

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΗ
Cdc37 ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αβραάμ Ελ Χαμιτιέ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή (Τ.Σ.Ε.):

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (Επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ν. ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑΚΗΣ: Ερευνητής Β', Εργαστήριο Μελέτης Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακών Τσαπερονών (Συνοδές Πρωτεΐνες), Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

Γ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Καθηγητής, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή (Ε.Ε.Ε):

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (Επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ν. ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑΚΗΣ: Ερευνητής Β, Εργαστήριο Μελέτης Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακών Τσαπερονών (Συνοδές Πρωτεΐνες), Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

Γ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Καθηγητής, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ε. ΠΑΤΣΑΒΟΥΔΗ: Καθηγήτρια, Τμήμα Τεχνολογίας Ιατρικών Οργάνων Τ.Ε.Ι. Αθήνας και Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Ε.Ι.Π), Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Ογκολογίας.

Δ.ΣΤΑΓΚΟΣ: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κ. ΛΙΑΔΑΚΗ: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΑΒΡΑΑΜ ΕΛ ΧΑΜΙΤΙΕ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΑΠΟ ΤΗ
Cdc37 ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός Προκαταρκτικών Σελίδων: 20

Συνολικός Αριθμός Σελίδων: 186

Σύνολο Πινάκων: 6

Σύνολο Εικόνων: 32

Σύνολο Σχημάτων: 4

Αριθμός Παραρτημάτων: 1

Αριθμός Βιβλιογραφικών Αναφορών: 149

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι συνοδές πρωτεΐνες αποτελούν μια ομάδα εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών με ευρεία κατανομή στα βακτήρια και όλους ανεξαιρέτως τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η παρουσία τους είναι αναγκαία για την κυτταρική επιβίωση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Κύρια λειτουργία τους είναι η σωστή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων και η παρεμπόδιση σχηματισμού συσσωμάτων από μη λειτουργικές πρωτεΐνες. Η ρυθμιστική αυτή δράση ασκείται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης των συνοδών πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες στόχους ή πελάτες τους, που είναι κυρίως πρωτεϊνικές κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες.

Από τα κυριότερα μέλη των συνοδών πρωτεϊνών και εκτενέστερα μελετημένη είναι η HSP90 και η συν-συνοδή της πρωτεΐνη Cdc37. Η HSP90 παρουσιάζει πλειοτροπική δράση, αλληλεπιδρώντας με ένα μεγάλο αριθμό από κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Για τη πλειοτροπική δράση της, η HSP90 συνεργάζεται με άλλες συνοδές και συν-συνοδές πρωτεΐνες. Κυριότερος συμπαράγοντας της HSP90 σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται να είναι η συν-συνοδή πρωτεΐνη Cdc37. Το διμερές Cdc37-HSP90 μέσω του σχηματισμού πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων ρυθμίζει την ενεργότητα μιας πλειάδας πρωτεϊνικών κινασών, σηματοδοτικών μορίων καθώς και υποδοχέων στεροειδών υποδοχέων ενδοκυτταρικά. Τόσο η HSP90 όσο και η Cdc37 εμπλέκονται στους κύριους μηχανισμούς επιβίωσης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, μέσω της συνοδείας που προσφέρουν στις απορρυθμισμένες στα καρκινικά κύτταρα κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και υποδοχείς. Για το λόγο αυτό αποτελούν ελκυστικό στόχο για χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

Προσφάτως, έχει δειχθεί από το εργαστήριο μας πως η HSP90 εντοπίζεται όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα -όπως ήταν γνωστό μέχρι τότε- αλλά και στην επιφάνεια των μελανωμάτων ποντικού και καρκινικών κυττάρων μαστού. Επιπλέον δείχθηκε πως η επιφανειακή HSP90 αλληλεπιδρά με το εξωκυτταριο τμήμα του HER-2 υποδοχέα.

Ειδικότερα και χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSP90, mAb 4C5 το οποίο αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας στο παρελθόν και έχει την ιδιότητα να μην ενδοκυτταρώνεται, δείχθηκε πως η λειτουργική αναχαίτιση της επιφανειακής HSP90 μειώνει τη διηθητική ικανότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453. Η μείωση αυτή συσχετίζεται με την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της επιφανειακής HSP90 και του εξωκυττάρου τμήματος του HER-2 υποδοχέα, η οποία και οδηγεί στη μειωμένη ενεργοποίησή του. Επιπλέον, *in vivo* πειράματα σε ποντίκια έδειξαν πως το mAb 4C5 μειώνει το σχηματισμό μεταστατικών όγκων από αυτόλογα καρκινικά κύτταρα μελανώματος και αυξάνει το προσδόκιμο επιβίωσης των ποντικών αυτών.

Έχοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα, εξετάστηκε αρχικά ο εντοπισμός της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Για να διευκρινίσουμε κατά πόσο ο εντοπισμός της Cdc37 περιορίζεται μόνο στα MDA-MB 453 όπου υπερεκφράζεται ο HER-2 υποδοχέας ο οποίος αλληλεπιδρά με την HSP90, εξετάστηκε επιπλέον και η κυτταρική σειρά MDA-MB 231, η οποία δεν εκφράζει τον Her-2 υποδοχέα αλλά τον EGFR. Η Cdc37 εντοπίστηκε στην κυτταρική επιφάνεια και αυτής της κυτταρικής σειράς. Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια των κυττάρων αυτών, μεμβρανικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση, όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία της Cdc37 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Προχωρώντας ένα βήμα παρακάτω χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία siRNA με την οποία αφού έγινε αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της Cdc37 στις δύο κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε μειωμένη χρώση με το συγκεκριμένο εμπορικό αντίσωμα έναντι της Cdc37. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν περαιτέρω την αρχική παρατήρηση, ενώ ταυτόχρονα πιστοποίησαν την ειδική δέσμευση του αντισώματος στην κυτταρική επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα έναντι της Cdc37 και της HSP90, δείχθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στην επιφάνεια ζωντανών MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κυττάρων.

Με βάση τα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας, όπου η επιφανειακή HSP90 φαίνεται πως συμμετέχει στην διήθηση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 453 διερευνήθηκε κατά πόσο και η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διαδικασία αυτή. Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο πως η όποια παρατήρηση θα μπορούσε να οφείλεται στην αναχαίτιση της ενδοκυτταρικής Cdc37, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ενδοκύττωσης του εμπορικού αντισώματος στα MDA-

MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα. Στη δοκιμασία αυτή φάνηκε πως το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν ενδοκυττώνεται σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά παρέμεινε δεσμευμένο στην επιφάνεια των κυττάρων με το πέρας 16 και πλέον ωρών. Επιστρατεύοντας τη δοκιμασία ‘επούλωσης της πληγής’, φάνηκε πως το αντι-Cdc37 αντίσωμα μείωνε σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων και των δυο κυτταρικών σειρών, καταδεικνύοντας πως η επιφανειακή Cdc37 εμπλέκεται στο μηχανισμό καρκινικής διήθησης. Στην ίδια σειρά πειραμάτων, το mAb 4C5 φάνηκε επίσης πως μειώνει τη διήθηση των MDA-MB 231 κυττάρων.

Με σκοπό να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 μεμβρανικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις δύο κυτταρικές σειρές ανοσοκατακρημνίστηκαν χρησιμοποιώντας αντι-Cdc37 αντίσωμα. Τα ανοσοκατακρημνίσματα στη συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα όπου φάνηκε πως η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με την επιφανειακή HSP90 τόσο στα MDA-MB 453 όσο και στα MDA-MB 231 κύτταρα. Στην ίδια σειρά πειραμάτων η επιφανειακή Cdc37 φάνηκε πως αλληλεπιδρά με τον HER-2 και τον EGFR στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα αντίστοιχα, καθώς και ότι η επιφανειακή HSP90 αλληλεπιδρά με τον EGFR στα MDA-MB 231 κύτταρα. Επώαση των κυττάρων με το αντι-Cdc37 αντίσωμα έδειξε πως η αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 ελαττώνεται και στις δύο κυτταρικές σειρές ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η αλληλεπίδραση της Cdc37 με τον HER-2 και τον EGFR στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα, αντίστοιχα. Όταν τα παραπάνω κύτταρα επώαστηκαν με mAb 4C5, η αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 παρουσίασε μείωση και στις 2 κυτταρικές σειρές, ενώ αξιοσημείωτη ήταν η παρατήρηση πως μειωνόταν η αλληλεπίδραση της Cdc37 με τους HER-2 και EGFR. Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά, εξάγεται το συμπέρασμα πως στην κυτταρική επιφάνεια υπάρχει ένα σύστημα συνοδείας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, παρόμοιο με τον κλασσικό πλέον ενδοκυτταρικό μηχανισμό συνοδείας, με το σχηματισμό ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου με τη μορφή Cdc37-HSP90-HER-2/EGFR. Το μοντέλο αυτό ενισχύεται από τα περαιτέρω πειράματα που διεξήχθησαν όπου δείχθηκε πως η λειτουργική αναχαίτιση της επιφανειακής Cdc37 χρησιμοποιώντας το αντι-Cdc37 αντίσωμα, οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλίωσης/ ενεργοποίησης του Akt στα MDA-MB 453 κύτταρα καθώς και μείωση της φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των EGFR, Akt και MEK στα MDA-MB 231 κύτταρα. Στα MDA-MB 231 κύτταρα η λειτουργική

αναχαίτιση της επιφανειακής HSP90 χρησιμοποιώντας το mAb 4C5 έδειξε επίσης πως μειώνεται η φωσφορυλίωση/ενεργοποίηση των EGFR, Akt και MEK.

Σε παράλληλη εργασία του εργαστηρίου μας δείξαμε πως η HSP90 εκκρίνεται στο υλικό καλλιέργειας τόσο των MDA-MB 453 όσο και των MDA-MB 231 κυττάρων. Η εκκρινόμενη HSP90 φαίνεται πως συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9.

Στη συνέχεια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η *in vivo* συμμετοχή της επιφανειακής HSP90 στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι δύο κυτταρικές σειρές MDA-MB 453 και MDA-MB 231 σε δύο μοντέλα ξеноμοσχευμάτων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια SCID. Στο πρώτο μοντέλο μελετήθηκε η απόθεση των MDA-MB 453 στους πνεύμονες των ποντικών με προηγούμενη επώαση ή μη των κυττάρων με το χημειοθεραπευτικό αντι-HSP90 αντίσωμα ch 4C5. Στο συγκεκριμένο πείραμα φάνηκε πως στα ζώα όπου είχαν εισαχθεί κύτταρα που προηγουμένως είχαν επωαστεί με το αντι-HSP90 αντίσωμα, τα κύτταρα που κατάφεραν να εναποθετηθούν στους πνεύμονες ήταν πολύ λιγότερα σε σχέση με τους μάρτυρες. Στο δεύτερο πείραμα, ενέθηκαν ενδοφλεβίως MDA-MB 231 κύτταρα και στη συνέχεια τα ποντίκια έλαβαν θεραπεία είτε με mAb 4C5 αντίσωμα είτε με PBS (μάρτυρες) για 2 εβδομάδες. Επτά εβδομάδες αργότερα διαπιστώθηκε πως τα ζώα που έλαβαν το mAb 4C5 αντίσωμα, παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο αριθμό καρκινικών μεταστατικών εστιών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Τέλος, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του φυτού *Vitis vinifera* (σταφύλι) στα MDA-MB 453 κύτταρα, για τη δράση του στις συνοδές πρωτεΐνες στα καρκινικά κύτταρα. Βρέθηκε πως παρόλο που δεν έχει κάποια επίδραση στο σχηματισμό του διμερούς Cdc37-HSP90, ούτε στα συνολικά επίπεδα έκφρασης της HSP90, μειώνει την έκφραση της συνολικής Cdc37. Επιπλέον επηρεάζει διαφορετικά την έκφραση της HSP70 καθώς και την πρωτεόλυση μέσω της συνολικής ουμπικιτίωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών. Εν κατακλείδι δείχθηκε πως το φυτικό εκχύλισμα επάγει τον κυτταρικό θάνατο των MDA-MB 453 καθώς και την παρεμπόδιση της ολοκλήρωσης της διαδικασίας μίτωσης.

Τα δεδομένα από την παρούσα διατριβή ενισχύουν την άποψη ύπαρξης ενός εξωκυτταρίου συστήματος συνοδείας, όπου κατά αναλογία με το κλασσικό ενδοκυτταρικό μηχανισμό δράσης των συνοδών πρωτεϊνών, δρουν συνεργατικά μέσω ποικίλων αλληλεπιδράσεων ούτως ώστε να ρυθμίζεται ένα σύνολο από βιομόρια. Το

σύστημα αυτό αποτελεί ελκυστικό στόχο στην θεραπεία της μετάστασης του καρκίνου.

