneyleri ile doğrulanmıştır.



Şekil 4. MG132 muamelesinin 4T1 ve B16F10 hücrelerinde sebep olduğu morfolojik değişimlerin analizi. % 0.1 DMSO ve 10 µM MG132 muamelesi ile 24 saat sonunda her iki hücre kültüründe meydana gelen morfolojik değişiklikler 40x objektif ile kaydedilmiştir.

Tripan mavisi testi için petri kaplarına eşit sayıda 4T1 ve B16F10 hücreleri ekildi. Logaritmik fazda olan hücreler % 0.1 DMSO ve 10 µM MG132 ile 24 saat inkübe edildiler. Daha sonra tripan mavisi ilave edilen hücreler thoma lamı üzerinde inverted mikroskop yardımıyla incelendiler. Her grup için canlı ve ölü hücreler thoma lamında sayıldı ve Materyal ve Metot bölümünde görülen formül yardımıyla % sağkalım hesaplandı. % sağkalım grafiği incelendiğinde % 0.1 DMSO ile muamele edilen 4T1 hücrelerinin % 95 ± 2.4 'ünün canlı olduğu belirlenmiştir. Buna karşın 10 µM MG132 ile muamele edilen 4T1 hücrelerinin % 53 ± 6.8 'inin ($p < 0.0044$) canlı olduğu görülmektedir. Benzer şekilde B16F10 canlı kalan hücrelerin oranı kontrolde % 84.7 ± 9.05 iken 10 µM MG132 ile muamele edilen hücrelerde bu oran % 57.4 ± 2.8 ($p < 0.0453$) olarak belirlenmiştir (Şekil.5). Bu sonuçların, GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki analizi yapıldığında proteozom inhibitörü MG132'nin her iki kanser hücrelerinde önemli oranda sitotoksik etki yarattığı ve her iki kanser hücrelerinin proteozom inhibitörü MG132'ye karşı hassas olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 5. 4T1 ve B16F10 hücrelerinin % sağkalım grafiği. Hücreler, 10 µM MG132 ile 24 saat muamele edildikten sonra canlı ve ölü hücrelerin sayısı tripan mavisi testi ile belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kerr ve ark. (1972) yayınladıkları bir makalede iki tip hücre ölümünden bahsetmişlerdir; genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü apoptozis ile programlı olmayan ve yaralanmalar sonucu meydana gelen nekrozis [14, 15]. Daha sonra yapılan çalışmalarda doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulaması sonrası oluşan hücre ölümü apoptozis olarak tanımlanmış ve bu tip hücre ölümünün, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın fragmentlere ayrılması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi özellikleriyle ayırt edilebileceği belirtilmiştir [15, 16]. Üzerinde çalıştığımız 4T1 ve B16F10 kanser hücrelerini proteozom inhibitörü MG-132 ile muamele ettiğimizde hücrelerin petri kabının dibinden kalktığını ve besiyeri ortamında yüzer bir hal aldığını, küreselleştğini, küçülüp büzüldüğünü, komşu hücrelerden ayrıldığını, membran zarında küçük veziküllerin oluştuğunu ve üzerine düşen ışığı daha çok yansıttığını gözlemledik. Benzer morfolojik değişiklikler Zhang ve ark. (2005) tarafından HeLa hücrelerinin 0.1 µM 4DPG ile muamele edilmesi ile kaydedilmiştir ve bu hücrelerin apoptozise uğradıkları görülmüştür [17]. Yine benzer sonuçlar, spesifik proteozom inhibitörleri LLnV ve PSI ile muamele edilmiş HL60 hücrelerinde ilaç ilavesinden yaklaşık olarak 3-4 saat sonra hücrelerin bir kısmında apoptozis gözlenmiş ve morfolojik olarak da hücre membranında keseler ve hücre küçülmesi gözlenmiştir. Uzun süreli ilaç muamelesi sonucunda ise apoptozisin önemli belirteçlerinde olan DNA fragmentasyonu gözlenmiştir [18].

Proteozom inhibitörü MG132'nin sitotoksik ve anti-proliferasyon etkileri tripan mavisi ile yaptığımız sayım ile desteklenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, hem 4T1 hücrelerinde hem de B16F10 hücrelerinde, ilaç muamelesi sonucunda kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark elde edilmiştir. MTT-temelli test ile diğer bir proteozom inhibitörü Velcade'in (bortezomib) hem B16F10 hem de 4T1 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etki yarattığını ve bu etkinin oluşmasında p53 tümör baskılayıcı proteinin önemli rol oynadığını önceki çalışmamızda belirledik [19]. Fakat, 4T1 hücrelerinin p53 mutant hücreler olmalarına rağmen proteozom inhibisyonun bu hücrelerde yine apoptozisi uyardığını gözlemledik. Bu sonuçlar, proteozom inhibisyonun p53-bağımsız bir şekilde de apoptozisi uyardığını işaret eden önemli bulgulardır [19]. Yapılan diğer bazı önemli çalışmalarda ise, bazı tümör hücrelerinde (DHL4 lenfoma ve akciğer kanser hücresi H460) proteozom inhibitörleri ile apoptozis uyarılması için çok yüksek konsantrasyon kullanılması gerekmektedir (dirençli hücrelerdir); bazılarında ise proteozom inhibitörler apoptozis uyarılmasına tamamen engel olmaktadır (timüs hücreleri ve sempatetik nöronlar) [20-22]. Bu sebeple, elde ettiğimiz bu bulgular proteozom inhibitörlerinin tek başına veya kombine olarak başka inhibitörler ile kullanıldığında meme ve melanoma kanserlerinde etkili olma olasılığının yüksek olabileceğini önermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından A. Yerlikaya'ya verilen SBAG-105S351 No'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Hilt, W., Wolf, D.H. "Proteasomes: destruction as a programme", *Trends Biochem Sci.*, 21: 96-102 (1996).
- [2] Hershko, A., Ciechanover, A. "The ubiquitin system", *Annu Rev Biochem.*, 67: 425-79 (1998).
- [3] Yerlikaya, A. "Cellular functions of the 26S proteasome", *Turk J Biol.*, 28: 31-38 (2004).
- [4] Mani, A., Gelmann, E.P. "The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer", *J Clin Oncol.*, 23: 4776-89 (2005).
- [5] Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis", *Annu Rev Biochem.*, 68: 1015-68 (1999).
- [6] Adams, J. "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs", *Cancer Cell.*, 5: 417-21 (2004).
- [7] Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination", *Nature*, 360: 597-9 (1992).
- [8] Pagano, M. "Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway", *Faseb J.*, 11: 1067-75 (1997).
- [9] He, H., Qi, X.M., Grossmann, J., Distelhorst, C.W. "c-Fos degradation by the proteasome. An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis", *J Biol Chem.*, 273: 25015-9 (1998).
- [10] Jentsch, S. "The ubiquitin-conjugation system", *Annu Rev Genet.*, 26: 179-207 (1992).
- [11] Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein", *Science*, 243: 1576-83 (1989).
- [12] Pickart, C.M. "Targeting of substrates to the 26S proteasome", *Faseb J.*, 11: 1055-66 (1997).
- [13] Lee, D.H., Goldberg, A.L. "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists", *Trends Cell Biol.*, 8: 397-403 (1998).
- [14] Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer*, 26: 239-57 (1972).
- [15] Edinger, A.L., Thompson, C.B. "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy", *Curr Opin Cell Biol.*, 16: 663-9 (2004).
- [16] Clarke, P.G. "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms", *Anat Embryol (Berl)*, 181: 195-213 (1990).
- [17] Zhang, Q.Y., Jiang, M., Zhao, C.Q., Yu, M., Zhang, H., Ding, Y.J., Zhai, Y.G. "Apoptosis induced by one new podophyllotoxin glucoside in human carcinoma cells", *Toxicology*, 212: 46-53 (2005).
- [18] Drexler, H.C. "Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94: 855-60 (1997).
- [19] Yerlikaya, A., Erin, N. "Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade", *Int J Mol Med.*, 22: 817-23 (2008).
- [20] Sadoul, R., Fernandez, P.A., Quiquerez, A.L., Martinou, I., Maki, M., Schroter, M., Becherer, J.D., Irmeler, M., Tschopp, J., Martinou, J.C. "Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons", *Embo J.*, 15: 3845-52 (1996).
- [21] Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R., Cooper, G.M. "p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors", *J Biol Chem.*, 272: 12893-6 (1997).
- [22] Chauhan, D., Hideshima, T., Mitsiades, C., Richardson, P., Anderson, K.C. "Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma", *Mol Cancer Ther.*, 4: 686-92 (2005).