

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

Ρύθμιση της λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών από τη Cdc37 και την ομάδα των  
συνοδών πρωτεϊνών

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 (Συνοδός 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 (Συνοδός 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

Ρύθμιση της λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών από την Cdc37  
και την ομάδα των συνοδών πρωτεϊνών



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 εξωκυττάριο 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



εξωκυττάριου 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-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 φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης 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 ξενομοσχευμάτων 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 ουμπικιτώσης 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 εξωκυττάριου 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.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) υπό την επίβλεψη της Δρ. Ε. Πατσαβούδη την οποία και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την επιστημονική υποστήριξη, το ενδιαφέρον και την κατανόηση καθώς επίσης και τη φιλική διάθεση που επέδειξε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Ν. Γραμματικάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την 'ξενάγηση' που μου έκανε στο κόσμο των συνοδών πρωτεϊνών. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής Δρ. Δ. Κουρέτα και Δρ. Γ. Μόσιαλο που αποδέχθηκαν να είναι μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου και το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Μόσιαλου, Ειρήνη Τρομπούκη και Αγγελική Τσαγκαράτου για την καθοδήγηση που μου παρείχαν στην κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων siRNA.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στους Δρ. Δημήτρη Στέλλα και Δρ. Κατερίνα Σιδερά για το κλίμα συναδελφικότητας και συνεργασίας στο εργαστήριο μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δημήτρη που με εισήγαγε στις τεχνικές των κυτταροκαλλιιεργειών, τις αμέτρητες ώρες στην παραγωγή του mAb 4C5 καθώς και την εκπαίδευση που μου παρείχε στους *in vivo* χειρισμούς. Την Κατερίνα για όλες τις πειραματικές συμβουλές και προβληματισμούς και τη συνεργασία καθ'όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη Δρ. Αυγή Μαμαλάκη και τα μέλη του εργαστηρίου της για την ευχάριστη και παραγωγική εργαστηριακή συγκατοίκηση. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την Ανδριάνα Παπαδημητροπούλου και τον Δρ. Πέτρο Ηλιάδη, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις επί των πειραμάτων.

Να ευχαριστήσω επίσης όλους τους φίλους και συναδέλφους στο εργαστήριο Μοριακής Νευρολογίας του Ε.Ι.Π., παλιούς και νέους, και ιδιαίτερα τους Δρ. Μαρία Γαϊτάνου για τη ποικιλότητα βοήθεια που μου παρείχε όποτε της το ζητούσα, τον Δρ. Αλέξανδρο Λάβδα για τη βοήθεια στη συνεστιακή μικροσκοπία και ψηφιακή απεικόνιση, τη Δρ. Φλωρεντία Παπαστεφανάκη, τη Δρ. Γεωργία Κουρούπη, τον Κωστή Τσιώρα για τα καθημερινά, μικρά μα συνάμα μεγάλα που μοιραστήκαμε καθημερινά.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Πολίτη για τις πολύτιμες επιστημονικές και όχι μόνο συμβουλές του.

Στη φίλη Δρ. Πένυ Σμυρλή από το εργαστήριο Μοριακής Παρασιτολογίας για το αμείωτο ενδιαφέρον της και την πολύπλευρη βοήθεια που μου παρέχει από την πρώτη στιγμή της γνωριμίας μας, εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Επίσης ευχαριστώ την Δρ. Τζένη Παπαλέξη για τη φιλία, τις συμβουλές και τη στήριξη της προς εμένα.

Τον πολυτεχνίτη (με όλη τη σημασία της λέξεως) Κώστα Λασιθιωτάκη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε τόσο όταν ο Η/Υ αρνιόταν να συνεργαστεί μαζί μου όσο και για τον υπολογιστή που τελικά μου χάρισε, για να διεκπεραιώσω τις απαραίτητες εργασίες, θα ήθελα και εδώ να τον ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τον συνταξιούχο πλέον τυπογράφο κ. Σπύρο Γκουζέλο που επιμελήθηκε την εκτύπωση της παρούσας διατριβής.

Την Εύη για την κατανόηση, την υπομονή και υποστήριξη της καθώς και την καλλιτεχνική συμβολή της στο κείμενο της διατριβής, ευχαριστώ. Η παρουσία της ήταν καταλυτική.....

Τέλος, αν και δεν μπορεί να χωρέσει σε λίγες γραμμές, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου. Παρ' όλες τις αντιξοότητες με στήριξαν και (συνεχίζουν να με στηρίζουν ακόμη) με κάθε τρόπο, οικονομικά και ηθικά σε κάθε μου προσπάθεια. Χωρίς τον δικό τους καθημερινό αγώνα, η πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη. Ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης θα ήθελα να τους αφιερώσω τη διατριβή αυτή...

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ABBREVIATIONS)	1
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
A. Συνοδά και Συν-Συνοδά Μόρια	4
A.1. Συνοδά Μόρια	4
A.2. Συν-συνοδά μόρια	4
A.3. Η Συνοδή Πρωτεΐνη HSP90	5
A.3.1. Γενικά Χαρακτηριστικά της HSP90	5
A.3.2. Η Δομή της HSP90	7
A.3.3. Μηχανισμοί Δράσης της HSP90	9
A.3.4. HSP90 και Καρκίνος	14
A.4. Η Συν-Συνοδή Πρωτεΐνη Cdc37	16
A.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά της Cdc37	16
A.4.2. Δομή και Λειτουργία της Cdc37	19
A.4.3. Αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90	20
A.4.4. Αλληλεπίδραση της Cdc37 με τις Κινάσες	21
A.4.5. Δράση της Cdc37 ανεξάρτητη από την HSP90	23
A.4.5. Στόχοι της Cdc37 εκτός από Κινάσες	23
A.4.6. Cdc37 και Καρκίνος	24
B. ΚΙΝΑΣΕΣ	26
B.1. Γενικά Χαρακτηριστικά Κινασών	26
B.1.2. Δομή και Λειτουργία Κινασών	26
B.2. Υποδοχείς Κινάσης Τυροσίνης	27
B.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά Κινάσης Τυροσίνης	27
B.2.3. HER-2 Υποδοχέας	29
B.2.2. EGFR Υποδοχέας	31
B.3. Ενδοκυτταρικές Κινάσες	32
B.3.1. MAP Κινάσες	32
B.3.2. Το Μονοπάτι PI3K/Akt	33
B.4. Κινάσες και Καρκίνος	33

B.4.1. HER-2 και Καρκίνος	34
B.4.2. EGFR και Καρκίνος	34
Γ. Μεταλλοπρωτεάσες	38
Γ.1. Γενικά Χαρακτηριστικά Μεταλλοπρωτεασών	38
Γ.2. Δομή των Μεταλλοπρωτεασών	38
Γ.2.1. Ρύθμιση της Λειτουργίας των Μεταλλοπρωτεασών	40
Γ.2.2. Ενεργοποίηση: Ο Διακόπτης Κυστεΐνης	40
Γ.3. Μεταλλοπρωτεΐνάσες και Καρκίνος	41
Δ.1. Μονοκλωνικά Αντισώματα και Καρκίνος	43
Δ.2. Το Μονοκλωνικό Αντίσωμα mAb 4C5	43
ΣΚΟΠΟΣ	45
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
A. ΥΛΙΚΑ	48
A.1. Αντιδραστήρια	48
A.2. Αναλώσιμα	49
A.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός	49
A.4. Αντισώματα	50
A.5. Κυτταρικές σειρές	51
A.6. Πειραματόζωα	52
A.7. Διαλύματα	52
A.7.1. Ρυθμιστικά διαλύματα	52
A.7.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)	52
A.7.3. Διαλύματα χρώσης των πρωτεϊνικών στυπομάτων	54
A.7.4. Διαλύματα κυτταρικής λύσης	54
B. ΜΕΘΟΔΟΙ	55
B.1. Βιοχημικές Τεχνικές	55
B.1.1. Παρασκευή Ομογενοποιημάτων από Εμβρυϊκό Εγκέφαλο Επιμυός	55

B.1.2. Συμπύκνωση του Μονοκλωνικού Αντισώματος 4C5	55
B.1.3. Αλλαγή του Διαλυτικού Μέσου με Διαπίδυση	55
B.1.4. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Κάθετο Πήκτωμα Πολυ-Ακρυλαμίδης Παρουσία Θεϊκού Δωδεκυλικού Νατρίου (SDS-PAGE)	56
B.1.4.1. Εμφάνιση των πρωτεϊνικών στυπωμάτων με χρήση διαλύματος χρώσης (Coomasie) και αποχρωματισμού (Destain)	57
B.1.4.2. Ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για ανοσοαποτύπωμα	57
B.2. Δοκιμασία Μετανάστευσης σε Καλλιέργειες Καρκινικών Κυττάρων	57
B.2.1. Λύση Κυττάρων	58
B.3. Ανοσοβιολογικές Τεχνικές	58
B.3.1. Ηλεκτροφορητική Μεταφορά Πρωτεϊνών σε Φίλτρο Νιτροκυτταρίνης και Ανοσοαποτύπωμα	58
B.3.2. Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)	60
B.4. Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές	60
B.4.1. Χρώση Ανοσοφθορισμού	60
B.4.2. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός	61
B.4.2.1. Ανοσοφθορισμός σε ζωντανά (live) κύτταρα	61
B.4.3. Ιστοχημική χρώση ιστών με Αιματοξυλίνη - Εωσίνη	62
B.5. Ζυμογραφίες	63
B.6. <i>In vivo</i> μελέτη της μετάστασης	64
B.6.1. Είδη ενέσεων και χειρισμοί πειραματόζων	64
B.6.2. Πειραματική πορεία <i>in vivo</i> μεταστατικών μοντέλων	64
Γ. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	65
Γ.1. Ανάλυση Μορίων DNA με Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης	65
Γ.2. Απομόνωση και Καθαρισμός Τμημάτων DNA από Πηκτώματα Αγαρόζης	65
Γ.3. Ενζυμική Επεξεργασία Νουκλεϊνικών Οξέων	66
Γ.3.1. Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	66
Γ.3.2. Αποφωσφορυλίωση άκρων DNA	67



Γ.3.3. Σύνδεση του πλασμιδίου φορέα και του προς κλωνοποίηση DNA μορίου με T4 DNA λιγάση	67
Γ.3.4. Καθαρισμός Προϊόντων Ενζυμικών Αντιδράσεων	68
Γ.4. Καλλιέργεια <i>Escherichia Coli</i> ( <i>E. Coli</i> )	69
Γ.4.1. Μετασχηματισμός Καλλιεργειών <i>E. Coli</i> μέσω Θερμικού Σοκ	69
Γ.5. Μέθοδοι Απομόνωσης Πλασμιδιακού DNA από Καλλιέργειες Βακτηρίων	70
Γ.5.1. Απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA ( <i>mini prep</i> )	70
Γ.5.2. Απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA ( <i>maxi prep</i> )	70
Γ.6. Τεχνολογία shRNA (short hairpin RNA)	71
Δ. Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	72
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
A. Διερεύνηση της παρουσίας συνοδών μορίων στην επιφάνεια καρκινικών σειρών	74
A.1. Η Cdc37 εντοπίζεται ανοσοϊστοχημικά στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων μαστού	74
A.1.2. Επιβεβαίωση του εντοπισμού της Cdc37 στην κυτταρική μεμβράνη των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 με ανοσοαποτύπωση	77
A.1.3. Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικά κύτταρα με τη χρήση της τεχνολογίας siRNA	78
A.1.4. Η Cdc37 και Hsp90 συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια	81
A.1.5. Η HSP90 και η Cdc37 δεν εντοπίζονται στην επιφάνεια μη καρκινικών κυττάρων (φυσιολογικών) μαστού	82
B. <i>In vitro</i> μελέτη της συμμετοχής συνοδών πρωτεϊνών στη διηθητική συμπεριφορά καρκινικών σειρών	83
B.1.1. Το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώνεται αλλά παραμένει προσδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κυττάρων	84
B.1.2. Η παρεμπόδιση της επιφανειακής Cdc37 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-	86

MB 453 και MDA-MB 231 <i>in vitro</i>	
B.1.3. Η παρεμπόδιση της επιφανειακής HSP90 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 231 <i>in vitro</i>	88
Γ. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των εξωκυττάρων συνοδών μορίων	90
Γ.1.1. Η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με την επιφανειακή HSP90 στα MDA-MB 453 και MDA-MB231 κύτταρα	90
Γ.1.2. Η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με τον HER-2 στα MDA-MB 453 κύτταρα και με τον EGFR στα MDA-MB 231	91
Γ.1.3. Τα συνοδά μόρια HSP90 και Cdc37 συμμετέχουν σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων	92
Γ.1.4. Μελέτη του ρόλου της επιφανειακής Cdc37 στη φωσφορυλίωση ενδοκυτταρικών κινασών - Μεταγωγή σήματος	93
Γ.1.5. Μελέτη του ρόλου της εξωκυττάριας HSP90 στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9	96
Γ.1.5.1. Η εξωκυττάρια HSP90 συμβάλλει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 που εκκρίνονται από τα MDA-MB 453 κύτταρα	96
Γ.1.5.2. Η HSP90 εκκρίνεται στο υπερκείμενο των κυττάρων MDA-MB 231 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9	97
Δ. <i>In vivo</i> μελέτη του ρόλου της επιφανειακής συνοδής πρωτεΐνης HSP90 στη μεταστατική συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων	99
Δ.1. <i>In vivo</i> μελέτη της παρεμπόδισης μεταστατικής απόθεσης των MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια SCID	99
Δ.2. <i>In vivo</i> μελέτη της παρεμπόδισης της μεταστατικής συμπεριφοράς των MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια SCID	101
Ε. Μελέτη φυσικού εκχυλίσματος στη βιοχημεία του καρκίνου	103
Ε.1. Επίδραση στη βιωσιμότητα των MDA-MB 453 κυττάρων	103
Ε.2. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στις συνοδές πρωτεΐνες	105
Ε.3. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στην ουμπικιτιώση των κυτταρικών πρωτεϊνών	106
Ε.4. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στο κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων	107

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
Α. Εντοπισμός της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού	112
Β. Η επιφανειακή Cdc37 και HSP90 συμμετέχει στη διήθηση καρκινικών κυττάρων <i>in vitro</i>	114
Γ. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 κατά τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων	116
Γ.1. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων των επιφανειακών συνοδών πρωτεϊνών Cdc37, HSP90 και των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης HER-2 και EGFR	116
Γ.2. Μελέτη της συμμετοχής των επιφανειακών συνοδών πρωτεϊνών HSP90 και Cdc37 στη μεταγωγή σήματος	118
Γ.3. Μελέτη της συμμετοχής της HSP90 στην ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9	119
Δ. Μελέτη του ρόλου της επιφανειακής HSP90 στη μεταστατική συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων <i>in vivo</i>	120
Ε. Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος του φυτού <i>Vitis vinifera</i> (Τυρνάβου) στα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB 453	122
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125
SUMMARY	134
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	138

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Εικόνα 1: Δομή της HSP90, αλληλεπίδραση με νουκλεοτίδια αδενίνης, GA και TPR περιοχές συν-συνοδών μορίων
- Εικόνα 2: Κύκλος ATPάσης και πρόσδεση υποστρώματος
- Εικόνα 3: Δομή της Cdc37 όπου αναπαριστώνται οι περιοχές δέσμησης με τις κινάσες, την HSP90, τη περιοχή φωσφορυλίωσης της και γνωστά δομικά στοιχεία από κρυσταλλογραφικά δεδομένα
- Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτεϊνικού συμπλόκου Cdc37/HSP90/κινάσης
- Εικόνα 5: Τριτοταγής δομή του ενεργού κέντρου της κινάσης
- Εικόνα 6: Το δίκτυο των EGFR υποδοχέων και οι φαρμακολογικοί στόχοι του
- Εικόνα 7: Γραφική αναπαράσταση της ενεργοποίησης των MMPs
- Εικόνα 8: Ρόλοι των MMPs στον καρκίνο

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Εικόνα 1: Εντοπισμός της Cdc37 στην επιφάνεια των MDA-MB 453 (A) και MDA-MD 231(B) καρκινικών κυττάρων
- Εικόνα 2: Επιβεβαίωση του επιφανειακού εντοπισμού της Cdc37 με ανοσοαποτύπωση
- Εικόνα 3: Κατασκευή φορέων έκφρασης siRNA
- Εικόνα 4: Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία siRNA (Δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης)
- Εικόνα 5: Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία siRNA (Δοκιμασία ανοσοφθορισμού σε ζωντανά κύτταρα)
- Εικόνα 6: Συνεντοπισμός των Cdc37 και HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια
- Εικόνα 7: Οι Cdc37 και HSP90 δεν εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού
- Εικόνα 8: Το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώνεται, αλλά παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια
- Εικόνα 9: Η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 453

- Εικόνα 10: Η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 231
- Εικόνα 11: Η επιφανειακή HSP90 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 231
- Εικόνα 12: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειακών Cdc37-HSP90, Cdc37-HER2 και Cdc37-EGFR
- Εικόνα 13: Η μεμβρανική HSP90 αλληλεπιδρά με τον EGFR
- Εικόνα 14: Μελέτη της επίδρασης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 στη μεταγωγή σήματος στα MDA-MB 453 κύτταρα
- Εικόνα 15: Μελέτη της επίδρασης των επιφανειακών Cdc37 και Hsp90 στη μεταγωγή σήματος στα MDA-MB 231 κύτταρα
- Εικόνα 16: Η εκκρινόμενη HSP90 συμβάλλει στην ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9
- Εικόνα 17: Η HSP90 α και HSP90 β εκκρίνονται στο υλικό καλλιέργειας των MDA-MB 231 κυττάρων
- Εικόνα 18: Η εξωκυττάρια HSP90 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9 στα MDA-MB 231
- Εικόνα 19: Παρεμπόδιση της εναπόθεσης MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων στους πνεύμονες ποντικού από το mAb 4C5
- Εικόνα 20: Μείωση της δημιουργίας μεταστατικών εστιών MDA-MB 231 κυττάρων στους πνεύμονες ποντικού από το mAb 4C5
- Εικόνα 21: Διερεύνηση πιθανής αναχαιτίσης της αλληλεπίδρασης των Cdc37 και HSP90 από εκχύλισμα *Vitis vinifera*
- Εικόνα 22: Επίδραση του εκχυλίσματος στα επίπεδα των Συνοδών πρωτεϊνών Cdc37, HSP90 και HSP70
- Εικόνα 23: Ουμπικιτίωση των πρωτεϊνών στα MDA-MB 453 κύτταρα μετά από επίδραση εκχυλίσματος καρπού *Vitis vinifera*
- Εικόνα 24: Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επίδρασης του εκχυλίσματος στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Σχήμα 1: Μοριακός χάρτης του πλασμιδίου pLentiLox 3.7 (pLL3.7)
- Σχήμα 2: Αναχαίτιση του σχηματισμού μεταστατικών αποθέσεων
- Σχήμα 3: Αναχαίτιση της δημιουργίας μεταστατικών εστιών
- Σχήμα 4: Επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του *Vitis vinifera* στην επιβίωση των MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Πίνακας 1: Οι Συνοδές πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 με τα κυριότερα συν-συνοδά τους μόρια
- Πίνακας 2: Κύρια συν-συνοδά μόρια της HSP90 και λειτουργικότητα τους
- Πίνακας 3: Υποστρώματα της HSP90
- Πίνακας 4: Υποστρώματα της HSP90 που εμπλέκονται σε καρκινικούς φαινοτύπους
- Πίνακας 5: Κινάσες θηλαστικών με τις οποίες αλληλεπιδρά η Cdc37
- Πίνακας 6: Ονοματολογία και δομή των MMPs



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ABBREVIATIONS)

ATP	Adenosine 5' -Triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ADP	Adenosine Diphosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine	5-βρωμο-2-δεοξυουριδίνη
BSA	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη από ορό βοός
cDNA	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
Cdc37	cell division cycle 37 protein	Πρωτεΐνη κυτταρικού κύκλου διαίρεσης 37
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water	Δις-απεσταγμένο και απιονισμένο H <sub>2</sub> O
DAB	3,3-Diaminobenzidine	3,3- διϋδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium	Θρεπτικό υλικό Dulbeco's
E	Embryonic day	Εμβρυϊκή μέρα
ECM	Extracellular Matrix	Εξωκυτταρικό στρώμα
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός παράγοντας αύξησης
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας του Επιδερμικού παράγοντα αύξησης
ERK1/ERK2	Extracellular signal regulated kinase 1/2	Ενεργοποιούμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες 1/2
FAK	Focal Adhesion Kinase	Κινάση εστιακής συγκόλλησης
FBS	Fetal Bovine Serum	Ορός εμβρύου βοός
GA	Geldanamycin	Γελδαμυκίνη
GTPases	Guanosine Triphosphate Phosphatases	Φωσφατάσες των τριφωσφορικών γουανοσίνων
HSP70	Heat Shock Protein 70	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 70
HSP90	Heat Shock Protein 90	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90



HRG	Heregulin	
KDa	Kilodalton	
mAb 4C5	Monoclonal antibody 4C5	Μονοκλωνικό αντίσωμα 4C5
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases	Ενεργοποιούμενες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες
MMPs	Metalloproteases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
NRGs	Neuregulins	
PBS	Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	3-κινάση της φωσφατιδιλοινোসιτόλης
PI45K	phosphatidylinositol-4,5 -kinase	φωσφατιδιλοινোসιτολ-4,5-κινάση
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol triphosphate	Τριφωσφορική Φωσφατιδυλινοσιτόλη
PIPs	phosphoinositides	Φωσφοϊνοσιτίδια
PKC	Protein Kinase C	Πρωτεϊνική κινάση C
TGF	Tumor Growth Factor	Παράγοντας ανάπτυξης όγκων
TPR	tetratrico-peptide-repeat	Τετρατρικοπεπτίδια

# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **A. Συνοδά και Συν-Συνοδά Μόρια**

#### **A.1. Συνοδά Μόρια**

Οι συνοδές πρωτεΐνες (chaperons) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, εξελικτικά συντηρημένες που απαντώνται τόσο στα προκαρυωτικά βακτήρια όσο και σε όλους ανεξαιρέτως τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η παρουσία τους, τόσο στους μονοκύτταρους όσο και στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς είναι απολύτως αναγκαία για την κυτταρική επιβίωση. Αρκετά από τα μέλη της οικογένειας ονομάζονται και Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs), καθότι είχε παρατηρηθεί αρχικά πως τα επίπεδά τους αυξάνονται μετά από θερμικό σοκ. Οι συνοδές πρωτεΐνες εμπλέκονται άμεσα στην απόκριση του «κυτταρικού στρες». Ο όρος Συνοδές πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Laskey et al (1978 [1] ενώ καθιερώθηκε το 1987 από τον John Ellis (1987) για να περιγραφεί μια νέα, για τα μέχρι τότε δεδομένα, ενδοκυτταρική διαδικασία που αφορούσε την ικανότητα μίας ομάδας πρωτεϊνών να βοηθούν άλλες πρωτεΐνες στη σωστή αναδίπλωση τους καθώς και στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων [2]. Επιπλέον τα Συνοδά μόρια είχαν την ικανότητα να παρεμποδίζουν το σχηματισμό μη λειτουργικών πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία είτε πλέον δεν είναι αναγκαία από το κύτταρο είτε σχηματίζονται μετά από κυτταρικό στρες. Οι Συνοδές πρωτεΐνες έχουν ως πελάτες-στόχους μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεϊνικές κινάσες και υποδοχείς ορμονών. Η ονοματολογία των περισσότερων Συνοδών πρωτεϊνών –Πρωτεϊνών Θερμικού Σοκ (Heat Shock Proteins) προκύπτει από το μοριακό βάρος τους (σε kiloDaltons, kDa), φέροντας πρώτα το ακρωνύμιο HSP και έπειτα το μοριακό τους βάρος. Κυριότερα μέλη είναι οι HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 καθώς και οι sHSP (small HSPs) με μοριακό βάρος 15-27 kDa. Μέχρι τώρα, περισσότερο μελετημένες είναι οι HSP70 και HSP90.

#### **A.2. Συν-Συνοδά Μόρια**

Τα συν-συνοδά μόρια (co-chaperones) θα μπορούσαν να οριστούν, με την ευρεία έννοια του όρου (*sensu lato*), ως οι πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη δράση των Συνοδών πρωτεϊνών. Οι ίδιες μπορούν να έχουν δράση συνοδής πρωτεΐνης καθώς παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωση (aggregation) πολυπεπτιδικών αλυσίδων καθώς συνδέονται ταυτόχρονα με την HSP70 ή την

HSP90 και την πρωτεΐνη πελάτη. Κάποια συν-συνοδά μόρια δεν αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες στόχους, αλλά είτε καταλύουν την πρόσληψη νουκλεοτιδίων είτε την υδρόλυση τους στις συνοδές πρωτεΐνες. Μέλη τους επίσης συνδέουν την HSP90 με την HSP70, όπως το Hop. Ουσιαστικά με την δράση τους, ανάλογα με την κυτταρική λειτουργία και το κατάλληλο σήμα, εξειδικεύουν την ενεργότητα των Συνοδών πρωτεϊνών έναντι των πελατών- στόχων τους. Έτσι, ανάλογα με την πρωτεΐνη πελάτη-στόχο, στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που προκύπτει ενώ η Συνοδή πρωτεΐνη είναι είτε η HSP90 είτε η HSP70, τα είδη των Συν-συνοδών μορίων που συμμετέχουν μεταβάλλονται. Οι συν-συνοδές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες διακριτές ομάδες ανάλογα με την δομή τους. Αυτές που φέρουν τη δομή “J” ( J domain) και αυτές που φέρουν τη δομή TPR (Tetratricopeptide Repeats). Στον **πίνακα 1** παρουσιάζονται τα κυριότερα μέλη των συν-συνοδών πρωτεϊνών, η συνοδή πρωτεΐνη με την οποία συνδέονται και η κύρια δράση τους [3].

Συν-συνοδό μόριο	Hsp70	Hsp90	Κύρια Δράση/Σχόλια
Hsp40	•		Καταλύει την υδρόλυση ATP από την Hsp70-Πολύ μεγάλη οικογένεια
GrpE	•		Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων στα προκαρυωτικά και στα μιτοχόνδρια
Bag1	•		Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων, Οικογένεια πρωτεϊνών
Fes1/Sls1	•		Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων
Hip	•		Περιέχει TPR, σταθεροποιεί το Hsp70-ADP
Hop	•	•	Περιέχει TPR, συνδέει τις Hsp70 και Hsp90
Chip	•	•	Περιέχει TPR, Ubox, λιγάση ουμπικιτίνης
Tom70	•	•	Περιέχει TPR, είσοδος προ-πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια
FKBP52/51, Cyp40		•	Περιέχει TPR, peptidyl prolyl isomerases—πολλαπλά μέλη
PP5		•	Περιέχει TPR, φωσφατάση
unc45		•	Περιέχει TPR, συγκρότηση της μυοσίνης
Cns1		•	Περιέχει TPR, άγνωστη δράση
Cdc37		•	Πρωτίστως εμπλέκεται στην αναδίπλωση πρωτεϊνικών κινασών
p23		•	Εμπλέκεται στην ωρίμανση των πελατών της Hsp90
Aha1/Hch1		•	Διεγείρει την ATPάση της Hsp90

**Πίνακας 1: Οι Συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και Hsp90 με τα κυριότερα συν-συνοδά τους**

### A.3. Η Συνοδή Πρωτεΐνη HSP90

#### A.3.1. Γενικά Χαρακτηριστικά της HSP90

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, είναι προϊόντα διαφορετικών οικογενειών γονιδίων, τα οποία είναι απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση υπό συνθήκες στρες και τα οποία ονομάζονται σύμφωνα με τη σχετική μοριακή τους μάζα ( $M_r$ ).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 90 kDa (Heat Shock Proteins 90: HSP90s), είναι μια οικογένεια ‘συνοδών’ μορίων με ευρεία κατανομή, η οποία απαντάται τόσο στα βακτήρια όσο και σ’ όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ενώ στα βακτήρια, η παρουσία της αντίστοιχης HspG

πρωτεΐνης δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, τα ευκαρυωτικά κύτταρα χρειάζονται λειτουργική HSP90 στο κυτταρόπλασμα τους προκειμένου να επιβιώσουν.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, υπάρχουν πολλά ομόλογα της HSP90, συμπεριλαμβανομένων των ισομορφών της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Grp94/grp96) και στα μιτοχόνδρια (Trap1/HSP75) [4]. Επιπλέον, στο κυτταρόπλασμα των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης με 85% ομολογία (HSP90α και HSP90β) οι οποίες δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις ιδιότητες τους [5]. Η HSP90, αν και πρωτεΐνη θερμικού σοκ εκφράζεται σε αφθονία στα ευκαρυωτικά κύτταρα (1-2 % κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών) υπό φυσιολογικές συνθήκες (απουσία στρες), όπου εκτελεί βασικές λειτουργίες (housekeeping), ελέγχοντας την ενεργότητα, ανακύκλωση, αναδίπλωση και στερεοταξική ρύθμιση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών-υποστρωμάτων ('πελατών'), συμπεριλαμβανομένων πολλών κινασών, υποδοχέων στεροειδών και μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, πέρα από τη συνεισφορά της στις βασικές κυτταρικές διαδικασίες, η δράση της HSP90 έχει συσχετιστεί με διαδικασίες μορφολογικής εξέλιξης [6],[7].

Η ενεργοποίηση των υποστρωμάτων της HSP90 πιστεύεται ότι πραγματοποιείται μέσω μορφολογικών κύκλων του μορίου και εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (Heat Shock Protein 70: HSP70) και πολλών άλλων βοηθητικών πρωτεϊνών, οι οποίες μαζί με την HSP90 απαρτίζουν ένα πολυδυναμικό μηχανισμό συνοδείας (Chaperone machinery) [8,9].

Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες τις οποίες ρυθμίζει η HSP90 συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως η οικογένεια των Src κινασών της τυροσίνης, η Raf και άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, ο HER-2 (ErbB2), η κινάση του κυτταρικού κύκλου cdk4 και υποδοχείς στεροειδών ορμονών [7]. Η ρύθμιση όλων αυτών των πρωτεϊνών από την HSP90 είναι εξαιρετικής σημασίας για τη μεταγωγή σήματος, γι' αυτό και η HSP90 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η κυτταρική μετανάστευση [10].

Η κυτταροπλασματική HSP90 λειτουργεί *in vivo* ως κεντρικό συστατικό ενός δυναμικού πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει μια πληθώρα πρωτεϊνών απ' τις οποίες έχουν μέχρι σήμερα αναγνωριστεί περισσότερες από δώδεκα [11]. Ανάμεσα σ' αυτές περιλαμβάνονται οι HSP70, p23, Hop, Chip και Cdc37. Οι πρωτεΐνες αυτές (οι οποίες χαρακτηρίζονται ως συν-συννοδά μόρια) ρυθμίζουν με διάφορους τρόπους την ενεργότητα της HSP90 και σχηματίζουν μέρος της 'HSP90-μηχανής συγκρότησης' (Πίνακας 2).

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΡΟΛΟΣ
<b>HSP70</b>	Αλληλεπιδρά με την HSP90 και είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση των ετεροσυμπλόκων HSP90-πρωτεϊνών [12].
<b>p23</b> <b>Sba1 (ζύμες)</b>	Προσδέεται στην εξαρτώμενη από τριφωσφορική αδενοσίνη ( <i>Adenosine 5'-triphosphate: ATP</i> ) δομή της HSP90, σταθεροποιώντας τα ετεροσύμπλοκα HSP90-πρωτεϊνών [13].
<b>Hop</b> <b>Sti1 (ζύμες)</b>	Προσδέεται μέσω των περιοχών τετρατρικοπεπτιδίων ( <i>tetratrico-peptide-repeat: TPR</i> ) για το σχηματισμού του HSP70-Hop-HSP90 μηχανισμού για συγκρότηση ετεροσυμπλόκων. Αυξάνει το ρυθμό συγκρότησης αλλά δεν είναι απαραίτητο [14].
<b>CHIP</b>	Προσδέεται μέσω της TPR περιοχής στην HSP70 ή στην HSP90: η αλληλεπίδραση με την HSP70 προκαλεί πρωτεόλυση του υποστρώματος ενώ αλληλεπίδραση με την HSP90 απελευθέρωση του p23 [15].
<b>Cdc37</b>	Απαντάται σε πολλά σύμπλοκα HSP90-κινασών όπου προσδέεται άμεσα τόσο στην καταλυτική περιοχή της κινάσης όσο και στην HSP90 σε περιοχή διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης TPR [16].

## Πίνακας 2: Κύρια συν-συνοδά μόρια της HSP90 και λειτουργικότητά τους

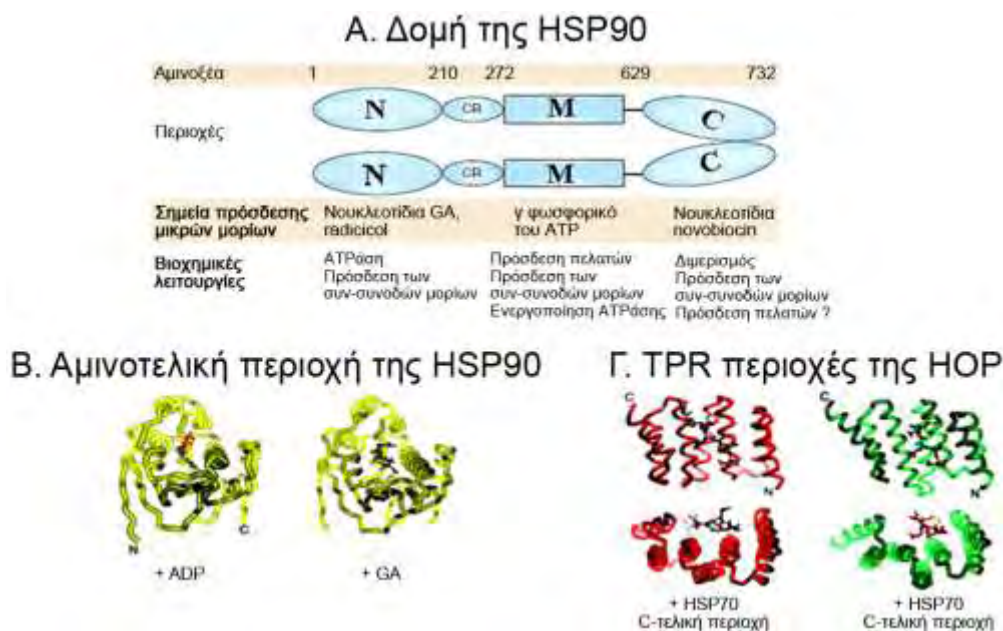
Η κυτταροπλασματική HSP90 και τα ομόλογα της Grp94 και TRAP στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια, αντίστοιχα, σε συνεργασία με διάφορα συν-συνοδά, βοηθητικά μόρια απαρτίζουν την κυτταρική ‘μηχανή συγκρότησης’. Η HSP90 ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών-υποστρωμάτων, στις οποίες περιλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες, τελεστές του κυτταρικού κύκλου και κινάσες που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, με αποτέλεσμα να εμπλέκεται σε πολλές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες.

### A.3.2. Η Δομή της HSP90

Η πρωτεΐνη HSP90 απαντάται πάντα ως ομοδιμερές [17] και αποτελείται από τρεις κύριες δομικές περιοχές (**Εικόνα 1A**). Η 25 kDa αμινοτελική περιοχή (N) περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης ATP/ADP (Adenosine Diphosphate, ADP) και είναι υπεύθυνη για την ασθενή ενδογενή ενεργότητα ATPάσης του μορίου (**Εικόνα 1A και 1B**). Επιπλέον, αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του αντιβιοτικού Geldanamycin (GA) [18], το οποίο ανήκει σε μια τάξη φαρμάκων τα οποία μιμούνται το ATP, αναστέλλοντας έτσι την ενεργότητα της HSP90 [19]. Σύμφωνα μ’ αυτό το μοντέλο αναστολής, η GA αντικαθιστά ανταγωνιστικά το ATP και ‘κλειδώνει’ την HSP90 σε μια ανενεργή στερεοδιάταξη. Η πρόσδεση της GA στην HSP90 έχει ως αποτέλεσμα

το διαχωρισμό της HSP90 από τις πρωτεΐνες-στόχους της, με τις τελευταίες να πρωτεολύονται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε GA *in vivo*.

Η πρόσδεση και υδρόλυση του ATP συνοδεύονται από στερεοταξικές αλλαγές και ενεργοποίηση των ‘πρωτεϊνών-πελατών’ [20]. Η μεσαία περιοχή (M) η οποία πιστεύεται ότι αποτελεί την κύρια θέση πρόσδεσης των ‘πρωτεϊνών-πελατών’, συνδέεται με την αμινοτελική περιοχή με μια πολύ φορτισμένη περιοχή-σύνδεσμο (*linker*). Επιπλέον, η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργότητα ATPάσης αφού πιστεύεται ότι κάποια κατάλοιπα της αλληλεπιδρούν με το γ φωσφορικό του ATP κατά την υδρόλυση του ATP. Η 50 kDa καρβοξυτελική περιοχή (C) περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού και ένα ακραίο πολύ συντηρημένο πενταπεπτίδιο MEEVD, το οποίο είναι απαραίτητο για την πρόσδεση συν-συνοδών μορίων με επαναλήψεις τετρατρικοπεπτιδίων (*Tetratricopeptide repeats: TPR*) [11,21]. Οι TPR είναι ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες αποτελούνται τυπικά από μοτίβα τριών επαναλήψεων 34 αμινοξέων. Αυτές οι περιοχές, αναγνωρίζουν και προσδέονται στο MEVD μοτίβο της HSP90 και της HSP70 (Εικόνα 1Γ). Εκτός από τη θέση πρόσδεσης νουκλεοτιδίου και υποστρώματος στην αμινοτελική και μεσαία περιοχή αντίστοιχα, έχει προταθεί η πιθανή ύπαρξη μιας δεύτερης θέσης πρόσδεσης ATP/ADP στην καρβοξυτελική περιοχή του μορίου η οποία ανοίγει όταν η αντίστοιχη θέση στην αμινοτελική περιοχή είναι κατειλημμένη.



**Εικόνα 1: Δομή της HSP90, αλληλεπίδραση με νουκλεοτίδια αδενίνης, GA και TPR περιοχές συν-συνοδών μορίων [21].** Α, Σχηματική παράσταση της δομής του μορίου της HSP90 της ζύμης, όπως αποκαλύπτεται από μερική πρωτεόλυση και μελέτες δομής. Το τμήμα μεταξύ των περιοχών N

και Μ του μορίου ποικίλει σε μέγεθος και σύνθεση ανάμεσα στα είδη και στις διάφορες ισομορφές του μορίου. Β, κρυσταλλικές δομές της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής σε σύμπλοκο με ADP και GA [18]. Γ, Κρυσταλλικές δομές του μοτίβου TPR της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής της HOP σε σύμπλοκο με την COOH-τελική περιοχή της HSP70 (αριστερά) και της κεντρικής TPR περιοχής της HOP σε σύμπλοκο με την COOH-τελική περιοχή της HSP90 (δεξιά). Οι δομές στο κάτω πάνελ είναι με περιστροφή κατά 90<sup>0</sup> σε σχέση με το πάνω πάνελ.

### A.3.3. Μηχανισμοί Δράσης της HSP90

Ένας μεγάλος αριθμός των πρωτεϊνών που ρυθμίζει η HSP90 εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Πίνακας 3). Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι ο ρόλος της HSP90 πιθανόν να συνίσταται στην αλληλεπίδραση με τις ρυθμιστικές περιοχές αυτών των μορίων με συνέπεια είτε:

α) η αλληλεπίδραση αυτή να διατηρεί τα υποστρώματά της ανενεργά απουσία ερεθίσματος (σ' αυτή την περίπτωση το κατάλληλο σήμα προκαλεί την απελευθέρωση του συμπλόκου της HSP90 και την ολοκλήρωση της αναδίπλωσης),

β) η αλληλεπίδραση αυτή να είναι απαραίτητη όχι πριν, αλλά μετά την ενεργοποίηση του υποστρώματος, ώστε να βοηθήσει στην τελική αναδίπλωση, το σχηματισμό συμπλόκου και/ή τη διατήρηση σε αυτή την ενεργή κατάσταση. Ανάλογα λοιπόν με το υπόστρωμα, η HSP90 μπορεί να σχετίζεται με την ανενεργή ή την ενεργή μορφή αυτού.

Παρά το γεγονός ότι η λίστα των υποστρωμάτων της HSP90 ολοένα και μεγαλώνει, η μηχανισμοί αναγνώρισης των υποστρωμάτων από το μόριο είναι ελάχιστα κατανοητοί. Η HSP90 μπορεί να αλληλεπιδρά με πρώιμα ή ενδιάμεσα στάδια αναδίπλωσης των υποστρωμάτων. Επίσης, οι διαφορετικές περιοχές του μορίου φαίνεται να έχουν διαφορετικές 'προτιμήσεις' στην πρόσδεση υποστρώματος. Η εκλεκτικότητα των περιοχών της HSP90 για τα υποστρώματα υποδηλώνει την ύπαρξη ειδικού μηχανισμού αναγνώρισης, αλλά αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ευρύ φάσμα των διαφορετικών υποστρωμάτων, τα οποία δεν σχετίζονται μεταξύ τους και διαφέρουν πολύ στη δομή και τη λειτουργία μεταξύ τους. Η κατανόηση λοιπόν των μηχανισμών αναγνώρισης των υποστρωμάτων της είναι μεγάλης σημασίας. Οι Xu *et al.* [22], πρόσφατα παρουσίασαν δεδομένα, τα οποία προτείνουν ότι η πρόσδεση της HSP90 στην κυτταροπλασματική περιοχή του HER-2 (ErbB2) καθορίζεται από το επιφανειακό φορτίο και την υδροφοβικότητα της περιοχής πρόσδεσης του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές ταυτοποίησαν μια αλληλουχία εντοπισμένη στην επιφάνεια της περιοχής της κινάσης του μορίου



η οποία εμπλέκεται στην αναγνώριση του HER-2 από την HSP90. Επιπλέον, δομικές μελέτες της HSP90 και των ομολόγων της προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό με τον οποίο η HSP90 αναγνωρίζει τα υποστρώματα της και αλληλεπιδρά μαζί τους.

## ΣΥΝΟΔΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΗ ΜΟΡΙΑ

Aha1 και το ομόλογο της Hch1

Cdc37 (p50) και Harc

p23 (=Sba1)

Πρωτεΐνες με μοτίβο TPR: Hop (=Sti1), FKBP52 (και ομόλογα υψηλού MB φυτών), FKBP51, FKBP8 (=FKBP38), FKBP36 (=FKBP6), Plasmodium FKBP35, cyclophilin-40 (Cpr6 και Cpr7), PP5 (και η Ppt1 της ζύμης), Tom70, πιθανόν Tom71=Tom72, XAP-2 (=AIP=ARA9), Cns1 και τα συγγενή της Δροσόφιλας και Ανθρώπου Dpit47 και TTC4, CHIP, GCUNC-45 (επίσης UNC-45 και She4), DnaJC7 (=Trp2=mDj11=CCRP), CRN, WISp39 (=FKBPL), Tah1 (=Spaghetti=RPAP3), NASP, Toc64, TPR1 (=Ttc1), SGT (=αSGT=SGTA), DYX1C1, AtTPR1, AtTPR2, AIPL1, Tom34

CS-containing p23 συγγενικά SGT1 (=SUGT1), RAR1, Siah-1-interacting protein (SIP), Chp1/Morgana, B-ind1, melusin, CHORDC1, NudC και NudCL2 (=Nudcd2)

HSP60

Hsc70/HSP70/HSP72

Ανθρώπινο ομόλογο της DnaJ, Hsj1b

S100A1

Sse1, Sse2

valosin-containing protein (VCP)/p97

Pih1 (=Nop17) (κυρίως μέσω της Tah1)

Cullin5

Tel2-Tti1-Tti2 complex

Toxoplasma Sis1-like

## ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Υποδοχέας 12(S)-HETE

IRF3

AF9/MLLT3

Mal63

p23 (=Sba1)

Oct4

Όλοι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών των σπονδυλόζωων (GR, MR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR, AR)

Μέλη της οικογένειας PAS: υποδοχέας της διοξίνης (=AhR), Sim, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$

BCL-6

p53

CAR

Sp1

Κυτοπλασματικός v-erbA

Stat3

EcR

Stat5

Nanog

TonEBP/OREBP

PPAR $\alpha$  (PPAR $\beta$ )

Ure2

PXR

VDR

Hap1

Στεροειδής υποδοχέας (antheridiol) του ωομύκητα *Achlya*

HSF-1

WT1

## ΚΙΝΑΣΕΣ

Akt/PKB

HER3

PI4KII $\beta$

ALK1, ALK5

I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$

Pim-1

AMPK $\alpha$ , AMPK $\gamma$

Υποδοχέας της ινσουλίνης

Pink1

ASK1

Insulin-like growth factor 1

PKC $\lambda$ , PKC $\epsilon$  και άλλες PKCs

	receptor	
Aurora B	Integrin-linked kinase	Plk1
Bcr-Abl	IP6K2	Pnck
BTK	IRAK-1	pp60v-src, c-src
c-Abl	Ire1 $\alpha$	PRKD2
Καταλυτική υπομονάδα IIα της κινάσης καζεΐνης	JAK1	Κινάσες τυροσίνης σχετιζόμενες με την src: fer, fes, fgr, fps, lck, yes
Cdc2 (=Cdk1)	JNK	PRKDC
Cdc25c	c-Kit	Raf-1, B-Raf, Ste11
Cdk2, Cdk4, Cdk6, Cdk9, Cdk11	KSR	RET
Chk1	LATS1, LATS2	RET/PTC1
Cot = Trp1-2	Lkb1	Ron
DDR1	LRRK2	Ryk
Death-associated kinases DAPK, DAPK2, DAPK3	MAPK6	SGK-1
Death domain kinase RIP	MEK	Slf2
eEF-2 κινάση	MEKK1 και MEKK3	SRPK1
eIF2 $\alpha$ κινάσες HRI, Gcn2, Perk, PKR	Mik1	SSCMK1
Eml4-Alk	MLK3	SSTK (= Tssk6)
EphA2	MOK, MAK, MRK	TAK1 και TBK1
ErbB2 (και μεταλλαγμένος EGF υποδοχέας)	c-Mos	TGF $\beta$ υποδοχείς I και II
ERK5	mTOR	TrkB
FGFR3 και FGFR4	NIK	TrkAI και III
FOP2-FGFR1	Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase	Tyk2
Flt3	p38	Ulk1
Fused	p90RSK	VEGFR1, VEGFR2
GRK2 και GRK6	Platelet-derived growth factor receptor $\alpha$	Wee1, Swe1
GSK3 $\beta$	PDK1	ZAP-70

### ΆΛΛΑ

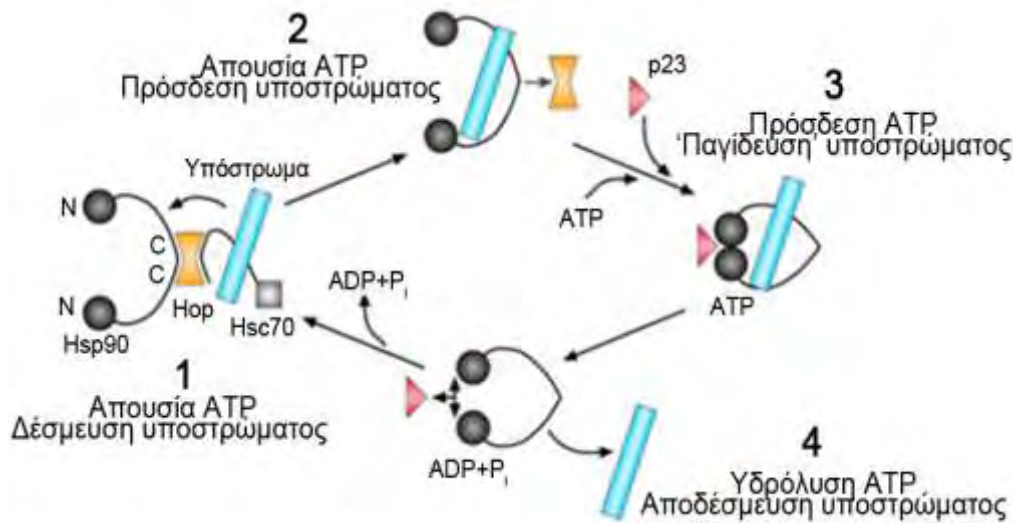
$\alpha_2\text{C}$ Αδρενεργικός υποδοχέας	Hepatitis B virus core protein	PRMT5
AID	Πρωτεΐνη NS3 του ιού Ηπατίτιδας C	Υποδοχέας της προλακτίνης
Annexin II	Πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού Ηπατίτιδας E	Prostacyclin synthase
ANP υποδοχέας	HERG	Πρωτεάσωμα
Araf-1	Ιστόνες H1, H2A, H2B, H3 και H4	R2TP complex through Pih1
apoB	Huntingtin	Rab- $\alpha$ GDI
Argonaute-1	c-IAP1	Rab11a
Argonaute-2 (= GERp95)	Importin $\beta$ 1	Rac/Rop GTPase Rac1 (rice)
Argonaute-4	Importin 4 (IPO4)	Rac1
ATG8 (GABARAP) πρωτεΐνες	Importin- $\alpha$ 6 (KPNA5)	Ral-binding protein 1 (RalBP1)
Axin 1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 3	Rapsyn
Bcl-2	INrf2 (=Keap1)	Raptor
Bcl-xL	Clostridium toxin iota	Reovirus protein $\sigma$

Beclin 1		REV1
Bid	IRS-2	Αντίστροφη μεταγραφή του ιού Ηπατίτιδας Β
Ελικάση BLM	Japanese encephalitis virus E protein	Ριβοσωμική πρωτεΐνη S3 και S6
Bms1	JlpA	Ριβοσωμική πρωτεΐνη L2 (E. coli)
BRCA2	KSHV K1	ricin catalytic A chain
BRMS1	Kir6.2	RIG-I
Calcineurin	Knob complexes	RNA-dep. RNA πολυμεράση (του ιού της μωσαϊκής του Μπαμπού)
Calmodulin	LAMP-2A	Rpb1
Calponin	LAP	R-protein I-2
CARM1	LIS1	SEN3
β-catenin	Macromolecular aminoacyl-tRNA synthetase complex	SIR2 (SIR2RP1 σε παράσιτα <i>Leishmania</i> )
CB2 καναβοειδής υποδοχέας	Macrophage scavenger receptor	Σύμπλοκα SKP2
CD91	Mdm2	SMYD1, SMYD2, SMYD3
Cdc13	MMP2, MMP9	snoRNP σύμπλοκα
Cdk5 activator p35	MRE11/Rad50/NBS1 (MRN) complex	SREC-I
Clostridium toxin CDT	MspS/XMAP215/ch-TOG	DNA ελικάση Ssl2 SUR1(subunit of β-cell ATP-sensitive potassium channel)
CFTR (nascent and mutant polypeptide)	MTG8	Survivin
Chronophin	MUC1	SV40 large T-antigen
CIC-2 κανάλι χλωρίου	NadA	α-synuclein
Cineole synthase 1	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> cotransporter 1	Tab2/3
COG σύμπλεγμα	NB-LRR πρωτεΐνες: RPM1, RPS2, Nod1, Nod2, NALP2, NALP3, NALP4, NALP12 και IPAF	Tau πρωτεΐνη
CTA1	NELF-E	Τελομεράση
Ctf13/Skpl1 τμήμα του CBF3	Neuropeptide Y	Thiopurine S-methyltransferase
Cup	N-myc downstream-regulated gene 1(NRDG1)	Υποδοχέας της θρομβίνης (PAR-1)
Κυκλίνη Β	Nox1, Nox2, Nox3, Nox5	Thromboxane synthase
Cyclophilin D (μιτοχονδριακή)	Nsl1	Tissue plasminogen activator (tPA)
Cyr1	NS1	Titin
Κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες: ακτίνη, τουμπουλίνη, μυοσίνη	NSP3	TLR4/MD-2 σύμπλεγμα
DEDD	Nup62	TOM40
Τοξίνη της Διφθερίτιδας	N-WASP	TRIM8
Πρωτεΐνη E του ιού του Δάγγειου πυρετού	OGT	Triosephosphate isomerase
DNA πολυμεράση α	OsCERK1	Trithorax (και το ορθόλογο MLL)
DNA πολυμεράση η	P1 (picornaviral capsid precursor protein P1)	Tyrosine hydroxylase
DNMT1	p300	UCH-L1
Dsn1	P450 CYP2E1	URI σύμπλεγμα
eNOS, nNOS (?)	P2X7 purinergic receptor	Uroporphyrinogen decarboxylase

Ether-a-gogo-related cardiac potassium channel (ERG)	PARK7 (DJ-1)	(HemE) [στα κυανοβακτήρια] Vaccinia core protein 4a
F1F0-ATP συνθετάση	PB1 and PB2 subunits of influenza RNA pol.	misfolded VHL
FLIPS και FLIPL	PCNA	Βιμεντίνη
Gα0 και Gα12	Perilipin	WASF3
Ελεύθερη βγ υπομονάδα της πρωτεΐνης G	PIDD	XPO1
Glutathione S-transferase subunit 3 (KS type)	Piwi	XPORT
Guanylate cyclase, soluble	Mg <sup>2+</sup> -dependent phosphatidate phosphohydrolase	ZEITLUPE
HDAC6	Polysomal ribonuclease 1 (PMR1)	

**Πίνακας 3: Υποστρώματα της HSP90 (πηγή <http://www.picard.ch/downloads>)**

Η αλληλεπίδραση της HSP90 με τις πρωτεΐνες-πελάτες της εξαρτάται από την ενεργότητα ATPάσης της αμινοτελικής περιοχής, η οποία δίνει και υδρολύει ATP ώστε να ξεκινήσει μια σειρά από κύκλους σύνδεσης-αποσύνδεσης της HSP90 με τα υποστρώματα της. Η πρόσδεση και υδρόλυση του ATP συνοδεύεται από μορφολογικές αλλαγές στις δομικές περιοχές της HSP90 οι οποίες είναι σημαντικές για τη δράση του μορίου. Συγκεκριμένα, όταν η HSP90 συνδέεται με ATP, οι αμινοτελικές περιοχές του μορίου διμερίζονται σχηματίζοντας εσωτερικό ‘σφικτήρα’ στον οποίο θα δεσμευτεί το υπόστρωμα. Υδρόλυση του ATP απελευθερώνει το υπόστρωμα μέσω στερεοταξικών αλλαγών της HSP90 [23,24]. Η πρόσδεση των υποστρωμάτων στην HSP90 απαιτεί την παρουσία της HSP70 και της συν-συνοδού πρωτεΐνης HOP (*HSP90-HSP70 organizing protein*: HOP). Η πρωτεΐνη HSP70 πιθανόν να συμμετέχει στην προώθηση της αναδίπλωσης των υποστρωμάτων της HSP90, παραδίδοντας τα στην HSP90 (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2: Κύκλος ΑΤΡάσης και πρόσδεση υποστρώματος** [25]. 1, Το πολυπεπίδιο-υπόστρωμα, πιθανόν να μεταφέρεται από την HSP70 στην HSP90 η οποία είναι στην ανοικτή-ελεύθερη από ATP κατάσταση, λόγω πρόσδεσης της HOP. 2, το υπόστρωμα μπορεί να προσδεθεί στην ανοικτή-ελεύθερη από ATP HSP90. 3, η πρόσδεση ATP προκαλεί διμερισμό στις αμινοτελικές περιοχές της HSP90 (κύκλοι) και επιτρέπει την πρόσδεση του p23, οπότε το υπόστρωμα παγιδεύεται. 4, η υδρόλυση του ATP απελευθερώνει το υπόστρωμα ανοίγοντας τη σχισμή που σχηματίστηκε από τις αμινοτελικές περιοχές ή προκαλώντας άλλες στερεοταξικές αλλαγές στο μόριο.

#### A.3.4. HSP90 και Καρκίνος

Οι 'πρωτεΐνες-πελάτες' της HSP90 συχνά μεταλλάσσονται, υπερεκφράζονται ή παραμένουν συνεχώς ενεργοποιημένες στα καρκινικά κύτταρα. Ανάμεσα σ' αυτές ξεχωρίζουν οι ErbB-2, c-Raf-1, Akt/PKB, CDK4, Met, και p53, οι οποίες είναι άμεσα εμπλεκόμενες σε κακοήθειες [26] (Πίνακας 4). Επιπλέον, η ίδια η HSP90 έχει αναφερθεί να υπερεκφράζεται σε προχωρημένους όγκους και η ενεργότητά της φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένη με κακοήθη εξέλιξη [21]. Στον καρκίνο του μαστού ο οποίος έχει μελετηθεί πιο πολύ, η υπερέκφραση της HSP90 συνδέεται με κακή πρόγνωση. Γενικά, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση του μορίου συνεισφέρει στην αντίσταση στα φάρμακα και στη μικρή ανταπόκριση στο συνδυασμό χημειοθεραπείας και φαρμακευτικής αγωγής. Σε επίπεδο φυσιολογίας, η αφθονία του μορίου σε προχωρημένους καρκίνους αντικατοπτρίζει μια ανάλογη κυτταροπροστατευτική απόκριση στο στρες το οποίο προκαλείται από το υποξικό, όξινο μικρο-περιβάλλον που χαρακτηρίζει τους όγκους [21], [27]. Σε μοριακό επίπεδο, η αυξημένη ενεργότητα του μορίου μπορεί να επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αντεπεξέρχονται και να αποφεύγουν την απόπτωση, διευκολύνοντας

την επιβίωση και την επέκτασή τους, και καθιστώντας τα ανεξάρτητα από φυσιολογικούς ρυθμιστικούς παράγοντες και ανθεκτικά στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [21,27]. Επιπλέον, οι Eustace *et al.* έδειξαν ότι η HSP90α εκκρίνεται *in vitro* στο εξωκυτταρικό στρώμα το οποίο περικλείει τα καρκινικά κύτταρα, όπου φαίνεται να βοηθά στην ενεργοποίηση της μεταλλοπρωτεϊνάσης στρώματος MMP-2 και να συμμετέχει στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων [28].

Παρότι η HSP90 αποτελεί ένα ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου, τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης έχουν μόλις αρχίσει να διερευνώνται κλινικά. Ένα βασικό αντεπιχείρημα στην αναστολή της HSP90 στη θεραπεία του καρκίνου είναι ότι τα φάρμακα τα οποία επιδρούν σε ένα τόσο σημαντικό συνοδό μόριο θα έχουν ανασταλτικές παρενέργειες και στις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. Την τελευταία δεκαετία έχει ταυτοποιηθεί μεγάλος αριθμός μικρο-μοριακών φαρμάκων (αντικαρκινικών παραγόντων), τα οποία στοχεύουν στην αναστολή της δράσης της HSP90. Η αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης ATP αποτελεί τη θέση πρόσδεσης φυσικών προϊόντων όπως η Geldanamycin (GA) και η radicicol αλλά και ημισυνθετικών παραγώγων. Αυτά τα μόρια προσδένονται με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ότι τα νουκλεοτίδια αδερίνης και αναστέλλουν τους στερεοδομικούς κύκλους της HSP90 ανάμεσα στην ATP- και ADP- δομή της και συνεκδοχικά επηρεάζουν πολλές από τις λειτουργίες της. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση των μορίων αυτών φαίνεται να προκαλεί ενεργοποίηση του πρωτεοσώματος και αποικοδόμηση των υποστρωμάτων τους [29]. Μελέτες από κλινικές δοκιμές φάσης I και II έχουν δείξει ότι ο αναστολέας της HSP90 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), είναι τοξικός σε ανεκτά επίπεδα και ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ειδική ευαισθησία σ' αυτό το φάρμακο [26]. Πιθανόν, η επιλεκτικότητα των φαρμάκων κατά της HSP90 στα καρκινικά κύτταρα να οφείλεται σε πρωτεόλυση των υποστρωμάτων της τα οποία υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, όπως μεταλλαγμένες πρωτεΐνες και ογκογονίδια και σχετίζονται με διαδικασίες αυτόνομης ανάπτυξης και κυτταροπροστασίας. Η καρβοξυτελική περιοχή της HSP90 εμπλέκεται, ως περιοχή μιας δεύτερης κρυμμένης θέσης πρόσδεσης ATP στην HSP90. Η συνεισφορά αυτής της περιοχής στη λειτουργικότητα του μορίου δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί, αλλά το αντιβιοτικό *novobiocin* έχει αναφερθεί ότι προσδένεται σ' αυτό το σημείο και αλλάζει τη δομή του μορίου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις το αντιβιοτικό αποσταθεροποιεί τα υποστρώματα της HSP90 [30]. Επιπλέον, ο

χημειοθεραπευτικός παράγοντας *cisplatin*, προσδένεται στην ίδια περιοχή και αναστέλλει κάποιες από τις λειτουργίες της [31].

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός	Υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης Κινάσες σερίνης/θρεονίνης Υποδοχείς στεροειδών ορμονών
Αθανασία	Τελομεράση
Ελαττωμένη απόπτωση	AKT
Αγγειογένεση	HIF1α
Διήθηση/μετάσταση	MMP-2

**Πίνακας 4: Υποστρώματα της HSP90 που εμπλέκονται σε καρκινικούς φαινοτύπους**

#### **A.4. Η Συν-Συνοδή Πρωτεΐνη Cdc37**

##### **A.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά της Cdc37**

Η Cdc37 ή p50<sup>Cdc37</sup> όπως αναφέρεται αλλιώς, είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 50 kDa αποτελούμενη από 385 αμινοξικά κατάλοιπα. Αρχικά το γονίδιο ανακαλύφθηκε στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, ως μια μετάλλαξη που κρατούσε τα κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (εξού και η ονομασία Cell Division Cycle) [32]. Αργότερα απομονώθηκε ένα αλληλίο (allele) στη Δροσόφιλα (*Drosophilla melanogaster*) το οποίο λειτουργούσε ως κυρίαρχος ενισχυτής (dominant enhancer) στο φαινότυπο *sevenless*. Στα σπονδυλόζωα, το Cdc37 κλωνοποιήθηκε πρώτα στο κοτόπουλο [33] (.για να ακολουθήσουν αργότερα τα θηλαστικά [34].

Πλέον είναι ευρέως αποδεκτός ο χαρακτηρισμός της ως συν-συνοδό μόριο (co-chaperone), καθότι συμμετέχει στα πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα της HSP90, με την οποία αλληλεπιδρά απευθείας, και στην οποία, αφού αναγνωρίσει τις κατάλληλες της πρωτεΐνες-πελάτες, τις κατευθύνει στην HSP90, μέσω των αλληλεπιδράσεων της. Η Cdc37 αποτελεί το κυρίαρχο και πιο σημαντικό συν-συνοδό μόριο στο πρωτεϊνικό μηχανισμό συνοδείας (Chaperone machinery). Οι πρωτεΐνες-πελάτες εξαρτώνται τόσο από την HSP90 όσο και την Cdc37 για τη σωστή αναδίπλωση (folding), ωρίμανση ή σταθερότητά τους. Η Cdc37 αλληλεπιδρά με ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, οι περισσότερες από τις οποίες είναι κινάσες, επιδεικνύοντας μια εξειδίκευση σε αυτές (Πίνακας 5). Ο ρόλος της στη μεταγωγή σήματος (signal transduction),

διαφάνηκε για πρώτη φορά από τους Grammatikakis *et al* , [35] όπου έδειξαν πως η Cdc37 αλληλοεπιδρά με το σηματοδοτικό μόριο Raf και την HSP90. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι αναγκαίος για την κινητοποίηση του Raf στη μεμβρανική επιφάνεια και την ενεργοποίηση του από το Ras. Η κινάση Cdk4 εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της με το διμερές Cdc37-HSP90 για την σταθεροποίηση της και την προώθηση του κυτταρικού κύκλου πέραν από τη φάση G1.

Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η Cdc37 της ζύμης παρουσιάζει ομολογία με την Cdc37 της Δροσόφιλας και των θηλαστικών στα πρώτα 30 αμινοξέα μόνο, ενώ έπειτα αποκλίνει σημαντικά, υποδεικνύοντας διαφορετικούς ρόλους στους εξελικτικά ανώτερα οργανισμούς. Στη συντηρημένη αυτή περιοχή βρίσκεται η θέση φωσφορυλίωσης της Cdc37. Η φωσφορυλίωση της Cdc37 των σπονδυλόζωων γίνεται σε μια και μόνο θέση, στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης 13 καθώς και στις ζύμες στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης 14, από την κινάση καζεΐνης 2 (CK2). Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία της Cdc37. Μέχρι αυτή τη στιγμή, τα δεδομένα δείχνουν πως η Cdc37 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των σπονδυλόζωων. Η Cdc37 συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες (τις περισσότερες φορές σε συνεργασία με την HSP90) όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση δεοξυριβονοκλεικών οξέων, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μεταγωγή σήματος (signal transduction) και η μεταγραφή [36].

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ
AKT (Protein Kinase B)	Ανοσοκατακρήμιση της AKT με την Hsp90 και το Cdc37 Η Cdc37 προσδέεται απευθείας στην AKT, δεν επηρεάζεται από αναστολείς της HSP90
Aurora B	Ανοσοκατακρήμιση Απενεργοποίηση της Cdc37 ή της HSP90 μειώνει τα επίπεδα της Aurora B
B-Raf	Ανοσοκατακρήμιση
Cdc2	Ανοσοκατακρήμιση
Cdc25c	Ανοσοκατακρήμιση
Cdk2	Δοκιμασίες κατακρήμισης
Cdk4	Ανοσοκατακρήμιση Δοκιμασία Ανοσοκατακρήμισης με γλουταθειόνη Yeast 2-hybrid με ανθρώπινη Cdc37 CDC37 διαγονιδιακά ποντίκια αναπτύσσουν όγκους μαστού
Cdk6	Ανοσοκατακρήμιση Δοκιμασία κατακρήμισης με γλουταθειόνη
Cdk9	Ανοσοκατακρήμιση
Cdk11	Ανοσοκατακρήμιση
CKII (casein kinase II)	<i>In vitro</i> chaperone δοκιμασία

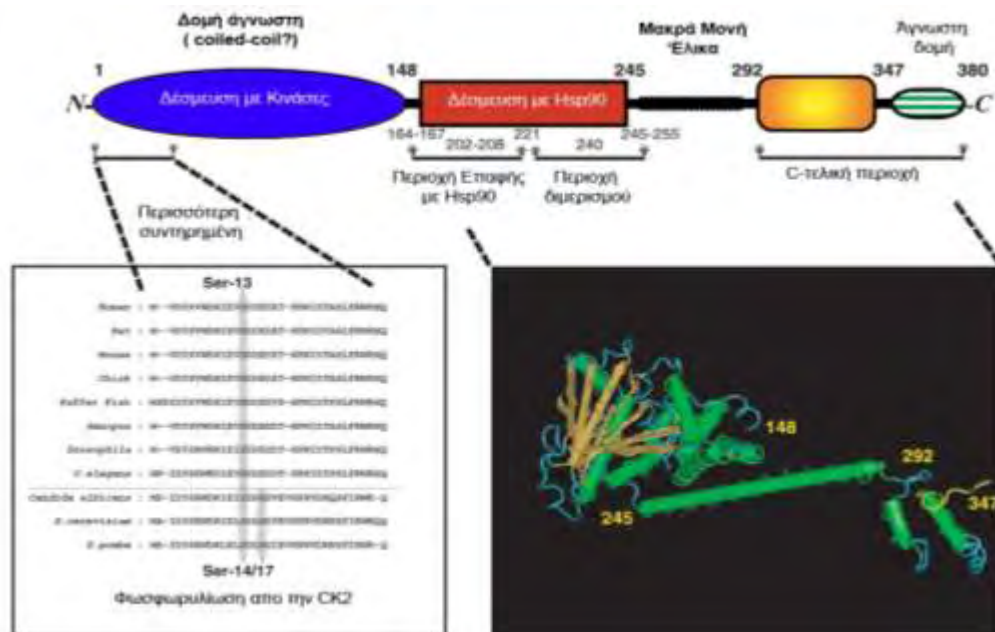


	Απαιτείται η παρουσία της Cdc37 για τη λειτουργία της CKII και η C II φωσφορυλιώνει την Cdc37
DAPK	Ανοσοκατακρήμιση
EGF vIII μεταλλαγμένος υποδοχέας	Ανοσοκατακρήμιση
Fused (Fu kinase)	Ανοσοκατακρήμιση
Harc	Σχηματισμός ετεροδιμερών
Hck (οικογένεια κινασών Src)	Ανοσοκατακρήμιση Υπερέκφραση του ανθρώπινου Cdc37 καταστέλλει τον φαινότυπο tsHck499F Η περιοχή κινάσης του Hck είναι απαραίτητη για δέσμευση
HRI (heme-regulated eIF2 alpha kinase)	Η ανθρώπινη Cdc37 συνδέεται με την πρώιμη HRI συν-μεταφραστικά και παραμένει σε αυτήν κατά την ωρίμανση και ενεργοποίηση της HRI Ανοσοκατακρήμιση
IKK (IκB κινάση)	Ανοσοκατακρήμιση Δοκιμασία κατακρήμισης Απευθείας σύνδεση με την περιοχή κινάσης
IRAK-1	Ανοσοκατακρήμιση
JAK1	Ανοσοκατακρήμιση
Ksr	Μέλος μεγάλου συμπλόκου συνοδών πρωτεϊνών
Lck (Οικογένεια κινασών Src)	Ανοσοκατακρήμιση με ανθρώπινη Cdc37
Lkb1	Ανοσοκατακρήμιση
LRRK2	Ανοσοκατακρήμιση
MEKK1/MEKK3	Tandem Affinity Purification (TAP)
MLK3	Ανοσοκατακρήμιση
NIK	Tandem Affinity Purification (TAP)
p38	Αλληλεπίδραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών
PDGF α υποδοχέας	Ανοσοκατακρήμιση
Pink1	Ανοσοκατακρήμιση
PKC (όλοι οι τύποι)	Ανοσοκατακρήμιση
Raf	Ανοσοκατακρήμιση Απευθείας αλληλεπίδραση με την περιοχή κινάσης του Raf
RET/PTC1	Ανοσοκατακρήμιση
v-Src	Ανοσοκατακρήμιση με ανθρώπινη Cdc37
TAK 1	Ανοσοκατακρήμιση
Tau	Ανοσοκατακρήμιση
TBK1	Tandem Affinity Purification (TAP)
ULK1	Ανοσοκατακρήμιση
ULK2	Ανοσοκατακρήμιση

**Πίνακας 5: Κινάσες θηλαστικών με τις οποίες αλληλεπιδρά η Cdc37.** Απουσιάζουν δεδομένα από γενετικά πειράματα που υποδεικνύουν αλληλεπίδραση. Πηγή: <http://www.picard.ch/>

#### A.4.2. Δομή και Λειτουργία της Cdc37

Δομικές μελέτες έχουν δείξει πως η Cdc37 αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Την κεντρική περιοχή του μορίου, που εκτείνεται από τα αμινοξέα 147 έως 276, η οποία είναι μια δομικά σταθερή περιοχή και παρουσιάζει υψηλή αντίσταση στη πρωτεόλυση. Την αμινοτελική περιοχή, από τα αμινοξέα 1 έως 145 και την καρβοξυλική περιοχή εκτεινόμενη από τα αμινοξέα 277 έως 378, οι οποίες και εμφανίζουν μικρότερη αντίσταση στη πρωτεόλυση, υποδεικνύοντας πως οι δύο αυτές περιοχές έχουν λιγότερο συμπαγή δομή σε σχέση με την κεντρική περιοχή [37]. Η κεντρική περιοχή είναι αυτή που αλληλεπιδρά με την HSP90, ενώ η αμινοτελική με τις κινάσες στόχους της Cdc37. Τα αμινοξέα 148 έως 245 δημιουργούν μια εντελώς ελικοειδή περιοχή, αποτελούμενη από μια δέσμη 6 ελίκων. Αυτή ενώνεται με μια άλλη μικρή δέσμη 3 ελίκων (292 έως 347) μέσω μιας μακράς μονής έλικας (περιοχή 246 έως 286). Η περιοχή 309 έως 315 δεν έχει δώσει καμιά ερμηνεύσιμη ηλεκτρονιόπυκνη εικόνα, η οποία ενώνει την πρώτη και τη δεύτερη έλικα αυτής της περιοχής. Η μεγάλη ελικοειδής περιοχή έχει μια ασυνήθιστη τοπολογία, με τις έλικες 2 έως 5 να σχηματίζουν μια δεξιόχειρα ορθογωνική δέσμη ενώ η έλικα 6 με το προσκείμενο τμήμα της μακράς μονής έλικας σχηματίζει μια α-αμίδα η οποία περικλείει την επιφάνεια της έλικας 5 (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3: Δομή της Cdc37 με αναπαράσταση των περιοχών δέσμευσης με τις κινάσες, την HSP90, την περιοχή φωσφορυλίωσης της και γνωστά δομικά στοιχεία από κρυσταλλογραφικά δεδομένα.**

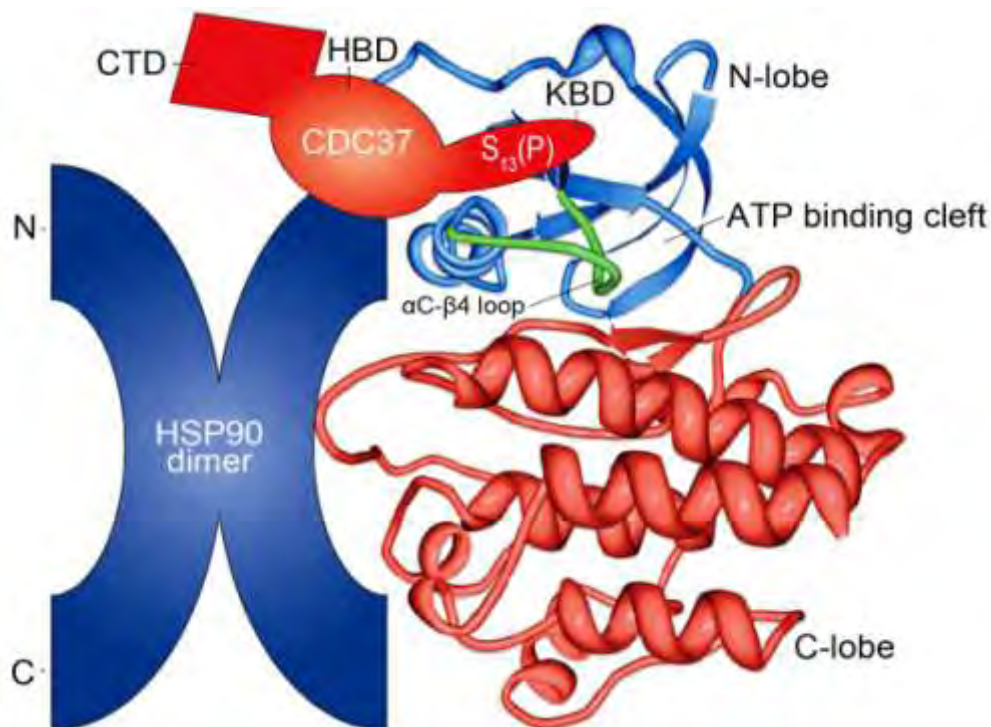
### A.4.3. Αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90

Η περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων στο αμινοτελικό άκρο της HSP90 δεσμεύεται στη μεγάλη ελικοειδή περιοχή της Hsp90 που περιγράφηκε πιο πάνω, με τις έλικες 2, 3 και 5 να πακετάρουν έναντι (against) της επιφάνειας του αμινοτελικού άκρου της HSP90 (αμινοξικά κατάλοιπα 100 έως 121), το οποίο θεωρείται πως κλείνει με την πρόσδεση του ATP. Ο πυρήνας της αλληλεπίδρασης περιλαμβάνει μια σχετικά επίπεδη υδροφοβική επιφάνεια (patch) που σχηματίζεται από τις πλευρικές αλυσίδες μεθειονίνης (Met)164, λευκίνης (Leu) 165, αλανίνης (Ala) 204 και λευκίνης (Leu) 205 του Cdc37, οι οποίες πακετάρουν απέναντι από μια παρόμοια επιφάνεια που δημιουργείται από τις πλευρικές αλυσίδες αλανίνης (Ala) 103, αλανίνης (Ala) 107, αλανίνης (Ala) 110, γλυκίνης (Gly) 11, αλανίνης (Ala) 112, μεθειονίνης (Met) 116 και φαινυλαλανίνης (Phe) 120 της HSP90. Η κεντρική υδρόφοβη διασύνδεση ενισχύεται από ένα δίκτυο πολικών αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων και αρκετών διαμοριακών υδρογονικών δεσμών. Η πιο ουσιώδης διασύνδεση του δικτύου είναι εκείνη του υδρογονικού δεσμού ανάμεσα στο οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της γλουταμίνης (Gln) 119 της HSP90 με την πλευρική αλυσίδα της γλουταμίνης (Gln) 208 της Cdc37. Η αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 καταλαμβάνει μια επιφάνεια  $1056 \text{ \AA}^2$  ανάμεσα στα δύο μόρια (Εικόνα 4). Αξίζει να σημειωθεί πως τόσο η Cdc37 όσο και η HSP90, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, εμφανίζονται κατά την αλληλεπίδραση τους ως ομοδιμερή, όταν απουσιάζει η κινάση από το σύμπλοκο [38].

Η celastrol είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπενοειδές που εξάγεται από το φυτό *Tripterygium wilfordii* [39]. Οι Tao Zhang *et al.* έδειξαν πως η celastrol διακόπτει την αλληλεπίδραση της Cdc37 με την Hsp90 *in vitro* και *in vivo*. Χρησιμοποιώντας υπολογιστικά μοντέλα προσομοίωσης βρέθηκε πως ανακόπτει την κρίσιμη αλληλεπίδραση της Cdc37 με την Hsp90, χωρίς να παρεμβάλλεται στην περιοχή πρόσδεσης ATP της HSP90. Με τον τρόπο αυτό, επάγει την αποικοδόμηση της Akt και Cdk4 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, επάγοντας έτσι την απόπτωση. Σε ξενομοσχεύματα (xenografts) από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παγκρέατος μείωσε τόσο το μέγεθος του όγκου όσο και των αριθμό των μεταστάσεων τους [40,41].

Η Withaferin A, ένα άλλο φυτοχημικό παράγωγο που απομονώνεται από το φαρμακευτικό φυτό *Withania somnifera*, φαίνεται επίσης να επηρεάζει τη σύνδεση της Cdc37 με την Hsp90 χωρίς να επηρεάζει την πρόσδεση του ATP στην HSP90. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η επαγωγή

της πρωτεόλυσης των Akt και Cdk4 σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα. Σε ξενομοσχεύματα ανθρώπινων παγκρεατικών κυττάρων μειώνει επίσης το μέγεθος των όγκων [42] [43].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτεϊνικού συμπλόκου Cdc37/HSP90/κινάσης

#### A.4.4. Αλληλεπίδραση της Cdc37 με τις Κινάσες

Η Cdc37 αλληλεπιδρά με τις κινάσες-πελάτες της με το αμινοξικό της περιοχή. Η δομή όμως αυτής της περιοχής είναι προς το παρόν άγνωστη, από την αμινοξική ακολουθία της όμως προβλέπεται τουλάχιστον ένα τμήμα με δομή coiled-coil. Ο τρόπος με τον οποίο αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες στόχους της, είναι επίσης άγνωστος προς το παρόν. Στην περίπτωση των κινασών, η Cdc37 πιθανόν να αναγνωρίζει τη συντηρημένη δομή της καταλυτικής τους περιοχής, καθώς μεταλλαγμένες κινάσες που στερούνται αυτή τη δομή αποτυγχάνουν να συνδεθούν με την Cdc37 [44,45].

Η αλληλεπίδραση κάθε κινάσης με τις συνοδές πρωτεΐνες έχει διαφορετικές, χαρακτηριστικές ιδιότητες, παρόλο που η καταλυτική τους περιοχή είναι η τρίτη πιο συντηρημένη στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Λόγω των λεπτών διαφορών στη δομή του αμινοτελικού τους λοβού, κάποιες κινάσες απαιτούν εκτεταμένη αλληλεπίδραση με την HSP90 και την Cdc37 για να είναι λειτουργικές και σταθερές [46].

Άλλες κινάσες για να σταθεροποιηθούν μπορεί να χρειάζονται επιπρόσθετες ενδομοριακές περιοχές από ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες τελικά επιφέρουν τη σταθερότητα ταυτόχρονα με την εξειδίκευση για το υπόστρωμα. Για παράδειγμα, η Cdk4 δεσμεύεται αρχικά με τις Cdc37 και HSP90 και παραμένει σε αυτές, μέχρι η Κυκλίνη D1 (Cyclin D1) συνδεθεί μαζί της δημιουργώντας ένα διμερές σύμπλοκο σταθερό αρκετά, έτσι ώστε να μην χρειάζεται η συνοδευτική δράση από την Cdc37 και την HSP90, με τελικό στόχο την ενεργοποίηση της Cdk4 [47]. Αντίθετα, ο ErbB2 συνδέεται επί μακρόν με το σύμπλοκο των συνοδών πρωτεϊνών, ακόμα και όταν βρίσκεται στην ενεργή του μορφή. Οι ακριβείς συνθήκες κατά τις οποίες απαιτείται η Cdc37 για σταθεροποίηση και ενεργοποίηση των κινασών ποικίλουν τόσο όσο και ο αριθμός των κινασών με τις οποίες αλληλεπιδρά [36]. Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο η Cdc37 συμβάλλει στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών-πελατών της με το να τις συνδέει στην HSP90, με το να ενισχύει την ένταση της αλληλεπίδρασης με την HSP90 ή με την απευθείας δράση της ως συνοδός πρωτεΐνη. Μελέτες σε κυτταρικά συστήματα θηλαστικών, έδειξαν πως ο ρόλος της Cdc37 σε σχέση με την Raf-1 είναι η προώθηση του σχηματισμού του ετεροτριμερούς συμπλόκου με την HSP90 (HSP90-Cdc37-Raf-1) [35]. Η ενεργότητα της κινάσης Hck αυξάνεται σημαντικά όταν υπερεκφράζεται η Cdc37, λόγω της προώθησης της αλληλεπίδρασης της Hck με την Hsp90 και την αναδίπλωση της σε μια ενεργή στερεοδιάταξη [48]. Τέλος, η Cdc37 μπορεί και προσδένεται απευθείας στην Akt, χωρίς τη συμμετοχή της HSP90, όπου η αλληλεπίδραση αυτή δεν επηρεάζεται από τους αναστολείς της HSP90, παρόλο που ο χρόνος ημιζωής της κινάσης μειώνεται [49].

Η φωσφορυλίωση της Cdc37 στο κατάλοιπο σερίνης 13, φαίνεται να είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση της με τις κινάσες [50]. Όμως, ο πλήρης μηχανισμός ρύθμισης δεν είναι ακόμη γνωστός. Οι Vaughan *et al.* έδειξαν πως η φωσφατάση PP5 αποφωσφορυλιώνει ειδικά τη σερίνη 13 του Cdc37 μόνο όταν αυτή βρίσκεται στο σύμπλοκο HSP90/Cdc37/κινάσης. Σε αντίθεση με την CK2, που είναι συνεχώς ενεργή και η Cdc37 συνεχώς φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 13 και στην ελεύθερη μορφή της αλλά και όταν βρίσκεται σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα, η PP5 ενεργοποιείται μόνο όταν συνδεθεί με το σύμπλοκο HSP90/Cdc37/κινάσης. Εικάζεται ότι με την ειδική δράση της απελευθερώνει το μόριο της κινάσης από το σύμπλοκο, για να ακολουθήσει νέος κύκλος ενεργοποίησης [51]. Πολύ πρόσφατα, οι Wanping Xu *et al.* έδειξαν πως η Cdc37 φωσφορυλιώνεται στα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης 4 και 298 από την κινάση Yes. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές οδηγούν στην αποδέσμευση της συνδεδεμένης με την Cdc37 κινάσης.

Παράλληλα η φωσφορυλίωση της Hsp90 στο κατάλοιπο τυροσίνης 197 αποσυνδέει τη Cdc37 από την HSP90 [52].

#### **A.4.5. Δράση της Cdc37 ανεξάρτητη από την HSP90**

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν πως η Cdc37 λειτουργεί σε συνεργασία με την HSP90. Υπάρχουν όμως πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε ζύμες που δείχνουν πως η Cdc37 μπορεί να δράσει ανεξάρτητα από την HSP90. Ειδικότερα μπορεί να σταθεροποιεί εγγενείς ασταθείς κινάσες, όπως η κινάση καζεΐνης 2 (CK2) η οποία και φωσφορυλιώνει την Cdc37, και να λειτουργεί ως συνοδή πρωτεΐνη παρακράτησης (holding chaperone) που διατηρεί μη σωστά αναδιπλωμένα μόρια σε κατάσταση ικανά για αναδίπλωση για άλλες συνοδές πρωτεΐνες. Αυξημένα επίπεδα της Cdc37 μπορούν να αντισταθμίσουν μερικώς μεταλλάξεις στο γονίδιο της HSP90 που την καθιστούν ανενεργή, όπως στο να διατηρηθεί η ενεργότητα της ετερόλογα εκφραζόμενης κινάσης v-Src [53] (αλλά και να διατηρήσει τα επίπεδα του υποδοχέα ανδρογόνων [54]. Σε κύτταρα θηλαστικών, μόνο το μισό περίπου σύμπλοκο Cdc37-Cdk4 είναι συνδεδεμένο και με την HSP90 [55]. Άρα η Cdc37 μπορεί να δεσμεύεται στους στόχους της ανεξάρτητα από την HSP90, η οποία δεν είναι πάντα απαραίτητη για την δράση της Cdc37. Τόσο η Cdc37 της ζύμης όσο και αυτή των θηλαστικών, είναι ικανές για μερική αναγνώριση των πρωτεϊνών πελατών τους, με δράση συνοδής πρωτεΐνη και σταθεροποίηση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών χωρίς την παρουσία της HSP90, αλλά η δράση τους μεγιστοποιείται όταν και οι δύο συνοδές πρωτεΐνες συνεργάζονται.

#### **A.4.5. Στόχοι της Cdc37 εκτός από Κινάσες**

Η κυρίαρχη άποψη είναι πως η Cdc37 αποτελεί μια συν-συνοδή πρωτεΐνη με ειδικότητα στις κινάσες, κάτι που φαίνεται από το σύνολο των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά και στις οποίες ασκεί κάποια ρύθμιση. Εντούτοις, ένα από τα πρώτα μόρια στα οποία διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση με την Cdc37 ήταν το υαλουρονικό οξύ [33].

Ο υποδοχέας των ανδρογόνων (androgen receptor) χρειάζεται τη δράση της Cdc37 για να ενεργοποιηθεί. Η Cdc37 αλληλεπιδρά με την περιοχή πρόσδεσης του ενεργοποιητή του AR και η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται και από την HSP90. Το γεγονός πως η Cdc37 δεν αλληλεπιδρά με το συγγενικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ενισχύει την άποψη πως η αλληλεπίδραση αυτή είναι ειδική [25],[54].

Ακόμη, η Cdc37 αλληλεπιδρά με την αντίστροφη μεταγραφάση (RT) του ιού της ηπατίτιδας Β στα κύτταρα του ξενιστή, διαμεσολαβώντας στην αλληλεπίδραση της RT με την HSP90. Με αυτό το τρόπο δρα σαν συμπαράγοντας για την αντιγραφή του ιού [56]. Πρόσφατα, οι Jinwal *et al.* έδειξαν πως η Cdc37 συνεντοπίζεται με την νευροειδική πρωτεΐνη Tau σε νευρικά κύτταρα, αλλά και να αλληλεπιδρά μαζί της. Επιπλέον αποσιώπηση της Cdc37 με χρήση siRNA, οδήγησε σε χαμηλότερα επίπεδα την Tau, αλλά και στην μειωμένη φωσφορυλίωση της [57].

#### **A.4.6. Cdc37 και Καρκίνος**

Η έκφραση της Cdc37 είναι αυξημένη σε πολλαπλασιαζόμενους ιστούς και ιδιαίτερα αυξημένη σε καρκίνους όπως εκείνον του προστάτη, το λέμφωμα από μεγάλα αναπλαστικά κύτταρα, την οξεία μυελοειδή λευχαιμία, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το πολλαπλό μύελωμα [58,59,60,61].

Επιπλέον, όταν το CDC37 γονίδιο υπερεκφράζεται λειτουργεί σαν ογκογονίδιο. Οι Stepanova *et al.* διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου CDC37 σε διαγονιδιακά ποντίκια, οδηγούσε σε ανάπτυξη όγκων μαστού και λεμφωμάτων. Σε άλλη περίπτωση όταν η Cdc37 συνεκφραζόταν με το πρωτο-ογκογονίδιο MYC, οι φαινότυποι και των δύο παραγόντων ενισχύονταν, εμφανίζοντας όγκους μεγαλύτερους τόσο σε μέγεθος όσο και αριθμό. Ταυτόχρονα τα αρσενικά ζώα εμφάνισαν όγκους στους όρχεις [62].

Τέλος, ο PDGFRα ανιχνεύτηκε σε σύμπλοκα με τις HSP90-Cdc37 σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, πνεύμονα και γλοιοβλαστώματος.

Η Cdc37 όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, αλληλεπιδρά και ρυθμίζει κυρίως κινάσες, κάποιες από τις οποίες είναι μέρος των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία απορυθμίζονται στον καρκίνο (π.χ. Raf, Akt, Cdk4). Το γεγονός πως η Cdc37 εκφράζεται κυρίως σε πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, ενώ οι περισσότεροι φυσιολογικοί ιστοί δεν φαίνεται να πολλαπλασιάζονται ή να απαιτούν την παρουσία της Cdc37 για την επιβίωση τους (σε αντίθεση με την Hsp90 όπου οι πελάτες της είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων), την καθιστούν ως υποψήφιο στόχο στην καταστολή του καρκίνου.

Η αποσιώπηση της Cdc37 με τη χρήση siRNA σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη οδήγησαν στη μόνιμη αναστολή της ανάπτυξης τους σε ανδρογόνου-εξαρτώμενες και μη, κυτταρικές σειρές. Η αναστολή της αύξησης συσχετίστηκε με τη μειωμένη κυτταρική σηματοδότηση στα μονοπάτια της ERK, Akt και mTOR καθώς και των επαγόμενων από τον

υποδοχέα, ανδρογόνων μονοπατιών. Επιπλέον, η αποσιώπηση της Cdc37 καταστέλλει τη ενεργότητα του HSF1 και την έκφραση της HSP70, μόρια τα οποία αποτελούν συστατικά ενός κοινού μονοπατιού που οδηγεί στην αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά, όπως αναστολείς της Hsp90 και παράγοντες που οδηγούν στο πρωτεόσωμα [27,63].

Σε μια παρόμοια μελέτη, η αποσιώπηση της Cdc37 με τη χρήση siRNA σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου, έδειξε την αποδέσμευση των κινασών-πελατών από τα σύμπλοκα τους με την Hsp90 και την Cdc37, χαμηλότερα επίπεδα των πρωτεϊνών ERBB2, CRAF, CDK4 και CDK6 καθώς και χαμηλότερα επίπεδα στη φωσφορυλιωμένη Akt με αποτέλεσμα και την μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συνδυάζοντας την αποσιώπηση της Cdc37 με την ταυτόχρονη χορήγηση του αναστολέα της Hsp90 17-AAG, παρατηρήθηκε εκτενής και διαρκής μείωση των κινασών-πελατών, καθώς και παρεμπόδιση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση [64].



## **B. ΚΙΝΑΣΕΣ**

### **B.1. Γενικά Χαρακτηριστικά Κινασών**

Στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών, τα γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες καταλαμβάνουν περίπου το 2%, ενώ στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν εντοπιστεί 518 γονίδια κινασών [65].

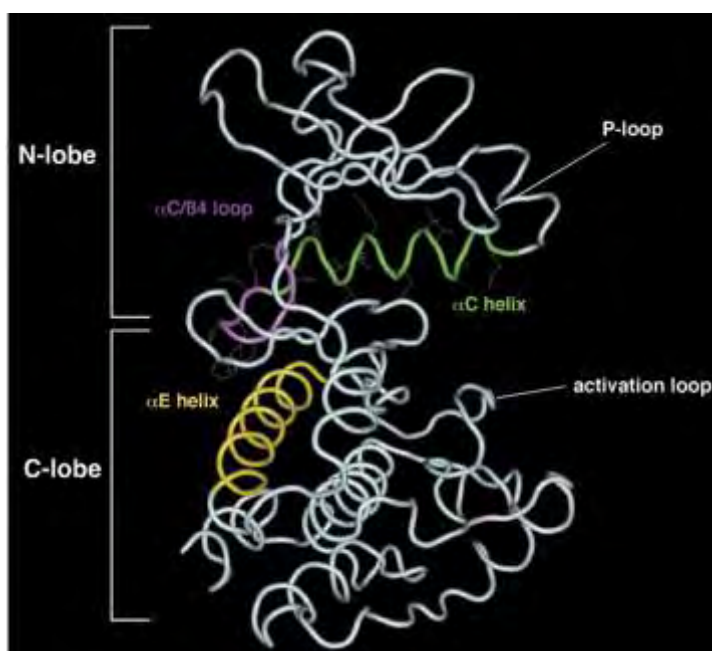
Οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται στις περισσότερες κυτταρικές διαδικασίες, όπως στο μεταβολισμό, τη μεταγραφή, την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, τις κυτταροσκελετικές αναδιοργανώσεις και την κυτταρική κίνηση, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν επίσης στη διακυτταρική επικοινωνία, την ανάπτυξη, τις φυσιολογικές αποκρίσεις και την ομοιόσταση.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις υποδοχείς-πρωτεϊνικές κινάσες (receptor protein kinases) και τις μη υποδοχείς πρωτεϊνικές κινάσες (non receptor protein kinases). Οι πρώτες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, των οποίων το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει την καταλυτική περιοχή κινάσης, ενώ το αμινοτελικό άκρο είναι εξωκυτταρικό και περιέχει την περιοχή δέσμευσης των προσδετών. Οι μη-υποδοχείς πρωτεϊνικές κινάσες είναι κυρίως διαλυτές, ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Ανάλογα με το υπόστρωμα το οποίο φωσφορυλιώνουν μπορούν να διακριθούν σε κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τυροσίνης και ιστιδίνης.

#### **B.1.2. Δομή και Λειτουργία Κινασών**

Η καταλυτική περιοχή των κινασών έχει μια πολύ συντηρημένη αρχιτεκτονική, η οποία είναι κοινή στις κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης. Η περιοχή αυτή, που αποτελείται από περίπου 300 αμινοξέα στις κινάσες των ευκαρυωτικών, διαιρείται σε δύο λοβούς. Ανάμεσα στους δύο λοβούς σχηματίζεται μια χαράδρα όπου δεσμεύεται το νουκλεοσίδιο. Ο αμινοτελικός λοβός (N-lobe) αποτελείται από β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα, ενώ ο καρβοξυτελικός λοβός (C-lobe) σταθεροποιείται από τις α-έλικες που διατρέχουν τον πυρήνα του λοβού. Το ATP σταθεροποιείται από αμινοξικά κατάλοιπα στον N-λοβό, ενώ το υπόστρωμα δεσμεύεται στον C-λοβό. Η πρόσβαση του υποστρώματος ρυθμίζεται από το 'βρόγχο ενεργοποίησης' (**Εικόνα 5**). Στις μη ενεργοποιημένες κινάσες η αC έλικα του N-λοβού είναι συχνά εκτοπισμένη, παρεμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση ATP. Οι κινάσες μπορούν να ενεργοποιηθούν με πολλούς τρόπους, αλλά ο πιο κοινός είναι η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης (activation loop).

Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αλλαγή του προσανατολισμού της  $\alpha C$  έλικας, η οποία απαιτεί τον συγκεκριμένο προσανατολισμό για να επιτευχθεί η ενεργός στερεοδιάταξη. Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου των κινασών, ο N-λοβός μετακινείται προς τον C-λοβό παρουσία νουκλεοτιδίου ή υποστρώματος ή και των δύο, σχηματίζοντας μια «κλειστή κατάσταση» (close state). Με την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου και την αποδέσμευση του ADP, ο N-λοβός μετακινείται ξανά προς την αντίθετη κατεύθυνση για να αποκαλύψει τώρα μία ανοικτή στερεοδιάταξη. Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανάμεσα στην  $\alpha C$  έλικα και τη  $\beta 4$  πτυχωτή επιφάνεια θεωρούνται πως λειτουργούν ως σύνδεσμος που επιτρέπει στο N-λοβό να περιστρέφεται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου.



Εικόνα 5: Τριτοταγής δομή του ενεργού κέντρου της κινάσης

## B.2. Υποδοχείς Κινάσης Τυροσίνης

### B.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά Κινάσης Τυροσίνης

Τα κύτταρα δέχονται πολυάριθμες πληροφορίες από το εξωκυτταρικό τους περιβάλλον, μέσω σημάτων όπως αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, σήματα περιβαλλοντικού στρες κ.ά. Τα σήματα αυτά προσδένονται στους υποδοχείς επιφανείας και η ροή της πληροφορίας μεταβιβάζεται στο κύτταρο μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σήματος.

Οι υποδοχείς-κινάσες τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με ενδογενή ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ανάπτυξη, διαφοροποίηση, κυτταρική κίνηση και επιβίωση. Σε αυτούς προσδένονται αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και ορμόνες. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν περίπου 20 κλάσεις κινασών, μεταξύ των οποίων οι ErbB υποδοχείς, οι VEGF υποδοχείς, οι υποδοχείς της ινσουλίνης και οι PDGF υποδοχείς.

Η υποκλάση I των υποδοχέων-κινασών τυροσίνης στα θηλαστικά αποτελεί την οικογένεια των ErbB υποδοχέων. Σε αυτήν ανήκουν οι τέσσερις υποδοχείς, EGFR/ErbB-1, ErbB-2 (HER-2/Neu), ErbB-3 και ErbB-4 [66,67]. Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν μια εξωκυτταρική περιοχή στην οποία προσδένεται ο προσδέτης (ligand), μια συνδετική διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική περιοχή στην οποία εντοπίζεται και η ενεργότητα κινάσης (**Εικόνα 6**). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της μη δεσμευμένης με προσδέτη εξωκυτταρικής περιοχής των ErbB-1, ErbB-3 και ErbB-4, έδειξαν ότι η εξωκυτταρική περιοχή υφίσταται δύο πολύ διαφορετικές στερεοδομές: την κλειστή ή «δεμένη» (tethered), όπου ο προσδέτης δεν έχει συνδεθεί και ο υποδοχέας βρίσκεται σε μορφή αυτοαναχίτισης (auto inhibited form) και στη δεμένη με προσδέτη μορφή, «αλυτή» μορφή (untethered form) [68]. Η πρόσδεση του προσδέτη, προκαλεί δραστικές στερεοδιαταξικές αλλαγές στην εξωκυττάρια περιοχή. Ένας κρυμμένος βρόγχος (loop) που ονομάζεται βραχίονας διμερισμού (dimerization loop), με την πρόσδεση των προσδετών στους υποδοχέων προεκβάλλεται και οδηγεί στο σχηματισμό διμερών, ομοδιμερών ή ετεροδιμερών.

Τα συνδεδεμένα μόρια των ErbB υποδοχέων ανήκουν στην οικογένεια του EGF. Ανάλογα με την ειδικότητα πρόσδεσης, διακρίνονται τρεις ομάδες συνδεδεμένων μορίων στους ErbB υποδοχείς. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους EGF, τον παράγοντα ανάπτυξης όγκων-α (Tumor Growth Factor-α, TGF-α) την Amphiregulin (AR) και την Epigen (EPG), οι οποίες προσδένονται ειδικά στον ErbB-1. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις Betacellulin (BTC), τον HB-EGF (heparin-binding EGF) και την Epiregulin (EPR), που επιδεικνύουν διπλή ειδικότητα και προσδένονται τόσο στον ErbB-1 όσο και στον ErbB-4. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από τις Neuregulins ή Heregulins (NRGs ή HRGs), οι οποίες συγκροτούν δύο υπο-ομάδες ανάλογα με την ικανότητα τους να συνδέονται με τον ErbB-3 και τον ErbB-4 (NRG1 και NRG2) ή μόνο με τον ErbB-4 (NRG3 και NRG4). Κανένα μέλος της οικογένειας των EGF πεπτιδίων δε συνδέεται με τον ErbB-2 μέχρι τώρα [67]. Τα μόρια αυτά είναι συνήθως προϊόντα μεγαλύτερων διαμεμβρανικών

μορίων. Η έκφραση και επεξεργασία των πρόδρομων μορίων τους υπόκειται σε υψηλό ρυθμιστικό έλεγχο. Για παράδειγμα, ο μετασχηματισμός από το ενεργό Ras (και κατ' επέκταση από το MAPK μονοπάτι) ή η έκθεση σε αστεροειδείς ορμόνες οδηγεί στην αυξημένη έκφραση αρκετών ErbB προσδετών, ενώ η πρωτεόλυση που οδηγεί στο τελικό μόριο, από κάποια μεταλλοπρωτεάση (MMP) μπορεί να πυροδοτηθεί από την ενεργοποίηση άλλων υποδοχέων όπως οι υποδοχείς που συζεύκονται με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors).

Η πρόσδεση του συνδεδεμένου μορίου στους υποδοχείς ErbBs προκαλεί τη δημιουργία ομο- και ετερο-διμερών υποδοχέων και την ενεργοποίηση της περιοχής της ενδογενούς κινάσης, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση ειδικών κατάλοιπων τυροσίνης στην κυτταροπλασματική τους ουρά. Αυτά τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα λειτουργούν ως σημεία 'αγκυροβόλησης' για μεγάλο εύρος πρωτεϊνών, οι οποίες ενεργοποιούν τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς ενεργοποιούν με τη σειρά τους πολλαπλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η ειδικότητα και δραστικότητα των ενεργοποιημένων υποδοχέων καθορίζεται από την ταυτότητα των συνδεδεμένων μορίων, τη σύνθεση των ετεροδιμερών των υποδοχέων και από τις πρωτεΐνες που συνδέονται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης στην κυτταροπλασματική ουρά κάθε ErbB υποδοχέα μετά το σχηματισμό διμερών. Ποιές θέσεις θα αυτοφωσφορυλιωθούν και κατά συνέπεια ποιές πρωτεΐνες σήματος θα συνδεθούν σε αυτές τις θέσεις εξαρτάται από το συνδεδεμένο μόριο και το ετεροδιμερές του υποδοχέα.

Η ενεργοποίηση του Ras και του MAPK μονοπατιού είναι καθολική για όλους τους προσδέτες των ErbB υποδοχέων. Το PI3K-Akt ενεργοποιείται καταρροϊκά (downstream) σχεδόν σε όλα τα ενεργοποιημένα διμερή των ErbB. Η ενεργότητα όμως της PI3K κινάσης ποικίλει, ίσως επειδή αυτή δεσμεύεται απευθείας στους ErbB-3, ErbB-4 και ενεργοποιείται, ενώ η ενεργοποίηση της από τους ErbB-1 και ErbB-2 γίνεται δευτερογενώς από άλλες πρωτεΐνες [69].

### **B.2.3. HER-2 Υποδοχέας**

Όπως προαναφέρθηκε, ο HER-2 (ή αλλιώς ErbB-2 και Neu) είναι ένας 'ορφανός' υποδοχέας, δηλαδή δεν προσδέεται κανένας προσδέτης σε αυτόν. Έχει μοριακό βάρος 185 kDa και αποτελείται από 1255 αμινοξικά κατάλοιπα. Όπως όλα τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων ErbB, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και έχει την τυπική δομή τριών περιοχών. Αποτελείται δηλαδή από μια διαμεμβρανική περιοχή, μια κυτταροπλασματική περιοχή με

ενεργότητα κινάσης και ουρά με θέσεις φωσφορυλίωσης καθώς και μια εξωκυτταρική περιοχή που περιλαμβάνει τέσσερεις υπο-περιοχές [70].

Ο HER-2 διαφέρει λειτουργικά από τους υπόλοιπους υποδοχείς της οικογένειας, διότι οι εξωκυτταρικές περιοχές L1 και L2, οι οποίες αντιστοιχούν στις θέσεις πρόσδεσης, παρουσιάζουν μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους με αποτέλεσμα την ανικανότητα του HER-2 να προσδένει μόρια [71]. Επιπλέον συνέπεια της αλληλεπίδρασης L1-L2, είναι ο υποδοχέας HER-2 να υιοθετεί μόνιμως μια εκτεταμένη στερεοδιάταξη διμερισμού και συνεκδοχικά να είναι πάντα έτοιμος για διμερισμό με άλλα μέλη της οικογένειας, τα οποία ενεργοποιούνται από συνδεδεμένο μόριο. Επιπλέον, μια μεταλλαγή στο κωδικόνιο 655 του γονιδίου του HER-2 οδηγεί σε αμινοξική αντικατάσταση της βαλίνης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα και την προώθηση του ομοδιμερισμού του [72,73].

Αν και ο HER-2 δεν προσδένει απευθείας κανένα προσδέτη, φαίνεται να ευνοείται στο σχηματισμό ετεροδιμερών με τους υπόλοιπους υποδοχείς όταν αυτοί προσδένουν κάποιο μόριο. Επιπλέον, τα ετεροδιμερή που περιέχουν HER-2 χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή ικανότητα μεταγωγής σήματος, διότι ο HER-2 αυξάνει τη συγγένεια πρόσδεσης και μειώνει δραματικά το ρυθμό αποσύνδεσης του συνδεδεμένου μορίου, μειώνει την ενδοκυττάρωση και αυξάνει την ανακύκλωση των υποδοχέων, επιτυγχάνοντας ισχυρή και μεγάλης διάρκειας ενεργοποίηση των καταρροϊκών (*downstream*) μονοπατιών μεταγωγής σήματος [74]. Επιπλέον, μέσω διαφορετικής φωσφορυλίωσης οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση, ενώ τα κυριότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία ενεργοποιεί είναι αυτά των MAPK και PI3K. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το διμερές που σχηματίζεται από τον HER-2 και τον ErbB-3. Ενώ ο HER-2 δεν έχει προσδέτη που να τον ενεργοποιεί και ο ErbB-3 στερείται ενεργότητα κινάσης, εντούτις το σχηματισμένο διμερές παρουσιάζει την ισχυρότερη ίσως μεταγωγή σήματος και την υψηλότερη ικανότητα μετασχηματισμού. Ο HER-2 μπορεί να σχηματίζει διμερή με τα μέλη των EGFRs, αν και τα διμερή του HER-2 με τον ErbB4 είναι τα πιο σπάνια. Με την ενεργοποίησή του, ο HER-2 αυτοφωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στην καρβοξυτελική του ουρά. Οι θέσεις αυτές αποτελούν σημεία πρόσδεσης για ‘adaptor proteins’ καθώς και σηματοδοτικά μόρια που οδηγούν στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών. Πιο σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης φαίνεται να είναι οι Y1248/1253, οι οποίες και οδηγούν στην ενεργοποίηση των Erks1/2 με πολύ ισχυρή ογκογόνο δράση [75]. Σηματοδοτικά μόρια όπως τα PLC-1 και c-Src, συνδέονται στις θέσεις αυτές με τις δύο

τελευταίες να ενεργοποιούνται άμεσα από τον HER-2. ‘Adaptor proteins’ όπως οι SHC και η GrB-2 επίσης συνδέονται σε διάφορες φωσφορυλιωμένες θέσεις, όπου τελικά επάγουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του Ras [76].

Παρόλο που ο Her-2 δεν έχει κάποιο σημείο πρόσδεσης της PI3K και άρα την άμεση ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-Akt, εντούτοις μέσω του διμερούς HER-2-ErbB3 επάγει την αντιαποπτωτική δράση του PI3K-Akt μονοπατιού. Ο HER-2, σε μη παθολογικές συνθήκες εμπλέκεται στην ανάπτυξη και ομοιόσταση κυρίως του νευρικού και καρδιαγγειακού συστήματος.

Ο HER-2 είναι μοναδικός ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των ErbB υποδοχέων, όχι μόνο λόγω της ιδιαίτερης στερεοδιάταξης της εξωκυτταρικής του περιοχής, η οποία αναφέρθηκε πιο πάνω, αλλά και για το γεγονός ότι η ενεργότητα του εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της περιοχής της κινάσης του με το συνοδό μόριο HSP90. Ο HER-2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στο αντιβιοτικό GA το οποίο προσδένεται στη θέση πρόσδεσης ATP της HSP90 λειτουργώντας έτσι ως αναστολέας του μορίου [77],[78]. Συγκεκριμένα, η GA διαταράσσει την αλληλεπίδραση του HER-2 με την HSP90 και προκαλεί αστάθεια και γρήγορη αποικοδόμηση του υποδοχέα μέσω του πρωτεοσώματος. Οι Xu *et al.*[79] κατάφεραν να απομονώσουν μια περιοχή στην κινάση του HER-2, η οποία διαφέρει από την αντίστοιχη περιοχή των ErbB-1 και ErbB-3 σε κάποια αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο της κινάσης του υποδοχέα και συγκεκριμένα σε μια δομή θηλιάς που προεκβάλλει στην επιφάνεια του μορίου. Αυτή η περιοχή είναι θετικά φορτισμένη και υδρόφοβη, σε αντίθεση με την αντίστοιχη περιοχή του ErbB-1 η οποία έχει ισχυρά αρνητικό φορτίο. Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη περιοχή επηρεάζει το επιφανειακό φορτίο και την υδροφοβικότητα καθορίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση της κινάσης με την HSP90.

## **B2.2. EGFR Υποδοχέας**

Ο EGFR (ή αλλιώς ErbB-1 και HER-1) είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των υποδοχέων EGFR που ανακαλύφθηκε ως υποδοχέας αναπτυξιακού παράγοντα. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 1210 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακό βάρος 175 kDa. Όπως προαναφέρθηκε, σε αυτόν συνδέονται οι προσδέτες EGF και NRG επιτρέποντας να σχηματίζει λειτουργικά ομοδιμερή καθώς και τρία ετεροδιμερή με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (δηλαδή EGFR:HER-2, EGFR:ErbB-3, EGFR:ErbB-4). Μετά τη δέσμευση του προσδέτη και το

διμερισμό του, ο EGFR μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε δέκα διαφορετικά κατάλοιπα τυροσίνης στην καρβοξυτελική του ουρά. Οι φωσφορυλιωμένες αυτές περιοχές δεσμεύουν πρωτεΐνες (adaptor proteins) ή άλλα σηματοδοτικά μόρια, τα οποία φέρουν μοτίβα SH2 (Src-homology domain 2) ή PTB (Phosphotyrosine binding domain). Σε αυτές τις κυτταροπλασματικές περιοχές δεσμεύονται μόρια όπως Ras, MAPK, Src, STAT 3/5, PLCγ, PKC και PI3K. Ο EGFR και οι προσδέτες του εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του επιθηλιακού τμήματος του δέρματος, των πνευμόνων και του γαστρεντερικού αυλού [67].

### **B.3. Ενδοκυτταρικές Κινάσες**

Στις ενδοκυτταρικές κινάσες περιλαμβάνονται όλα τα ένζυμα που δρουν στο εσωτερικό του κυττάρου φωσφορυλιώνοντας άλλες πρωτεΐνες, με σκοπό την ενορχηστρωμένη επιτέλεση των κυτταρικών λειτουργιών. Αυτές περιλαμβάνουν κινάσες που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος και την ομοιόσταση του κυττάρου.

#### **B.3.1. MAP Κινάσες**

Το μονοπάτι των MAP κινασών αποτελείται από τρία βασικά μόρια κινασών, τα οποία με ιεραρχική σειρά αποτελούνται από τις Raf, MEK1/2 και ERK1/2. Το ενεργοποιημένο Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MEK1/2 και αυτές με τη σειρά τους τις ERK 1/2. Βασικό ρόλο στη φωσφορυλίωση του Raf διαδραματίζει η ενεργοποιημένο GTPάση Ras, η οποία δεσμεύεται στη Raf. Οι ενεργοποιημένες ERK1/2 εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου φωσφορυλιώνουν μια σειρά από μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι με τη σειρά τους οδηγούν στην έκφραση γονιδίων που επιφέρουν αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την κυτταρική κίνηση. Για παράδειγμα, οι μεταγραφικοί παράγοντες ETS (Erthroblastosis virus Twenty-Six) και AP-1 (activator protein 1) ρυθμίζονται από τις ERK1/2, οι οποίοι με τη σειρά τους οδηγούν στην έκφραση των κυκλίνων τύπου D (Cyclins D), όπως η κυκλίνη D1, με αποτέλεσμα να προωθείται ο κυτταρικός κύκλος στην έξοδο από την G1 φάση. Ακόμη, οι ενεργοποιημένες ERK1/2 εμπλέκονται στη ρύθμιση της οικογένειας των αποπτωτικών ρυθμιστών BCL-2, προωθώντας έτσι την κυτταρική επιβίωση, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην έκφραση των κυτοκινών και των μεταλλοπρωτεασών, τα οποία προωθούν την κυτταρική κίνηση και την κυτταρική διείσδυση.

### **B.3.2. Το Μονοπάτι PI3K/Akt**

Η οικογένεια των κινασών φωσφατοϊνοσιτόλης 3 (PI3K) αποτελείται από τέσσερις κλάσεις κινασών (I έως IV), εκ των οποίων οι τρεις πρώτες φωσφορυλιώνουν λιπίδια, ενώ η τέταρτη (IV) φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες (mTOR, ATM, ATR και DNA-PK). Η Akt, επίσης γνωστή και με το όνομα πρωτεϊνική κινάση PKB (Protein Kinase B) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία απαντάται σε τρεις ισομορφές (Akt1, Akt2 και Akt3). Οι τρεις ισομορφές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία και δεν έχουν αναμεταξύ τους ειδικότητα στα υποστρώματα τους *in vitro* [80]. *In vivo* όμως, δε θα μπορούσε να αποκλειστεί το γεγονός οι διάφορες ισομορφές να παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα τους [81]. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη σχετική ιστοειδική έκφραση των ισομορφών της Akt, κατά την οποία διαφορετικές ισομορφές έχουν πρόσβαση σε συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς στόχους.

Η PI3K ενεργοποιείται κυρίως από αναπτυξιακούς παράγοντες και την ινσουλίνη μέσω των RTKs στην πλασματική μεμβράνη. Αφού ενεργοποιηθεί φωσφορυλιώνει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>) σε 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP<sub>3</sub>). Η PIP<sub>3</sub> επάγει την κινητοποίηση των Akt και της PDK1 στη μεμβράνη, όπου και δεσμεύονται μέσω περιοχών, ομόλογων με την πλεκστρίνη PH (plecstrin homology domain). Εκεί, η PDK1 φωσφορυλιώνει την Akt στο αμινοξικό κατάλοιπο θρεονίνης 308 (Thr308), γεγονός που ενεργοποιεί την καταλυτική της ενεργότητα. Η Akt επίσης φωσφορυλιώνεται από την PDK2 ή mTORC2 στο αμινοξικό κατάλοιπο σερίνης 473 (Ser473), το οποίο βρίσκεται στη μη καταλυτική, υδρόφοβη περιοχή HM. Η φωσφορυλίωση της Ser473, παρόλο που δεν είναι στη περιοχή ενεργοποίησης της κινάσης, είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Akt.

Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει με τη σειρά της μια πληθώρα από πρωτεΐνες-στόχους/κινάσες που εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση, την είσοδο στο κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική επιβίωση [82]. Η ρυθμιστική δράση της Akt ασκείται μέσω της απενεργοποίησης των πρωτεϊνών-στόχων της έπειτα από τη φωσφορυλίωση τους [83,84].

### **B.4. Κινάσες και Καρκίνος**

Στον καρκινικό φαινότυπο η λειτουργία των κινασών απορρυθμίζεται. Αυτό οφείλεται είτε στην υπερέκφραση των γονιδιακών μεταγράφων είτε στην εγγενή ενεργότητα των κινασών λόγω μεταλλαγών.



#### **B.4.1. HER-2 και Καρκίνος**

Αρκετοί τύποι καρκίνου υπερεκφράζουν τον HER-2 (ή αλλιώς ErbB-2), όπως ο καρκίνος των πνευμόνων, του γαστρικού συστήματος, των ωοθηκών και του στόματος [85]. Δεδομένου ότι 15-30% των διεισδυτικών καρκίνων μαστού υπερεκφράζουν τον HER-2, η συσχέτιση με τον Her-2 είναι περισσότερο μελετημένη. Η υπερέκφραση συσχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, την επέκταση του στους λεμφαδένες, το υψηλό ποσοστό κυττάρων στην S-φάση, την ανευπλοειδία καθώς και την έλλειψη υποδοχέων στεροειδών ορμονών [67].

Οι περισσότεροι όγκοι που υπερεκφράζουν τον HER-2 δεν εκφράζουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, υποδεικνύοντας μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση ανάμεσα στον άξονα των στεροειδών υποδοχέων και του δικτύου ErbB. Η σχέση αυτή φαίνεται να είναι κρίσιμη για τους ασθενείς που λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή αντι-οιστρογόνων και υπερεκφράζουν τον HER-2, καθώς η κατάσταση τους δυσχεραίνεται. Σε κλινικό επίπεδο, η υπερέκφραση του HER-2 συνδέεται με υψηλή διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων, επανεμφάνιση της νόσου και σύντομο χρόνο επιβίωσης των ασθενών. Ο HER-2 εμπλέκεται επίσης στην ανθεκτικότητα των όγκων κατά τη χημειοθεραπεία. Φαίνεται, ότι επάγει την χημειοανθεκτικότητα (chemoresistance) μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K-Akt, καθώς και της επαγωγής της p21-Cip1 πρωτεΐνης που ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο [86],[87]. Επιπλέον, η υπερέκφραση του Her-2 προωθεί την αγγειογένεση μέσω της παραγωγής του αυξητικού παράγοντα αγγειακών επιθηλίων (VEGF) [88].

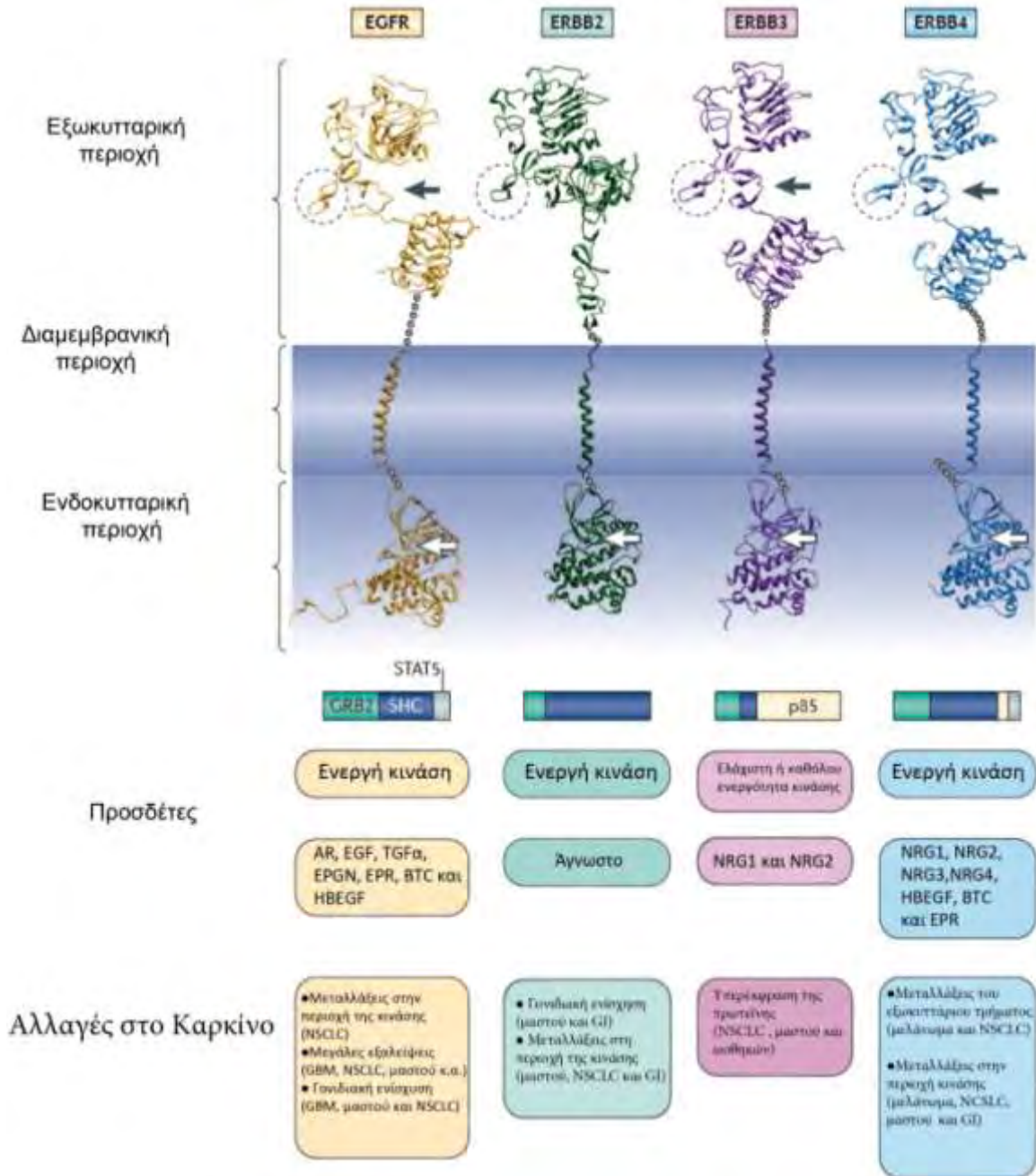
#### **B.4.2. EGFR και Καρκίνος**

Αλλαγές στη δομή του υποδοχέα λόγω μεταλλάξεων καθώς και η υπερέκφραση του συσχετίζονται με διάφορες μορφές καρκίνου (**Εικόνα 6**). Η υπερέκφραση του EGFR λόγω γονιδιακής ενίσχυσης έχει παρατηρηθεί και συνδεθεί με καρκινώματα του εγκεφάλου, του μαστού και καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου του κεφαλιού-αυχένα (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas). Σε αρκετές περιπτώσεις, η υπερέκφραση του υποδοχέα αποτελεί δείκτη επανεμφάνισης της νόσου και μικρού χρόνου επιβίωσης για τον ασθενή [67]. Σε ασθενείς με όγκους μαστού που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο BRAC1 γονίδιο, το 67% αυτών βρέθηκε να υπερεκφράζει τον EGFR, ενώ μόνο το 18% σε περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου [89]. Από τις γονιδιακές μεταλλάξεις πιο συχνή φαίνεται να είναι η εξάλειψη των εξονίων 2 έως 7 [90].

Η εξάλειψη αυτή οδηγεί στο σχηματισμό του υποδοχέα EGFRvIII, από τον οποίο λείπει ένα μεγάλο τμήμα της εξωκυττάριας περιοχής του, το οποίο περιλαμβάνει και το τμήμα στο οποίο προσδένονται οι ενεργοποιητές του (προσδέτες). Παρόλα αυτά, ο EGFRvIII εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Είναι συνεχώς διμερισμένος και ενεργοποιημένος, πιθανόν λόγω και των πολλών σημειακών μεταλλάξεων που συσσωρεύει στην εξωκυττάρια περιοχή του. Σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχειδειχθεί πως ο EGFRvIII έχει ογκογονική ικανότητα [91,92]. Ο μεταλλαγμένος αυτός υποδοχέας εντοπίζεται σε αφθονία σε όγκους εγκεφάλου άλλα και σε όγκους πνευμόνων, μαστού και ωοθηκών.

Σε αντίθεση με τον EGFR που μπορεί να ενεργοποιεί μια πλειάδα σηματοδοτικών μονοπατιών, ο μεταλλαγμένος EGFRvIII ενεργοποιεί κυρίως το PI3K σηματοδοτικό μονοπάτι [93,94] και έτσι οδηγεί στην έκφραση μόνο μέρους του συνόλου των γονιδίων που επάγει ο φυσιολογικός EGFR. Επιπλέον έχει αποδειχτεί πως ο μεταλλαγμένος EGFRvIII χρειάζεται τη συνοδεία της HSP90 και του Cdc37, με τις οποίες αλληλεπιδρά απευθείας στο κυτταρόπλασμα, για να αποκτήσει σωστή στερεοδιάταξη και σταθερή ενεργότητα κινάσης [95]. Λόγω της εμπλοκής του EGFR σε διάφορες μορφές καρκίνου, αποτελεί ένα ελκυστικό στόχο προσέγγισης στοχευμένων θεραπειών. Σε αντίθεση με τις κοινές χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες είναι πολύ τοξικές και έχουν πολλές παρενέργειες για τον ασθενή, η στοχευμένη θεραπεία επιδιώκει την καταστολή συγκεκριμένης πρωτεΐνης που έχει ξεφύγει από τη φυσιολογική της λειτουργία.

Η μία προσέγγιση βασίζεται στην καταστολή της ενεργότητας της κινάσης του υποδοχέα, μέσω μικρών συνθετικών μορίων που μιμούνται το ATP και προσδένονται στην περιοχή της κινάσης, αναστέλλοντας τη δράση της. Η δεύτερη προσέγγιση αφορά στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα. Στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η δέσμευση του εξωκυττάρια τμήματος του υποδοχέα από το μονοκλωνικό αντίσωμα, παρεμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση του προσδέτη, προκαλώντας την αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στο καρκινικό φαινότυπο. Επιπλέον, βασίζεται στη στρατολόγηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς, μέσω του Fc τμήματος του αντισώματος, και στην προώθηση κυτταροτοξικότητας, η οποία εξαρτάται από το αντίσωμα αντίδρασης [96,97,98,99,100].



**Εικόνα 6: Το δίκτυο των EGFR υποδοχέων και οι φαρμακολογικοί στόχοι του.**

Δύο αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs) που στοχεύουν τον EGFR, το Erlotinib και το Gefitinib, έχουν εγκριθεί για χορήγηση σε Μη Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (NSCLC). Επιπλέον το Erlotinib χορηγείται και σε ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνωμα. Το Lapatinib, το οποίο αποτελεί τον πρώτο διπλό αναστολέα που στοχεύει τον EGFR και τον ErbB-2-Her-2, έχει εγκριθεί για χρήση σε όγκους μαστού που υπερεκφράζουν τον HER-2. Αρκετοί άλλοι διπλοί αναστολείς, μερικοί εκ των οποίων δεσμεύονται ομοιοπολικά στους στόχους τους (π.χ. τα Neratinib και Afatinib), βρίσκονται ήδη σε στάδια κλινικών δοκιμών. Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των EGFR ή HER-2 ανθρωποποιήθηκαν για χρήση σε κλινικό

επίπεδο. Το Trastuzumab χρησιμοποιείται κατά των μεταστατικών όγκων μαστού που υπερεκφράζουν τον HER-2 καθώς επίσης και για όγκους του στομάχου (που επίσης είναι θετικοί για τον HER-2). Επιπρόσθετα, το Cetuximab εγκρίθηκε για χορήγηση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου αυχένα και κεφαλής. Το Panitumab, ένα πλήρως ανθρωποποιημένο αντίσωμα έναντι του EGFR, έχει εξίσου εγκριθεί για χορήγηση σε ασθενείς. Το Trastuzumab Emtansine (T-DM1) είναι το αντίσωμα Trastuzumab συζευγμένο με το κυτταροτοξικό φάρμακο Mertansine. Βρίσκεται στο στάδιο III των κλινικών δοκιμών. Δύο αντισώματα έναντι του ErbB-3, το MM-121 και το AMG -888, βρίσκονται στα πρώτα στάδια των δοκιμών.

## Γ. Μεταλλοπρωτεάσες

### Γ.1. Γενικά Χαρακτηριστικά Μεταλλοπρωτεασών

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs) είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών ενζύμων, τα οποία αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και της βασικής μεμβράνης, δηλαδή του εξωκυττάριου χώρου. Στα υποστρώματα των MMPs περιλαμβάνονται τα κολλαγόνα, μη κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεϊνογλυκάνες, η τενασίνη, η φιμπρονεκτίνη και η λαμινίνη [101]. Παρουσιάζουν μεταξύ τους κοινή δομική ομολογία και η παρουσία ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο είναι απαραίτητη για να δράσουν. Η οικογένεια περιλαμβάνει περισσότερα από 20 μέλη και η ονοματολογία τους ακολουθεί τη σειρά ανακάλυψής τους, μπροστά από τα αρχικά MMP (Πίνακας 6). Παράγονται από πολλά είδη κυττάρων όπως μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα. Οι MMPs παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως κατά την εμβρυική αύξηση και ανάπτυξη, τη μορφογένεση, την αναδιάταξη των οστών, την επούλωση τραύματος, την αγγειογένεση, την απόπτωση και την ανάπτυξη των νεύρων. Αυξημένη έκφραση και ενεργότητα των MMPs σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, καρδιαγγειακές νόσους και καρκίνο. Ανάλογα με τη δομή και το υπόστρωμα το οποίο καταλύουν ομαδοποιούνται σε ζελατινάσες, κολλαγενάσες, στρωμολυσίνες, ματρυλυσίνες και μεμβρανικές MMPS (MT-MMPs) [102].

### Γ.2. Δομή των Μεταλλοπρωτεασών

Όλες οι MMPs συντίθενται ως προένζυμα και εκκρίνονται ως ανενεργές MMPs στις περισσότερες περιπτώσεις, πλην της ματρυλυσίνης (MMP-7), για να ενεργοποιηθούν στη συνέχεια στον εξωκυττάριο χώρο από διάφορους μηχανισμούς. Η γενική δομή των μορίων των MMPs (Πίνακας 6) είναι η εξής:

**Σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide):** αποτελείται από 17-29 αμινοξέα και κατευθύνει το προϊόν μετάφρασης στο ενδοπλασματικό δίκτυο ώστε να ακολουθήσει την πορεία των εκκρινόμενων ενζύμων [102].

**Προπεπτίδιο (propeptide)-αμινοτελικό άκρο:** είναι το αμινοτελικό άκρο του μορίου, αποτελείται από 77-87 αμινοξέα [102] και έχει μια συντηρημένη αλληλουχία PRGC(V/N)PD. Η αλληλουχία επικαλύπτει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μέσω ενός δεσμού που αναπτύσσεται

μεταξύ του  $Zn^{+2}$  και της κυστεΐνης (Cys) του προπεπτιδίου. Όταν αφαιρεθεί το προπεπτίδιο από το μόριο τότε προκύπτει η ενεργός μορφή του ενζύμου. Η αλληλουχία αυτή δεν υπάρχει στην MMP-23 και στην MMP-11.

**Καταλυτική περιοχή:** αποτελείται από περίπου 170 αμινοξέα και φέρει μια περιοχή με πρότυπο (motif) HEXXHXXGXXH, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του δισθενούς ψευδαργύρου, καθώς και μία συντηρημένη μεθειονίνη, η οποία σχηματίζει μια μοναδική «στροφή μεθειονίνης». Η περιοχή αυτή σε δευτεροταγή δομή αποτελείται από πέντε β-πτυχωτές επιφάνειες, τρεις α-έλικες καθώς και bridging loops για την υδρολυτική δράση του ενζύμου έναντι των υποστρωμάτων του καθώς και για την αυτολυτική του δράση (αυτόλυση).

**Περιοχή άρθρωσης ή γέφυρα πλούσια σε Pro:** το μέγεθος της μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο. Έτσι στην περίπτωση των κολλαγονασών αποτελείται από 16 αμινοξέα ενώ στη ζελατινάση B (MMP-9) είναι κατά πολύ μεγαλύτερο. Στην περίπτωση των κολλαγονασών φαίνεται ότι η περιοχή αυτή, σε συνδυασμό με το C-τελικό πεπτίδιο, παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδιάταξη της τριπλής έλικας του υποστρώματος (κολλαγόνου) με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη δράση του ενζύμου. Κατά τον Murphy *et al.* [103] οι δύο παραπάνω περιοχές διατάσσονται αντικριστά εγκλωβίζοντας κατά κάποιον τρόπο το υπόστρωμα και αφού αυτό αποδιατάσσεται, στη συνέχεια υδρολύεται από την καταλυτική περιοχή του ενζύμου.

**Καρβοξυτελικό άκρο-δομή όμοια με αιμοπηξίνη:** αποτελείται από 210 αμινοξέα περίπου. Έχει σχήμα ελλεισοειδούς δίσκου και αποτελείται από ελικες που σχηματίζουν προπέλλα. Στην περίπτωση των κολλαγονασών (MMP1, MMP8 και MMP13) υποστηρίζεται ότι σε συνδυασμό με την καταλυτική και την περιοχή της άρθρωσης καθορίζουν την δέσμευση του υποστρώματος με το ένζυμο [103]. Επηρεάζεται με αυτόν τον τρόπο η εξειδίκευση του ενζύμου έναντι του υποστρώματος. Τέλος είναι η περιοχή η οποία ευθύνεται για την σύμπλοκη με TIMPs μορφή των μεταλλοπρωτεϊνών, μέσω σύζευξης της με την C-περιοχή των αναστολέων. Η σύμπλοκοποίηση αυτή είναι ισχυρότερη, μιλώντας για προένζυμα, μεταξύ MMP9/TIMP1 και MMP2/TIMP2 [103].

**Περιοχή ομόλογη με φιμπρονεκτίνη:** απαντάται μόνο στις ζελατινάσες A και B. Παρεμβάλλεται στην καταλυτική περιοχή, αποτελείται από 3 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας αμινοξέων (που μοιάζει με την ινοσυνδετίνη-φιμπρονεκτίνη) και είναι υπεύθυνη για την δυνατότητα δέσμευσης της ζελατίνης από τα μόρια των ζελατινών.

**Διαμεμβρανική περιοχή:** απαντάται στις μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs). Εμφανίζεται μετά το καρβοξυτελικό άκρο και ευθύνεται για την πρόσδεση των μορίων αυτών στην κυτταρική μεμβράνη.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	MMPs	ΔΟΜΗ
Κολλαγενάση 1	MMP-1	B
Ζελατινάση A	MMP-2	C
Στρωματολυσίνη 1	MMP-3	B
Ματριλυσίνη	MMP-7	A
Κολλαγενάση 2	MMP-8	B
Ζελατινάση B	MMP-9	D
Στρωματολυσίνη 2	MMP-10	B
Στρωματολυσίνη 3	MMP-11	E
Ελαστάση μακροφάγων	MMP-12	B
Κολλαγενάση 3	MMP-13	B
MT1-MMP	MMP-14	F
MT2-MMP	MMP-15	F
MT3-MMP	MMP-16	F
MT4-MMP	MMP-17	F
Κολλαγενάση 4 ( <i>Xenopus</i> )	MMP-18	B
(κανένα όνομα σε χρήση)	MMP-19	B
Enamelysin	MMP-20	B
XMMP ( <i>Xenopus</i> )	MMP-21	G
CMMP (chicken)	MMP-22	B
(κανένα όνομα σε χρήση)	MMP-23	H

**Πίνακας 6: Ονοματολογία και δομή των MMPs.**

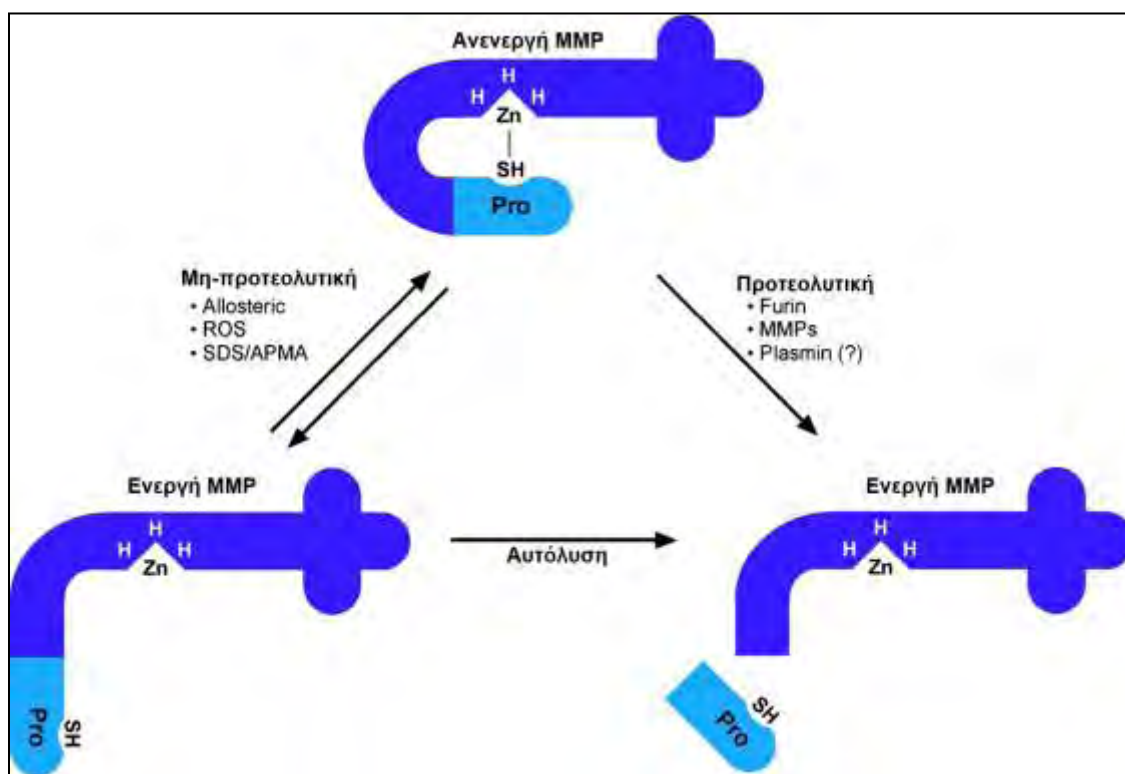
### Γ.2.1. Ρύθμιση της Λειτουργίας των Μεταλλοπρωτεασών

Η έκκριση και η διαφορική ενεργοποίηση των MMPs σε φυσιολογικούς ιστούς βρίσκεται κάτω από συνεχή και αυστηρή ρύθμιση. Η ρύθμιση αυτή σε γενικές γραμμές ασκείται σε τέσσερα επίπεδα: στη γονιδιακή έκφραση, στην ενεργοποίηση του προενζύμου, στην απενεργοποίηση τους και στη διαμερισματοποίηση τους.

### Γ.2.2. Ενεργοποίηση: Ο Διακόπτης Κυστεΐνης

Όπως αναφέρεται πιο πάνω, το προένζυμο διατηρείται σε ανενεργή κατάσταση λόγω της αλληλεπίδρασης του καταλοΐπου κυστεΐνης που βρίσκεται στη περιοχή του προπεπτιδίου και του ιόντος Zn στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου. Για να ενεργοποιηθεί το ένζυμο ουσιαστικά αυτό που χρειάζεται είναι η διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο, με επακόλουθο την έκθεση του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι καθολικός για όλες τις MMPs και ονομάστηκε «διακόπτης κυστεΐνης» (Cysteine Switch) [104]. Ουσιαστικά η

διάσπαση του δεσμού μεταξύ της κυστεΐνης και του Zn μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους (1) με την απευθείας εκτομή του προ-πεπτιδίου από μία άλλη πρωτεάση, (2) με την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων, αλκυλιοτικών παραγόντων, ιόντα βαρέων μετάλλων και δισουλφίδια, τα οποία οδηγούν στη μείωση της ελεύθερης θειόλης που συμμετέχει στο δεσμό κυστεΐνης-Zn και (3) με την αλλοστερική διατάραξη του ζυμογόνου. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις τελικά το μόριο οδηγείται στην αυτόλυση του προ-πεπτιδίου. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως *in vivo*, σε αντίθεση με αυτό που παρατηρείται σε *in vitro* συστήματα μελέτης, ασχέτως με ποιό με μηχανισμό θα διακοπεί η αλληλεπίδραση Cys-Zn, σε τελικό στάδιο ενεργοποίησης του ενζύμου το προπεπτίδιο αποκόπτεται από το ενεργό μόριο της MMP (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Γραφική αναπαράσταση της ενεργοποίησης των MMPs.

### Γ.3. Μεταλλοπρωτεΐνάσες και Καρκίνος

Η απορύθμιση της έκφρασης και ενεργότητας των MMPs είναι συνδεδεμένη σχεδόν με όλους τους καρκινικούς τύπους. Η αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης αποτελεί ένα φυσικό φραγμό ανάμεσα στα διαφορετικά είδη ιστών. Οι MMPs, αποικοδομώντας τη βασική μεμβράνη (ως συστατικό της ECM), επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να μετακινηθούν τόσο τοπικά όσο και σε απομακρυσμένα σημεία. Αρχικά υπήρχε η άποψη πως οι MMPs εμπλέκονται στην διείσδυση



των καρκινικών κυττάρων, στην ενδαγγείωση και εξαγγείωση, στην τοπική μετανάστευση στα μεταστατικά σημεία. Αυξανόμενα όμως δεδομένα αποδεικνύουν περαιτέρω ρόλους των MMPs όπως είναι η δημιουργία και διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος για την ανάπτυξη και την αγγειογένεση, τόσο των πρωτογενών όσο και των μετασταστικών όγκων (Εικόνα 8). Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τα επίπεδα έκφρασης των MMPs με τα στάδια ανάπτυξης ενός όγκου. Για παράδειγμα στα μελανώματα, η ζελατινάση β συσχετίζεται με τη μεταβολή από την ακτινωτή στην κάθετη ανάπτυξη του όγκου και στην επακόλουθη μετάσταση, ενώ η ζελατινάση α αυξάνεται με την αύξηση του σταδίου του όγκου.

Σε μια άλλη μελέτη, φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των MMP-2 και MMP-9 ήταν πολύ χαμηλά σε καλοήθεις όγκους ωοθηκών. Τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται σε προχωρημένα στάδια όγκων και μεταστάσεις, ενώ η ενεργοποιημένη MMP-2 εντοπίστηκε σε κακοήθεις όγκους και μεταστάσεις, αλλά όχι σε καλοήθεις [105]. Ομοίως σε όγκους από μαστό, όπου η έκφραση της MMP-2 είναι ευρεία, η αναλογία του ενεργού ενζύμου ως προς τη συνολική πρωτεΐνη αυξάνει σε σχέση με τη σοβαρότητα του φαινοτύπου και της μεταστατικότητας [106].



**Εικόνα 8: Ρόλοι των MMPs στον καρκίνο.** Τα μαύρα βέλη απεικονίζουν τα παλιότερα δεδομένα, τα κόκκινα βέλη τα νεότερα δεδομένα για τη συμμετοχή των MMPs στη καρκινογένεση και τη μετάσταση [107].

## **Δ.1. Μονοκλωνικά Αντισώματα και Καρκίνος**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα προέρχονται από ένα και μοναδικό μητρικό κλώνο, γι' αυτό και είναι ομοιογενή με καθορισμένη ειδικότητα και χημική συγγένεια έναντι ενός μόνο επιτόπου του αντιγόνου έναντι του οποίου παρήχθησαν. Η παραγωγή τους αναπτύχθηκε το 1976 από τους Kohler and Milstein [108].

Εν συντομία, με τη μέθοδο αυτή συντήκεται ένα καρκινικό κύτταρο με ένα ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο. Το κύτταρο που παράγεται ονομάζεται υβρίδωμα και φέρει τις ιδιότητες του καρκινικού κυττάρου για συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις (αθανασία) και την ιδιότητα του Β-λεμφοκυττάρου για την παραγωγή ενός και μόνο ειδικού αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα σημείωσαν ραγδαία ανάπτυξη όσον αφορά την παραγωγή και τη χρήση τους. Στις μέρες μας χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιολογική έρευνα, την εργαστηριακή διάγνωση καθώς και την κλινική πράξη.

Ιδιαίτερη είναι η συμβολή των μονοκλωνικών αντισωμάτων στη θεραπεία του καρκίνου, τόσο σε πρωτογενείς όγκους όσο και στη καταπολέμηση των μεταστάσεων. Χρησιμοποιούνται είτε ως 'γυμνά' αντισώματα, δηλαδή χωρίς καμία προσθήκη στο μόριο τους, είτε συζευγμένα με ένα χημειοθεραπευτικό μόριο, ραδιενεργό σωματίο ή τοξίνη. Στην τελευταία περίπτωση το μονοκλωνικό αντίσωμα δρα ως εξειδικευμένος φορέας, όπου παραδίδει το συζευγμένο μόριο στο καρκινικό κύτταρο-στόχο.

## **Δ.2. Το Μονοκλωνικό Αντίσωμα mAb 4C5**

Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4C5 παράχθηκε ύστερα από ανοσοποίηση ποντικών Balb/c με μεμβρανικό κλάσμα εγκεφάλων επίμυων εμβρυϊκής ηλικίας 15 ημερών (E15). Η πρωτεΐνη που αναγνώριζε το mAb 4C5 ονομάστηκε αρχικά αντιγόνο 4C5. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για μια περιφερική πρωτεΐνη, χαλαρά συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη η οποία αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 94 kDa, περιέχει λίγους ή καθόλου δισουλφιδικούς δεσμούς και δεν είναι γλυκοζυλιωμένη [109]. Μελέτη του αντιγόνου 4C5 στο Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα επίμυος κατά την ανάπτυξη του, έδειξε ότι το μόριο αυτό εκφράζεται σε νευρώνες και Schwann κύτταρα, αντίστοιχα. Επιπλέον, είχε δειχθεί πως το αντιγόνο 4C5 εμπλέκεται σε μεταναστευτικές διεργασίες κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου και της παρεγκεφαλίδας [110,111,112].

Στη συνέχεια, οι Sidera *et al.* χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας ταυτοποίησαν το αντιγόνο 4C5 ως την πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90 (HSP90). Στην ίδια εργασία με πειράματα ανοσοκατακρύμνισης διαφάνηκε πως το mAb 4C5 αντιδρά με την HSP90 άλφα και σε μικρότερο βαθμό με την HSP90 βήτα [113]. Σε επόμενη εργασία αποδείχτηκε πως το mAb 4c5 στερείται της τυπικής δομής των IgGs αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το mAb 4c5 αποτελείται μόνο από το διμερές της κάπα ελαφριάς αλυσιδάς (kappa light chain) με μοριακό βάρος 25 kDa [114].

Λειτουργικές μελέτες έδειξαν πως το mAb 4C5 δεν ενδοκυττώνεται τόσο σε κύτταρα μελανώματος ποντικού (B16 F10) όσο και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB453), αλλά παραμένει προσδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια [115,116]. Το γεγονός αυτό, το καθιστά ένα πολύ καλό εργαλείο για λειτουργικές μελέτες.

Σε πειράματα *in vitro* κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης, το mAb 4C5, μέσω της λειτουργικής παρεμπόδισης της επιφανειακής HSP90, έχει αποδειχτεί πως μειώνει σημαντικά την μετανάστευση και διήθηση καρκινικών κυττάρων μελανώματος ποντικού και ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού (MDA-MB 453) [115,116]. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης του mAb 4C5 στα φαινόμενα αυτά και σε κύτταρα μαστού MDA-MB 453 φαίνεται να περιλαμβάνει την αναστολή της αλληλεπίδρασης της HSP90 με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία του να σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τον HER-3, με επακόλουθο τη μείωση μεταγωγής σήματος μέσω των MAP και PI3K-Akt κινασών. Η αναστολή της αναδιάταξης του κυτταροσκελετού μετά από επίδραση στα κύτταρα με mAb 4C5 επιβεβαίωσε τις παρατηρήσεις για την ανασταλτική δράση του mAb 4C5 στα φαινόμενα κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης [116].

Τα *in vitro* πειράματα αναφορικά με την αντι-μεταστατική δράση του mAb 4C5 επιβεβαιώθηκαν με *in vivo* πειράματα σε ποντίκια. Σε δύο παράλληλες μελέτες, χορηγήθηκαν στην ουραία φλέβα των ποντικών κύτταρα μελανώματος B12F10. Τα ζώα λάμβαναν είτε mAb 4C5 είτε μη ειδικό αντίσωμα. Στη μία μελέτη μετρήθηκε ο χρόνος επιβίωσης των ποντικών, ο οποίος εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένος στα ποντίκια που χορηγήθηκε mAb 4C5, ενώ στην άλλη έγινε καταμέτρηση των μεταστατικών οζιδίων στον πνεύμονα κατά την ημέρα του πρώτου θανάτου. Τα ζώα που έλαβαν mAb 4c5 παρουσίασαν σαφώς υποπολλαπλάσιο αριθμό μεταστατικών οζιδίων σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες [115].

## ΣΚΟΠΟΣ

Η οικογένεια των Συνοδών και Συν-συνοδών μορίων συμμετέχει στη σταθεροποίηση, τη σωστή αναδίπλωση και ενεργοποίηση μιας πλειάδας πρωτεϊνικών κινασών. Τόσο οι Συνοδές πρωτεΐνες όσο και οι πρωτεϊνικές κινάσες συμμετέχουν σε καθοριστικές για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική αύξηση, η απόπτωση και η κυτταρική μετανάστευση. Η απορύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών καθώς και μελών της οικογένειας των Συνοδών και Συν-συνοδών πρωτεϊνών εμφανίζονται κατά την καρκινογένεση και ως εκ τούτου η λειτουργική αναχαίτιση τους αποτελεί στόχο πολλών χημικοθεραπευτικών φαρμάκων. Προσφάτως από το εργαστήριο μας έχει δειχθεί πως η Hsp90, βασικό μέλος της οικογένειας των Συνοδών πρωτεϊνών εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια καρκινικών κυττάρων, όπου αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα κινασών τυροσίνης HER-2. Η λειτουργική αναχαίτιση της Επιφανειακής Hsp90 από το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4C5, αποκάλυψε πως ο HER-2 χρειάζεται τη συνοδεία της επιφανειακής Hsp90 για το ομοδιμερισμό του καθώς και τον ετεροδιμερισμό του με τον HER-3. Η αναχαίτιση της επιφανειακής Hsp90, επιπλέον μειώνει τη μεταγωγή σήματος μέσω των μονοπατιών MAPK και Akt. Αποτέλεσμα των γεγονότων αυτών είναι η μείωση της μεταναστευτικής και διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, καθώς και η μείωση των σχηματιζόμενων όγκων και μεταστατικών εστιών *in vivo*.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν καταρχήν να μελετηθεί η πιθανή παρουσία του κυριότερου Συν-συνοδού μορίου της Hsp90, η Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια σε κυτταρικές σειρές όπου προηγουμένως είχε εντοπιστεί η Hsp90, και η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της με την επιφανειακή Hsp90 κατά αναλογία με τις ενδοκυτταρικές μορφές των Συνοδών Πρωτεϊνών. Σε αντιστοιχία με τον ενδοκυτταρικό μηχανισμό δράσης των Συνοδών και Συν-συνοδών μορίων, όπου με το σχηματισμό πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων με κινάσες (π.χ. Cdc37-Hsp90-Cdk4 και Cdc37- Hsp90-Raf1) ρυθμίζουν τη δράση των τελευταίων, η παρούσα διατριβή σκοπό είχε να μελετήσει το σχηματισμό παρόμοιων συμπλόκων με τους Υποδοχείς Κινάσης Τυροσίνης στη κυτταρική επιφάνεια καθώς και την αποσαφήνιση του ρυθμιστικού ρόλου τους στη λειτουργία των Υποδοχέων Κινάσης Τυροσίνης.

Δεύτερος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της λειτουργικής αναχαίτισης των συμπλόκων αυτών με τη χρήση τόσο του μονοκλωνικού αντισώματος mAb 4C5 έναντι της Hsp90 όσο και εμπορικών αντισωμάτων έναντι της Cdc37, σε βιοχημικό επίπεδο.

Τρίτος στόχος ήταν η αναχαίτιση των αλληλεπιδράσεων αυτών να μελετηθεί περαιτέρω σε λειτουργικά πειράματα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων *in vitro*, ενώ ταυτόχρονα να διερευνηθούν και άλλα πιθανά μόρια-στόχοι της εξωκυττάριας Hsp90 που εμπλέκονται δευτερογενώς στη λειτουργία των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης MMP-2 και MMP-9.

Τέταρτος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί *in vivo* με τη χρήση πειραματόζωων (ποντίκια) ο ρόλος της επιφανειακής HSP90 σε μεταστατικά φαινόμενα.

Τελευταίος στόχος ήταν η μελέτη του φυτικού εκχυλίσματος σταφυλιού στην αναχαίτιση του μηχανισμού δράσης των Συνοδών πρωτεϊνών.

## II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### A. ΥΛΙΚΑ

#### A.1. Αντιδραστήρια

Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Όπου χρειαζόταν ακολουθούσε υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 20 min υπό πίεση 15 lb/in<sup>2</sup> ή φιλτράρισμα μέσα από φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 μm-0,8 μm (Sterile Acrodisc).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού (BDH, SIGMA, BIORAD, MERCK, PROMEGA) καθώς και χημικά υψηλής καθαρότητας.
- Στις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες αναφοράς χαμηλού μοριακού βάρους Low Calibration Kit for SDS electrophoresis (AMERSHAM) και οι πρωτεΐνες αναφοράς υψηλού μοριακού βάρους Page Ruler Prestain Protein Ladder (FERMENTAS).
- Για την κυτταρική κλασμάτωση χρησιμοποιήθηκε η συστηματοποιημένη μέθοδος Compartmental Protein Extraction kit της CHEMICON.
- Ως θρεπτικά μέσα για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά από GIBCO: DMEM, RPMI, F-12 (HAM) και ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) απενεργοποιημένος στους 56<sup>0</sup> C για 30min.
- Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) από SIGMA.
- Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες ήταν πενικιλίνη/στρεπταβιδίνη (SIGMA) και καραμυσίνη (ABBOT).
- Triton-X-100 (FLUKA)
- Παραφορμαλδεΐδη (MERCK)
- Coomassie brilliant blue (SIGMA)
- Πολυ-L-λυσίνη (SIGMA)
- Για τις ανοσοκατακρημνίσεις χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνη G (AMERSHAM)
- Ακετόνη
- Αλκόολη 99<sup>o</sup>

- Φίλμ τύπου: X-Ray X-Omat AR της Kodak
- Για την εμφάνιση των φιλμ χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκαν εμφανιστικό υγρό Polymax T Developer και μονιμοποιητικό υγρό Polymax T Fixer (Kodak).

## **A.2. Αναλώσιμα**

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) από GREINER
- Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου ή πολυστυρενίου των 15 και 50 ml (FALCON)
- Πλαστικοί σωλήνες 1.5 ml (ependorf) της GREINER
- Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών NUNC
- Φιάσκες κυττάρων 25 cm<sup>2</sup> και 75 cm<sup>2</sup> από CORNING
- Πλάκες 6, 48 και 96 φρεατίων (6-well, 48-well, 96-well plates) για κυτταροκαλλιέργειες από COSTAR
- Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.2-0.8 και 0.45 μm από GELMAN
- Μεμβράνες διαπίδωσης από Spectrum και φίλτρα συμπύκνωσης από AMICON
- Χαρτί διήθησης 1MM από WHATMANN
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για τη μεταφορά πρωτεϊνών τύπου Hybond C (AMERSHAM)
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης από SARSTEDT
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί ξύστες της COSTAR
- Κρυοπροστατευτικοί σωλήνες 1.5ml της NUNC
- Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer για την καταμέτρηση κυττάρων θηλαστικών
- Όλα τα γυαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα

## **A.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής μικροσκόπια: ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο κυτταροκαλλιέργειας ZEISS IDO2, μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS AxioPhot, ανάστροφο μικροσκόπιο Leica DMIL, συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal) Leica TCS SP με Laser HeNe και Argon.

Για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε επωαστήρας Heraeus B5060 EK/CO<sub>2</sub>.

Για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II της BIORAD και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη η συσκευή Mini Trans-Blot της BIORAD.



Χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Eppendorf 5410, Sorvall RC5C Plus (κεφαλές: GS3, SLA 1500, SS34) και Beckman GPR.

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο PERKIN ELMER Lambda Bio10.

#### **A.4. Αντισώματα**

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού mAb 4C5  
Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSP90 έχει παραχθεί σε ποντίκια Balb/c μετά από ανοσοποίηση με μεμβράνες εγκεφάλων επιμύων εμβρυϊκής ηλικίας 15 ημερών.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών IgGs ποντικού, αρουραίου, κουνελιού και κατσίκας (AMERSHAM).
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της πρωτεΐνης θερμικού σοκ HSP90α /HSP86 και HSP90β/HSP84 (CHEMICON).
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της ανθρώπινης ακτίνης (CELL SIGNALLING).
- Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι επιτόπων στην εξωκυττάρια (Neu 9G6: sc-08) και κυτταροπλασματική περιοχή του ανθρώπινου HER-2/neu (Neu F11:sc-7301), πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι επιτόπου στην κυτταροπλασματική περιοχή του ανθρώπινου HER-2/neu (Neu C-18: sc-284)) από CELL SIGNALLING.
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της εξωκυττάριας περιοχής του EGFR από πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι ολικών και των φωσφορυλομένων μορφών των κινασών MEK, Akt και ERK 1/2.
- Πολυκλωνικά αντισώματα κατσίκας έναντι της Cdc37 από Santa Cruz.
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της Cdc37 από ABCAM.
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού και μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της Cdc37, ευγενική προσφορά Δρ. Νικόλαου Γραμματικάκη.
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού και μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της HSP70, ευγενική προσφορά Δρ. Νικόλαου Γραμματικάκη.

## A.5. Κυτταρικές σειρές

Τα υβριδικά κύτταρα τα οποία παράγουν το μονοκλωνικό αντίσωμα 4C5 (mAb 4C5) προήλθαν από σύντηξη Β-λεμφοκυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από σπλήνα Balb/c ποντικών ανοσοποιημένων με το αντίστοιχο αντιγόνο.

Αρχικά τα κύτταρα του υβριδώματος καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*: DMEM) με 10% FBS και αντιβιοτικό καραμυσίνη. Αφού οι καλλιέργειες των κυττάρων αποκτήσουν την απαιτούμενη πυκνότητα ( $10^6$  κύτταρα/ml), συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στα 500 g για 10 min σε φυγόκεντρο κυττάρων τύπου Beckman. Το ίζημα απ' αυτή τη φυγοκέντρηση περιέχει τα κύτταρα του υβριδώματος και επαναδιαλύεται σε υλικό καλλιέργειας απουσία ορού. Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργούνται για 36 ώρες σε υλικό καλλιέργειας απουσία ορού ώστε να μην πολλαπλασιάζονται. Το υπερκείμενο που συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση της παραπάνω καλλιέργειας περιέχει το εκκρινόμενο από τα κύτταρα του υβριδώματος μονοκλωνικό αντίσωμα, mAb 4C5.

Για τα λειτουργικά πειράματα που αφορούσαν τη διαλεύκανση πιθανής αλληλεπίδρασης της επιφανειακής πρωτεΐνης Cdc37 με τον υποδοχέα HER-2 (ErbB-2), χρησιμοποιήθηκε η MDA MB 453 κυτταρική σειρά από ανθρώπινο καρκίνο στήθους, η οποία έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα. Για τη διαλεύκανση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Cdc37 με τον EGFR χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MDA-MB 231 στην οποία ο υποδοχέας εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Η MDA MB 453 σειρά καλλιεργείται σε RPMI με 10% FBS και η MDA-MB 231 σε DMEM με 10% FBS. Η μη καρκινική σειρά MCF12A από ανθρώπινο μαστό καλλιεργείται σε μείγμα DMEM και F12 σε αναλογία 1:1, 10% FBS και προσθήκη 20ng/ ml EGF, 0.01 mg/ml ινσουλίνη βοός, 0,5 μg/ml υδροκορτιζόνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε επωαστήρα σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> και κορεσμένη ατμόσφαιρα υγρασίας. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων και την αποκόλληση τους από τις φλάσκες καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη από τη Gibco BRL καθώς και αποστειρωμένη ξύστρα μιας χρήσης.

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C καθώς και σε υγρό άζωτο, σε θρεπτικό μέσο RPMI παρουσία 30% ορού και 10% διμεθυσουλφοξειδίου (DMSO).

## A.6. Πειραματόζωα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια σειράς SCID. Τα πειραματόζωα προέρχονται από το τμήμα Αναπαραγωγής Πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Ε.Ι.Π.). Τα ζώα μεγαλώνουν υπό την παρουσία σταθερού τεχνητού φωτισμού και σταθερής θερμοκρασίας 23°C. Χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια ηλικίας 6 έως 8 εβδομάδων.

## A.7. Διαλύματα

### A.7.1. Ρυθμιστικά διαλύματα

10X PBS pH 7.4	
NaCl	140mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O)	8mM
KCl	3mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM

10X TBS pH 7.4	
Tris	50mM
NaCl	150mM

### A.7.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30%	
Ακρυλαμίδιο	29.2% κ.β.
N,N-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο	0.8% κ.β.

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 12% (10 ml)	
ddH <sub>2</sub> O	3.3 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	100 μl
Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%)	4 ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS)	100μl
TEMED	4μl

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 8% (10 ml)	
ddH <sub>2</sub> O	4.6 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.6 ml
10% SDS	100 μl
Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%)	1.7 ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS)	100μl
TEMED	4μl

**Πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) (10 ml)**

ddH <sub>2</sub> O	6.6 ml
1M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	100 μl
Διάλυμα ακρυλαμιδίου (30%)	1.7 ml
Υπερθειϊκό αμμώνιο (APS)	100μl
TEMED	4μl

**Διάλυμα ηλεκροδίων (electrode buffer)**

Γλυκίνη	0.192M
1M Tris-HCl (pH 8.4)	0.025 Ml
SDS	0.1 κ.β.

**Διάλυμα δείγματος (loading buffer) (3X)**

SDS	10% κ.β.
Tris-HCl (pH 6.8)	0.12M
β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT	10% κ.ο. 1.234% κ.β.
Γλυκερόλη	20% κ.ο.
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0.05% κ.β.

**Πρωτεΐνες αναφοράς χαμηλού  
μοριακού βάρους (LMW markers)**

Φωσφορυλάση b	97kDa
Αλβουμίνη	66kDa
Οβαλβουμίνη	45kDa
Καρβονική ανυδράση	30kDa
Αναστολέας της τρυψίνης	20kDa
α-λακταλβουμίνη	14kDa

**Διάλυμα χρώσης (stain gel)**

Ισοπροπανόλη	25%
Οξικό οξύ	10% κ.ο.
Coomassie brilliant blue R-250	0.06% κ.β.

**Διάλυμα αποχρωματισμού (destain gel)**

Ισοπροπανόλη	5%
Οξικό οξύ	10% κ.ο.

<b>Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Western blot) *</b>	
--	--

Γλυκίνη	192mM
Tris	25mM
Μεθανόλη	20% κ.ο.

\* Το pH του παραπάνω διαλύματος ρυθμίζεται με τη χρήση HCl σε 8.3.

### A.7.3. Διαλύματα χρώσης των πρωτεϊνικών στυπωμάτων

<b>Διάλυμα Ponceau S</b>	
--------------------------	--

Ponceau S	0.2% κ.β.
TCA (τριχλωροοφικό οξύ)	3% κ.β.

<b>Διάλυμα αποχρωματισμού</b>	
-------------------------------	--

TBS, pH 7.4	1X
-------------	----

<b>Διάλυμα 3',3',Διαμινοβενζιδίνης (3',3', Diaminobenzidine, DAB)</b>	
---	--

DAB	0.03%
NiCl <sub>2</sub>	0.03%
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε TBS 1X	0.03%

### A.7.4. Διαλύματα κυτταρικής λύσης

<b>Διάλυμα λύσης (lysis buffer) για απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών</b>	
---	--

Tris-HCl pH 7.4	20mM
NaCl	137mM
HEPES	50mM
PMSF	0.5mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%
EDTA	5mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	200μM

<b>Αναστολείς πρωτεασών (10X)</b>	
-----------------------------------	--

leupeptin	50μg/ml
pepsatin	50μg/ml
aprotinin	50μg/ml
EDTA	10mM

## **B. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1. Βιοχημικές Τεχνικές**

#### **B.1.1. Παρασκευή Ομογενοποιήματος από Εμβρυϊκό Εγκέφαλο Επιμύος**

Τα ομογενοποιήματα από εγκέφαλο επιμύων εμβρυϊκής ηλικίας 18 ημερών (E18), χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της λειτουργικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος 4C5 με ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών. Επιπλέον αποτέλεσαν το υλικό για τα πειράματα καθορισμού της αμινοξικής αλληλουχίας του αντιγόνου 4C5.

#### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Οι ιστοί συλλέγονται, ζυγίζονται και ακολούθως ομογενοποιούνται σε ομογενοποιητή Dounce με 10 όγκους διαλύματος TBS. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 500 g για 10 min και το υπερκείμενο επωάζεται με NaCl 5M, ώστε η τελική συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα να είναι 1 M. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 1500 g. Το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρωσης φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  αφού πρώτα γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry [117].

#### **B.1.2. Συμπύκνωση του Μονοκλωνικού Αντισώματος 4C5**

#### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Το υπερκείμενο από την καλλιέργεια των κυττάρων του υβριδώματος σε υλικό απουσία ορού, συλλέγεται και στη συνέχεια συμπυκνώνεται σε συσκευή συμπύκνωσης Amicon, με τη χρήση μεμβράνης PM10 της Amicon, η οποία επιτρέπει τη διέλευση μορίων με μοριακό βάρος μικρότερο των 10 kDa. Έτσι, το αντίσωμα παραμένει στο υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο και συμπυκνώνεται 100 φορές. Μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί αλλαγή του διαλυτικού μέσου του αντισώματος με τη μέθοδο της διαπίδυσης σε διάλυμα PBS

#### **B.1.3. Αλλαγή του Διαλυτικού Μέσου με Διαπίδυση**

Το συμπυκνωμένο αντίσωμα υπόκειται σε αλλαγή του διαλυτικού μέσου με διαπίδυση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικές μεμβράνες διαπίδυσης (Spectrapore), μέσα στις οποίες εγκλείεται το διάλυμα του αντισώματος. Οι μεμβράνες τοποθετούνται μέσα σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει δύο λίτρα διαλύματος PBS (pH 7.4) και αφήνονται υπό συνεχή ανάδευση για 24

ώρες στους 4<sup>0</sup>C. Ακολουθεί ανανέωση του διαλύματος διαπίδυσης με φρέσκο διάλυμα και οι μεμβράνες αφήνονται για άλλες 24ώρες.

#### **B.1.4. Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Κάθετο Πήκτωμα Πολυ-Ακρυλαμίδης Παρουσία Θεϊκού Δωδεκυλικού Νατρίου (SDS-PAGE)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος, έχει περιγραφεί από τον Laemmli [118] και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η χρήση του θεϊκού δωδεκυλικού νατρίου (SDS) συντελεί στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στη δέσμευση αρνητικά φορτισμένων θεϊκών δωδεκυλικών ιόντων σε ανάλογη ποσότητα κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία φορτίζεται αρνητικά. Επειδή η ποσότητα του SDS που δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες είναι σταθερή (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης), η κινητικότητα των πρωτεϊνών παρουσία ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος. Επιπλέον, η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του πήκτωματος, το οποίο ρυθμίζεται με τη μεταβολή της περιεκτικότητας του σε ακρυλαμίδη. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες, οι οποίες εξασφαλίζονται από την παρουσία στο διάλυμα των δειγμάτων (sample buffer), SDS και διθειοθρεϊτόλης (DTT) η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Ως πήκτωμα συμπύκνωσης (Stacking), το οποίο επιβραδύνει τη μετακίνηση των πρωτεϊνών προς το θετικό πόλο ώστε να μουν όλες ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού (Resolving), χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 4%.

##### *ΠΡΟΠΕΙΑ:*

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμιγνύονται με 3:1 όγκο διαλύματος δειγμάτων, φυγοκεντρούνται σε μικροφυγόκεντρο στις 13.000 rpm/3 min και βράζονται στους 100<sup>0</sup> C για 3 min. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με σταθερή τάση 200 Volt για περίπου 45 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μπορεί να κατεργαστεί με έναν από τους ακόλουθους τρόπους ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος:

#### **B.1.4.1. Εμφάνιση των πρωτεϊνικών στυπωμάτων με χρήση διαλύματος χρώσης (Coomassie) και αποχρωματισμού (Destain)**

Η χρώση Coomassie blue είναι η πιο κοινή χρώση για πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου και έχει διακριτικότητα μέχρι 100 ng.

##### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Το πήκτωμα επωάζεται με το διάλυμα χρώσης για 30 min στους 37<sup>0</sup>C. Ακολούθως μεταφέρεται σε αποχρωστικό διάλυμα για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου οπότε γίνονται ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες.

#### **B.1.4.2. Ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για ανοσοαποτύπωμα**

Όπως αναφέρεται πιο κάτω παράγραφος B.3. Ανοσοβιολογικές τεχνικές.

#### **B.2. Δοκιμασία Μετανάστευσης σε Καλλιέργειες Καρκινικών Κυττάρων**

##### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Η μελέτη των μεταναστευτικών κινήσεων σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων MDAMB453 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Meintanis et al, 2001 [119]. Αρχικά τα κύτταρα επιστρώνονται σε στρογγυλές καλυπτρίδες σε πυκνότητα 10<sup>5</sup> κύτταρα ανά φρεάτιο και παραμένουν στην καλλιέργεια για 24 ώρες χωρίς καμία αλλαγή των συνθηκών ή/και χειρισμών, ώστε να δημιουργήσουν μια ομοιογενή στοιβάδα κυττάρων. Στη συνέχεια το υλικό αντικαθίσταται με φρέσκο υλικό χωρίς ορό και μετά από 16 ώρες με τη βοήθεια ενός ακρορυγχίου δημιουργείται μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων και πλάτους περίπου ενός χιλιοστού. Αμέσως μετά (χρόνος μηδέν), το υλικό καλλιέργειας αντικαθίσταται με φρέσκο υλικό (υλικό μάρτυρας) ή υλικό στο οποίο συμπεριλαμβάνονται τα προς μελέτη μόρια. Τα κύτταρα που βρίσκονται εκατέρωθεν της κενής περιοχής αφήνονται να μεταναστεύσουν μέσα σ' αυτήν για ορισμένο χρόνο. Με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου Leica DM IL και ψηφιακής κάμερας Leica DC100 συνδεδεμένης με ηλεκτρονικό υπολογιστή, λαμβάνονται φωτογραφίες των καλλιερειών σε χρόνο μηδέν, ενδιάμεσους χρόνους και τελικό χρόνο. Η μέτρησης της διανυόμενης από τα MDAMB453 κύτταρα απόστασης, γίνεται με τη βοήθεια του



λογισμικού ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus και υπολογίζεται ως η διαφορά του μέσου πλάτους της κενής περιοχής στον τελικό χρόνο από το μέσο πλάτος της αντίστοιχης περιοχής στο χρόνο μηδέν. Μετά το τέλος της δοκιμασίας μετανάστευσης, ακολούθησε μονιμοποίηση και χρώση των καλλιέργειών για την παρατήρηση των ινιδίων ακτίνης.

### **B.2.1. Λύση Κυττάρων**

#### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Το υπερκείμενο από τις καλλιέργειες απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με παγωμένο PBS.

Τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο των φρεατίων με τη βοήθεια αποστειρωμένων πλαστικών ξύστων και μαζεύονται με PBS.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα κυτταρικής λύσης και αφήνεται στον πάγο για 20 λεπτά.

Ακολουθεί δυνατή ανάδευση (vortex) και πέρασμα των κυττάρων από βελόνα σύριγγας ώστε να σπάσουν καλά.

Φυγοκέντρηση στα 12 000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης φυλάσσεται στους -20 °C αφού πρώτα γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

### **B.3. Ανοσοβιολογικές Τεχνικές**

#### **B.3.1. Ηλεκτροφορητική Μεταφορά Πρωτεϊνών σε Φίλτρο Νιτροκυτταρίνης και Ανοσοαποτύπωμα**

Η συγκεκριμένη μέθοδος συνίσταται στη μεταφορά και σταθερή πρόσδεση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης των πρωτεϊνών που έχουν ήδη διαχωριστεί σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ώστε να γίνει ανίχνευση τους με τη βοήθεια των κατάλληλων αντισωμάτων. Η νιτροκυτταρίνη επιτρέπει στις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες να διατηρούν την αντιγονικότητά τους, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση των κατάλληλων αντισωμάτων και η ανίχνευση τους με κατάλληλους ιχνηθέτες.

## *ΠΟΡΕΙΑ:*

### ***1. Μεταφορά πρωτεϊνών***

Ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης (Hybond-C, Amersham) και δύο κομμάτια χαρτιού Whatmann 3MM κόβονται σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από το πήκτωμα και εμβαπτίζονται στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα. Επάνω στη πλάκα της συσκευής που θα εφαρμοσθεί ο θετικός πόλος τοποθετούνται τα εξής: ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM, η νιτροκυτταρίνη, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (χωρίς να εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα), ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM και τέλος, η πλάκα της συσκευής που θα εφαρμοσθεί ο αρνητικός πόλος. Η ηλεκτρική μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στους 4 °C, με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA. Η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών. Για πρωτεΐνες M.B. 10-100 kDa μία ώρα ηλεκτρομεταφοράς είναι αρκετή. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται με χρώση της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S. Με νυστέρι απομακρύνεται η διαδρομή του μίγματος πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο αποχρωματισμός της νιτροκυτταρίνης γίνεται με διάλυμα 1X TBS.

### ***2. Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος***

Η νιτροκυτταρίνη επώαζεται με 5 % κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα σε 1X TBS, για 30 min στους 37°C. Με τη διαδικασία αυτή, παρεμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της νιτροκυτταρίνης με πρώτο αντίσωμα έναντι του υπό ανίχνευση αντιγόνου στους 4 °C, για 16 ώρες υπό συνεχή και σιγανή ανάδευση. Το αντίσωμα αραιώνεται σε 2.5 % λυοφιλιωμένο γάλα σε 1X TBS. Πραγματοποιούνται 3 πλυσίματα των 10 λεπτών με 0.3 % αλβουμίνη από ορό βοός (*Bovine Serum Albumin*: BSA) σε TBS, ή εναλλακτικά με 2.5 % γάλα σε TBS. Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης με κατάλληλο δεύτερο αντί-αντίσωμα σε 2.5 % γάλα σε TBS, για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Το δεύτερο αντί-αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση. Η ενζυμική δράση της υπεροξειδάσης ανιχνεύεται είτε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 0.003 % κ.β. διαμινοβενζιδίνη (DAB) παρουσία 0.003 % κ.β. NiCl<sub>2</sub> (ενίσχυση σήματος) και 0.003 % κ.ο. 30 % διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που δρα ως καταλύτης της αντίδρασης, είτε για μεγαλύτερη ευαισθησία με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

### **B.3.2. Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)**

Ανοσοκαθίζηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία πεπτίδια ή πρωτεΐνες οι οποίες αντιδρούν ειδικά με κάποιο αντίσωμα, μπορούν να απομονωθούν από κάποιο διάλυμα. Τα συμπλέγματα αντιγόνου αντισώματος που σχηματίζονται απομονώνονται από το διάλυμα με την προσθήκη ακινητοποιημένης πρωτεΐνης (σε σεφαρόζη ή αγαρόζη) A ή G, οι οποίες είναι βακτηριακές πρωτεΐνες ικανές να δεσμεύουν αντισώματα στην Fc περιοχή.

#### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Το υλικό στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ανοσοκαθίζηση (π.χ. προϊόν από λύση κυττάρων), επώαζεται σε πρώτη φάση με σφαιρίδια ακινητοποιημένης πρωτεΐνης A, για 2-3 ώρες με μη μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθούν από το διάλυμα πεπτίδια ή πρωτεΐνες οι οποίες δένονται μη ειδικά στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A.

Αφού απομακρυνθούν τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A με τους μη ειδικούς προσδέτες, το διάλυμα επώαζεται με αντίσωμα με μη μαγνητική ανάδευση για 16 ώρες στους 4 °C.

Την επόμενη μέρα προστίθενται τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A στο μίγμα και ακολουθεί επώαση με μη μαγνητική ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλυσίματα με διάλυμα πλυσίματος και προσθήκη SDS-loading buffer.

Η ανάλυση των ανοσοσυμπλεγμάτων γίνεται με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωμα.

### **B.4. Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές**

Με τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές μπορεί να γίνει δυνατός ο εντοπισμός της θέσης και της κατανομής μιας πρωτεΐνης με τη βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος, σε ιστούς και σε καλλιέργειες κυττάρων. Ο εντοπισμός γίνεται έπειτα από πρόσδεση στο αντίσωμα αντι-αντισώματος το οποίο είναι συνδεδεμένο με έναν ιχνηθέτη ο οποίος μπορεί να είναι ένα φθορίζον μόριο ή το ένζυμο υπεροξειδάση.

#### **B.4.1. Χρώση Ανοσοφθορισμού**

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοϊστοχημική εντόπιση αντιγόνων σε MDAMB453, MDAMB231 και κυτταρικές σειρές από καρκίνο μαστού.

## **B.4.2. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός**

### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Η πορεία της μεθόδου είναι όμοια με την ανοσοϊστοχημική χρώση υπεροξειδάσης, με τη διαφορά ότι το αντι-αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα χρωστική η οποία μπορεί να παρατηρηθεί απευθείας σε μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από πρόσπτωση κατάλληλου μήκους κύματος ακτινοβολίας στο παρασκεύασμα.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση κατανομής δύο ή και περισσότερων αντιγόνων στο ίδιο παρασκεύασμα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αντι-αντισωμάτων διαφορετικών ειδικοτήτων (π.χ. αντισώματα έναντι αντιγόνων ποντικού και αντισώματα έναντι αντιγόνων κουνελιού ή αρουραίου κ.λ.π.) συνδεδεμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές.

### **B.4.2.1. Ανοσοφθορισμός σε ζωντανά (live) κύτταρα**

Με τη μέθοδο αυτή, γίνεται ανίχνευση αντιγόνων κυτταρικής επιφανείας σε ζωντανά, μη μονιμοποιημένα κύτταρα, τα οποία σημαίνονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Αντιγόνα τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων δεν ανιχνεύονται διότι το πρώτο αντίσωμα έχει πρόσβαση μόνο στην επιφάνεια των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της έκφρασης των πρωτεϊνών HSP90α, HSP90β, Cdc37, HSP70, EGFR και HER-2 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων MDA MB 453, MDA MB 231 χρησιμοποιώντας το mAb 4C5 και τα πολυκλωνικά αντισώματα εμπορίου έναντι των δύο ισομορφών της HSP90 (αντι-HSP90α και αντι-HSP90β), τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της Cdc37, του EGFR και του HER-2.

### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Ζωντανά κύτταρα επιστρωμένα σε καλυπτρίδες σε πλάκα Costar 48 φρεατίων, επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είναι διαλυμένο σε υλικό καλλιέργειας, για 2 ώρες στον επωαστήρα κυττάρων. Ακολουθούν προσεκτικό πλύσιμο με υλικό καλλιέργειας και μονιμοποίηση των κυττάρων με παγωμένη ακετόνη για 3 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία για 2 ώρες σε θερμοκρασία

δωματίου. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες με μια σταγόνα CITIFLUOR και τα κύτταρα παρατηρούνται σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

### **B.4.3. Ιστοχημική χρώση ιστών με Αιματοξυλίνη - Εωσίνη**

Η μέθοδος αυτή είναι ίσως η πιο διαδομένη στη χρώση ιστολογικών δειγμάτων, για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και αξιολόγηση. Αποτελεί βασικό εργαλείο τόσο στην έρευνα όσο και στην διαγνωστική πρακτική( χρώση βιοψιών) Βασίζεται στο γεγονός ότι οι οξиноι πυρήνες των κυττάρων βάφονται μπλε από την βασική αιματοξυλίνη ενώ τα υπόλοιπα βασικά κυτταρικά οργανίδια (κυρίως κυτταρόπλασμα) σε αποχρώσεις του κόκκινου και του πορτοκαλί χρώματος, από την όξινη Εωσίνη.

#### *ΠΟΡΕΙΑ:*

- Αποπαραφίνωση σε 3 διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης ( 3 x 5 λεπτά)
- Ενυδάτωση
  - Αιθανόλη 100% (3 λεπτά)
  - Αιθανόλη 100% (3 λεπτά )
  - Αιθανόλη 95% (3 λεπτά )
  - Αιθανόλη 95% (3 λεπτά)
  - Αιθανόλη 70% (3 λεπτά)
- Ξέπλυμα σε δις-απεσταγμένο νερό (5 λεπτά)
- Χρώση με αιματοξυλίνη (6 λεπτά)
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης (20 λεπτά)
- Αποχρωματισμός σε όξινη αλκοόλη (0,25% οξικό οξύ-95% αιθανόλη) (1-3 δευτερόλεπτα)
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης (5λεπτά)
- Εμβάπτιση σε γλιάρο νερό
- Χρώση με εωσίνη (15 δευτερόλεπτα)
- Αφυδάτωση
  - Αιθανόλη 95 % (3 λεπτά)
  - Αιθανόλη 95% (3 λεπτά )
  - Αιθανόλη 100% (3 λεπτά )
  - Αιθανόλη 100% (3 λεπτά)
- Ξέπλυμα σε ξυλόλη I ( 5 λεπτά)
- Ξέπλυμα σε ξυλόλη II ( 5 λεπτά)
- Μονιμοποίηση με DPX

## **B.5. Ζυμογραφίες**

Πρόκειται ουσιαστικά για συνδυασμό ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος (όπως δηλαδή η SDS-PAGE) και ανίχνευσης ενζυμικής δραστηριότητας μεταξύ των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών.

### *ΠΟΡΕΙΑ:*

Η ενζυμική δραστηριότητα που ανιχνευόταν 'οφειλόταν' στην ικανότητα αποικοδόμησης της ζελατίνης του πηγματος διαχωρισμού από τα ένζυμα του ηλεκτροφορούμενου δείγματος. Ο υπολογισμός του MB των ζελατινολυτικών πρωτεϊνών, γινόταν όπως ακριβώς περιγράφεται στην SDS-PAGE. Το πήγμα διαχωρισμού, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν περιεκτικότητας 10% σε πολυακρυλαμίδιο με αναλογία ακρυλαμίδιου/δισ-ακρυλαμίδιο 30:1 και περιείχε 1mg/ml ζελατίνη. Τα δείγματα προεπεώζονταν για 15 min στους 37°C σε ρυθμιστικό διάλυμα επεξεργασίας δειγμάτων (Laemmli sample buffer), όπως και στην SDS-PAGE, απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και στην συνέχεια υποβάλλονταν σε ηλεκτροφόρηση στα 120 V, στους 4°C. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηγματα πλένονταν 3 φορές στους 37°C (από 15 min τη φορά) με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1μM ZnCl<sub>2</sub> 0.02% NaN<sub>3</sub> και 2.5% Triton X-100, ώστε να απομακρυνθεί το SDS. Ακολουθούσε έκπλυση με σκέτο διάλυμα 1% Triton X-100 και τελικά τα πηγματα επωάζονταν για 16 έως 20 ώρες στους 37°C με διάλυμα το οποίο περιείχε 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1μM ZnCl<sub>2</sub> και 0.02%NaN<sub>3</sub>. Εν συνεχεία βάφονταν σε διάλυμα 0.25% Coomassie Blue R-250 σε 45% μεθανόλη και 9% οξικό οξύ για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε αποχρωματισμός με διάλυμα 45% μεθανόλης και 7% οξικού οξέος. Το πήγμα έπαιρνε ένα ομοιόμορφο μπλέ χρώμα λόγω δέσμευσης της χρωστικής με την ζελατίνη που είχε ακινητοποιηθεί σε αυτό κατά τον συμπολυμερισμό των συστατικών του. Στις θέσεις όπου είχαν ηλεκτροφορηθεί ένζυμα τα οποία είχαν την δυνατότητα αποικοδόμησης της ζελατίνης (ζελατινάσες), λόγω τοπικής αποικοδόμησης του υποστρώματος, εμφανίζονταν διάφανες ζώνες λύσεως της. Η εκτίμηση της έντασης των ζωνών λύσεως πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ψηφιακού σαρωτή (scanner) H/P (ScanJet 6100 C/T) και την χρήση του προγράμματος Image J.

## **B.6. *In vivo* μελέτη της μετάστασης**

### **B.6.1. Είδη ενέσεων και χειρισμοί πειραματόζωων**

Στα εν λόγω πειράματα εισάγονται καρκινικά κύτταρα, που βρίσκονται σε ελαιώδη σε στείρο PBS, στην κυκλοφορία ποντικών με ενδοφλέβια ένεση. Η ένεση πραγματοποιείται σε μία εκ των δύο πλαγίων φλεβών κοντά στην άκρη της ουράς. Για να πραγματοποιηθεί η ένεση, προϋποτίθεται ότι το ποντίκι είναι ακινητοποιημένο σε ειδική παγίδα, και όχι αναισθητοποιημένο. Το ζώο πρέπει να ζεσταθεί πριν την προσπάθεια με βύθισμα της ουράς του σε χλιαρό νερό, ώστε να διασταλεί η φλέβα. Εναλλακτικά μπορούμε να ζεστάνουμε το ζώο κοντά σε μια λάμπα, με εξαίρεση των αλβίνων ζώων, τα οποία έχουν πολύ ευαίσθητα μάτια και μπορεί να τους προκληθεί τύφλωση από το έντονο φως (112). Μετά την έξοδο της βελόνας από τη φλέβα, σταματούμε την αιμορραγία εφαρμόζοντας πίεση στο σημείο με ένα βαμβάκι ποτισμένο με αιθυλική αλκοόλη.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb4C5 καθώς και τα αντισώματα μάρτυρες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά. Για την χορήγηση στο περιτόναιο το ζώο ακινητοποιείται με χαλαρή λαβή από το σβέρκο και φέρεται σε κλίση 45 μοιρών με το κεφάλι προς τα κάτω. Η στάση αυτή αναγκάζει το λεπτό έντερο και τα λοιπά όργανα να πλησιάσουν προς το διάφραγμα, ελαχιστοποιώντας έτσι τον πιθανό τραυματισμό τους από την είσοδο της βελόνας στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Η ένεση γίνεται στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο της κοιλίας, διότι στο σημείο εκείνο υπάρχει μόνο λεπτό έντερο, το οποίο υποχωρεί εύκολα με την 45 μοιρών κλίση και δεν υπάρχει κίνδυνος τραυματισμού του. Αντίθετα στο δεξί τεταρτημόριο υπάρχει τμήμα του παχέως εντέρου (ανιόν κόλον), τμήμα του ήπατος και του σπλήνα, γεγονός που καθιστά πιο επικίνδυνες της ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις στο σημείο αυτό.

### **B.6.2. Πειραματική πορεία *in vivo* μεταστατικών μοντέλων**

Στα *in vivo* μεταστατικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές καρκινικές σειρές και μια ποικιλία ποντικών SCID. Η αξιολόγηση των μεταστάσεων έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους, ενώ τελικά αξιολογήθηκε και το ποσοστό επιβίωσης των πειραματοζώων. Πιο συγκεκριμένα, στην ποικιλία ποντικών SCID ενέθηκαν ενδοφλέβια δύο σειρές κυττάρων. Η σειρά MDA-MB 453 και η σειρά MDA-MB 231 που προέρχονται από ανθρώπινο καρκίνο του

μαστού. Οι μεταστάσεις που παρατηρούμε μετά τη χορήγηση των καρκινικών κυττάρων είναι ορατές στους πνεύμονες του ζώου.

## **Γ. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

### **Γ.1. Ανάλυση Μορίων DNA με Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης**

Μόρια DNA μεγέθους 0.1-20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0.8-2% οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη είναι αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1 X TBE , στο οποίο προστίθεται 0.5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr ενσωματώνεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και το σύμπλοκο αυτό γίνεται ορατό όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα δείγματα DNA προστίθεται ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου τους, από ειδικό διάλυμα δείγματος το οποίο αποτελείται από 40% κ.β. σακχαρόζη και 0.25% κ.β. μπλε της βρωμοφαινόλης. Η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης εξασφαλίζει την παραμονή του δείγματος στο φρεάτιο του πηκτώματος και η χρωστική χρησιμεύει σαν δείκτης μετανάστευσης. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 65°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA σχηματίζουν ζώνες οι οποίες γίνονται διακριτές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302 nm, οπότε και μπορούν να φωτογραφηθούν σε φιλμ Polaroid 667.

### **Γ.2. Απομόνωση και Καθαρισμός Τμημάτων DNA από Πηκτώματα Αγαρόζης**

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA. Αρχικά το δείγμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια κάτω από υπεριώδες φως, το οποίο κάνει ορατές τις ζώνες DNA, αποκόπτεται το τμήμα του πηκτώματος που περιέχει την προς απομόνωση ζώνη DNA.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό μορίων DNA από παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε η συστηματοποιημένη μέθοδος QIAquick Gel Extraction της QIAGEN. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η απομόνωση από πηκτώματα αγαρόζης, τμημάτων DNA από 70bp έως 10Kb και ποσότητα μέχρι 10μg. Το DNA που απομονώνεται με την μέθοδο αυτή είναι αρκετά καθαρό για να χρησιμοποιηθεί για πέψη με περιοριστικά ένζυμα και για υποκλωνοποίηση με T4 λιγάση.



### *ΠΟΡΕΙΑ:*

- Η ζώνη του DNA αφαιρείται από το πήκτωμα αγαρόζης με καθαρό νυστέρι.
- Το κομμάτι του πηκτώματος ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (αναλογία 1:3).
- Επώαση στους 50 °C μέχρι να διαλυτοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ανάδευση.
- Εφαρμογή σε στήλη QIAquick και φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο για 1 min στις 13.000 rpm.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και στη στήλη προστίθενται 0.5ml διαλύματος QG.
- Φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο για 1 min στις 13.000 rpm.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη πλένεται με φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο για 1 min στις 13.000 rpm, με 0.75ml διαλύματος PE .
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη φυγοκεντρείται σε erppendorf μικροφυγόκεντρο για 1 min στις 13.000 rpm.
- Το DNA εκλούεται με φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο για 1 min στις 13.000 rpm, με 0.5ml στείρο ddH<sub>2</sub>O.

## **Γ.3. Ενζυμική Επεξεργασία Νουκλεϊνικών Οξέων**

### **Γ.3.1. Πέψη μορίων DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία προέρχονται από μικροοργανισμούς, αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και κόβουν το DNA σπάζοντας το φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένη θέση σε κάθε αλυσίδα. Το πρότυπο πέψης του DNA με ειδικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Οι πέψεις γίνονται σε περιβάλλον (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, pH) που ευνοεί τη δράση του κάθε ενζύμου και καθορίζονται από τον προμηθευτή. Στην παρούσα εργασία, για την πέψη DNA μορίων με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα που συνοδεύουν κάθε ένζυμο.

Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1 µg DNA με 3-5 units ενζύμου σε 20µl συνολικού όγκου αντίδρασης.

### Γ.3.2. Αποφωσφορυλίωση άκρων DNA

Με τη μέθοδο αυτή απομακρύνονται οι φωσφορικές ομάδες από το 5'-άκρο μορίων DNA. Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις υποκλωνοποιήσεων που η πέψη του φορέα έκφρασης γίνεται με μόνο ένα ένζυμο, για να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του. Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης γίνεται με την αλκαλική φωσφατάση. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει την ιδιότητα να απενεργοποιείται πλήρως σε υψηλή θερμοκρασία. Το προς κλωνοποίηση DNA μόριο, συνδέεται με το αποφωσφορυλιωμένο πλασμίδιο σχηματίζοντας σε κάθε άκρο φωσφοδιεστερικό δεσμό στη μία από τις δύο αλυσίδες. Στη συνέχεια τα βακτήρια *E.coli* επιδιορθώνουν τα αποφωσφορυλιωμένα άκρα. Για τελικό όγκο αντίδρασης 100μl η αποφωσφορυλίωση πραγματοποιείται ως εξής:

Αντίδραση Αποφωσφορυλίωσης (100μl)	
DNA	20μg
10x διάλυμα ενζύμου SAP	10μl
Ένζυμο SAP	3-5 units
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι τα 100μl

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 min και απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 65°C για 10 min.

### Γ.3.3. Σύνδεση του πλασμιδίου φορέα και του προς κλωνοποίηση DNA μορίου με T4 DNA λιγάση

Η συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση τμήματος DNA σε φορέα έκφρασης. Διακρίνονται δύο περιπτώσεις:

1) Το προς κλωνοποίηση DNA μόριο και το πλασμίδιο να έχουν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα (cohesive ends). Χρειάζεται αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδίου-φορέα ειδικά αν έχουν παραχθεί με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο ώστε να αποφεύγεται η επανακυκλοποίηση του. Η αναλογία του DNA-μορίου και του πλασμιδίου-φορέα μπορεί να είναι 3:1 ή 1:1 ανάλογα με το μέγεθος των μορίων αυτών. Ο ακόλουθος τύπος υπολογίζει με ακρίβεια τα ng DNA που πρέπει να χρησιμοποιηθούν, σε συνάρτηση με το μέγεθος του, το μέγεθος του φορέα και της μοριακής τους αναλογίας.

$$\text{ng DNA} = \text{ng φορέα} \times (\text{μέγεθος DNA} / \text{μέγεθος φορέα}) \times \text{μοριακή αναλογία τμήματος DNA} / \text{φορέα}$$

### *ΠΟΡΕΙΑ:*

100-200ng γραμμικού πλασμιδιακού DNA (*linearized vector*) αναμιγνύονται με 20-80ng του προς κλωνοποίηση DNA (*insert DNA*).

Διεξάγεται η αντίδραση της λιγάσης σε τελικό όγκο 10μl προσθέτοντας διάλυμα λιγάσης μαζί με 1 unit ενζύμου T4 DNA λιγάσης.

Επίσης διεξάγονται δύο ακόμη παρόμοιες αντιδράσεις. Στην πρώτη δεν προστίθεται το DNA προς κλωνοποίηση και στη δεύτερη δεν προστίθεται λιγάση. Με την πρώτη ελέγχεται κατά πόσον έχει γίνει επανασύνδεση των άκρων του πλασμιδίου και με τη δεύτερη εάν υπάρχει άκοπο πλασμίδιο.

Ακολουθεί επώαση στους 16°C για 16 ώρες.

Τμήμα της αντίδρασης χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους.

2) Το προς κλωνοποίηση DNA-μόριο και το πλασμίδιο-φορέας να έχουν κοπεί με διαφορετικά ένζυμα, με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικά άκρα. Για να γίνει σύνδεση των τμημάτων μεταξύ τους χρειάζεται τα κολλώδη άκρα θα μετατραπούν σε 'αδρά' (*blunt ends*). Το γέμισμα των κολλώδων άκρων και η μετατροπή τους σε αδρά είναι δυνατό να γίνει εφόσον έχουν προκύψει απο το περιοριστικό ένζυμο 3'-μονόκλωνες ουρές και με τη χρήση του ενζύμου Klenow-DNA πολυμεράση που γεμίζει με συμπληρωματικά νουκλεοτίδια στην κατεύθυνση 5'-3'.

### **Γ.3.4. Καθαρισμός Προϊόντων Ενζυμικών Αντιδράσεων**

Για τον καθαρισμό προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή/και ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η συστηματικοποιημένη μέθοδος QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται δυνατός ο καθαρισμός κομματιών DNA μονής και διπλής έλικας που προέκυψαν μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή ενζυμικών αντιδράσεων.

Στην παρούσα εργασία η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού φορέα μετά την αποφωσφορυλίωση του.

#### ΠΟΡΕΙΑ:

- Προσθήκη 5 όγκων διαλύματος PB σε 1 όγκο δείγματος.
- Εφαρμογή του DNA σε κολώνα QIAquick και φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 1 min.
- Απομάκρυνση του εκλούσματος και προσθήκη 0.7ml διαλύματος PE στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 1 min.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η κολώνα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 1 min.
- Στη στήλη προστίθενται 100μl ddH<sub>2</sub>O και το DNA εκλούεται με φυγοκέντρηση σε erppendorf μικροφυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 1 min.

#### Γ.4. Καλλιέργεια *Escherichia Coli* (*E. Coli*)

Τα βακτηριακά στελέχη της *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή και τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδιακού DNA είναι το *XL-1 Blue*. Ως υλικό για την υγρή καλλιέργεια των παραπάνω στελεχών χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο υλικό καλλιέργειας Luria-Bertani Broth (LB). Για τη στερεή καλλιέργεια τους σε τρυβλία Petri συμπληρώθηκε το υλικό Bacto-Agar (Difco). Το Bacto-agar διαλύεται κατά την υγρή αποστείρωση. Πριν κρυώσει και πολυμεριστεί, στους 45-55°C, προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα με το πλασμίδιο και το βακτηριακό στέλεχος που καλλιεργείται. Το υγρό θρεπτικό υλικό καθώς και τα τρυβλία μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται στους 37°C σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Για τις υγρές καλλιέργειες είναι απαραίτητη η συνεχής ανάδευση καθώς και ο καλός αερισμός. Για αποθήκευση για μεγαλύτερες περιόδους τα βακτήρια διατηρούνται στους -80°C στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία 50% γλυκερόλης.

#### Γ.4.1. Μετασχηματισμός Καλλιιεργειών *E.Coli* μέσω Θερμικού Σοκ

##### ΠΟΡΕΙΑ:

- Ξεπάγωμα των βακτηρίων από τους -80°C μέσα σε πάγο.
- Ανάμιξη όγκου 200 μl βακτηρίων με το DNA.
- Επώαση σε πάγο για 30 min.
- Επώαση στους 42°C για 1 min.
- Προσθήκη 2ml υλικού LB
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

- Εμβολιασμός τρυβλίων που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό με 200μl από το παραπάνω υλικό.
- Επώαση για 12-16 ώρες στους 37°C.

## **Γ.5. Μέθοδοι Απομόνωσης Πλασμιδιακού DNA από Καλλιέργειες Βακτηρίων**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι συστηματοποιημένες μέθοδοι της QIAGEN.

### **Γ.5.1. Απομόνωση μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA (*mini prep*)**

- Εμβολιασμός μίας βακτηριακής αποικίας σε 3ml υλικού LB και επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες. Πραγματοποιούνται πολλοί εμβολιασμοί ώστε να ελεγχθούν πολλές μοναδιαίες βακτηριακές αποικίες.
- Φυγοκέντρηση των καλλιεργειών σε 4.000g ώστε να κατακρημνιστούν τα βακτήρια.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100μl διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200μl διαλύματος P2 και απαλή ανάδευση.
- Προσθήκη 150μl P3 και απαλή ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 16.000g για 15 min.
- Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος κρύας ισοπροπανόλης.
- Φυγοκέντρηση στις 16.000g για 15 min.
- Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στους 65°C.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50μl ddH<sub>2</sub>O.

Το DNA είναι κατάλληλο για πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση.

### **Γ.5.2. Απομόνωση μεγάλης ποσότητας DNA (*maxi prep*)**

- Εμβολιασμός 20ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας με αμπικιλίνη (100μg/ml) με μία αποικία από μετασηματισμένα βακτήρια και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C, για περίπου 16 ώρες.
- Εμβολιασμός 1l θρεπτικού υλικού καλλιέργειας με αμπικιλίνη με 10ml της παραπάνω καλλιέργειας και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.

- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 6.000g για 15 min στους 4°C σε φυγόκεντρο Sorvall, με κεφαλή GS3.
- Αναδιάλυση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων, υπό ισχυρή ανάδευση, σε 10ml διαλύματος P1.
- Προσθήκη 10ml διαλύματος P2, απαλή ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 10ml διαλύματος P3, ανάδευση και επώαση του μίγματος στον πάγο για 20 min.
- Φυγοκέντρηση σε 20.000g για 30 min στους 4°C σε φυγόκεντρο Sorvall με κεφαλή GS3.
- Το ίζημα των κυτταρικών υπολειμμάτων (μεμβρανικά θραύσματα, πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA και μεγαλομοριακό RNA) απομακρύνεται.
- Το υπερκείμενο διηθείται με υαλοβάμβακα και εφαρμόζεται σε στήλη QIAGEN-tip 500 η οποία έχει προηγουμένως πλυθεί με 10ml διαλύματος QBT.
- Πλύσιμο της κολώνας 2 φορές με 30ml διαλύματος QC, ώστε να απομακρυνθούν διάφορες προσμίξεις.
- Έκλουση του DNA με 15ml διαλύματος QF.
- Προσθήκη 10.5ml ισοπροπανόλης στο έκλουσμα.
- Φυγοκέντρηση σε 15.000g για 30 min στους 4°C σε φυγόκεντρο Sorvall με κεφαλή SS-34.
- Το ίζημα στεγνώνεται στους 65°C.
- Επαναδιάλυση σε 500μl ρυθμιστικό διάλυμα TE (1:01).

Η συγκέντρωση του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται με φωτομέτρηση του δείγματος στα 260 nm ( $OD_{260nm}$ ) και η ποιοτική ανάλυση του δείγματος γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

## **Γ.6. Τεχνολογία shRNA (short hairpin RNA)**

Η τεχνολογία σίγασης γονιδίων είναι ένα σχετικά πρόσφατα εργαλείο μέσω του οποίου η έκφραση ενός γονιδίου παρεμποδίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής έτσι ώστε το τελικό προϊόν, η πρωτεΐνη να εμφανίζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή να αποσιωπείται πλήρως. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία shRNA για την σίγαση της πρωτεΐνης Cdc37. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το cDNA και σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια που στοχεύουν συμπληρωματικά στο mRNA του γονιδίου χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό λογισμικό 'WI siRNA Selection

Program' από την ιστοσελίδα <http://sirna.wi.mit.edu/> του Whitehead Institute. Τα νουκλεοτίδια που σχεδιάστηκαν είχαν τέτοια σύνθεση ώστε να σχηματίζουν δομή φουρκέτας όταν μεταγράφονται.

#### **Δ. Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων**

Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ πειραματικών σημείων ελέγχθηκε με το Student's T-Test και ως επίπεδο σημαντικότητας επιλέχθηκε το  $P < 0.05$ .

### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

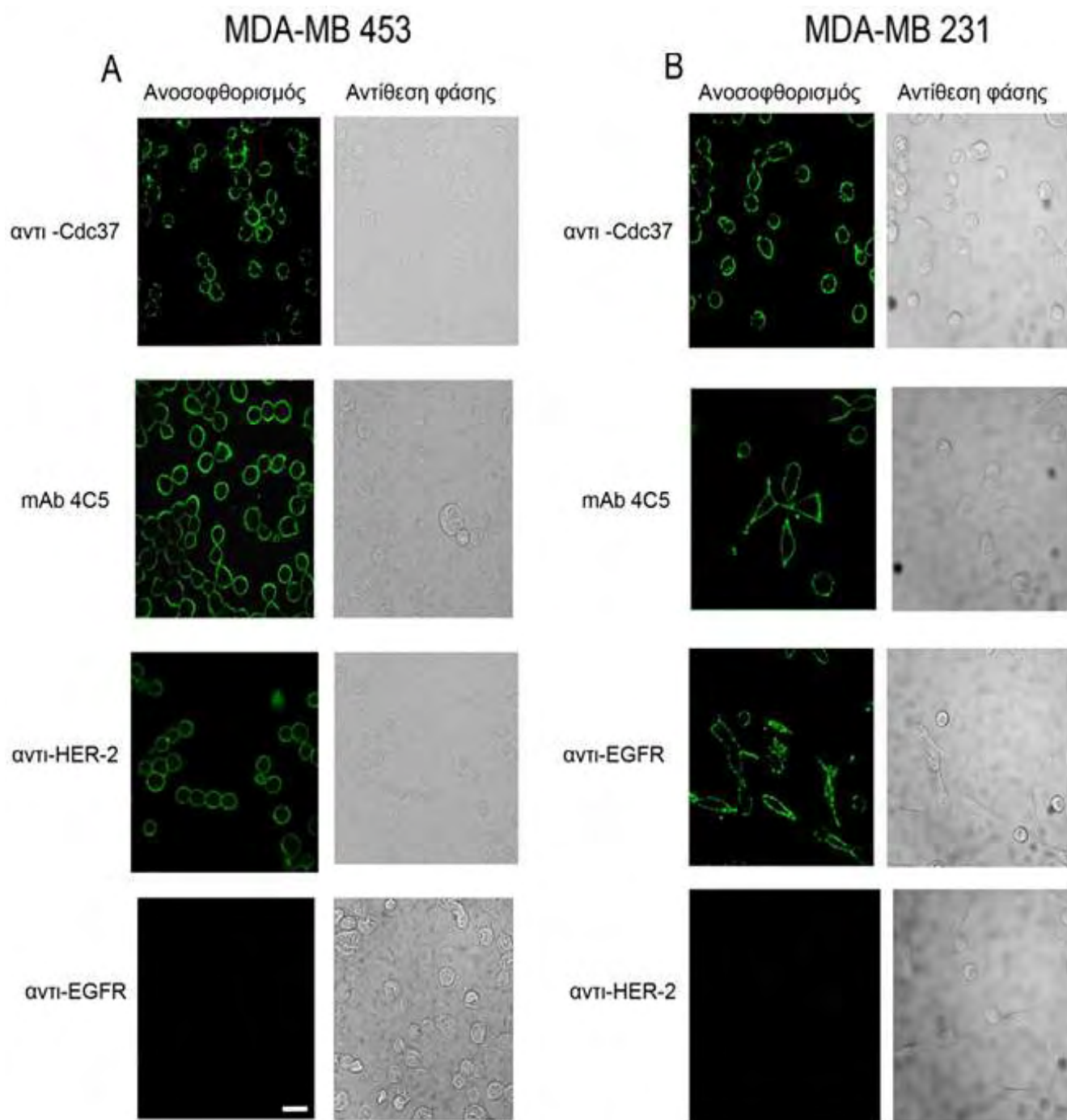
### **A. Διερεύνηση της παρουσίας συνοδών μορίων στην επιφάνεια καρκινικών σειρών**

Προσφάτως, είχε δειχθεί από την ομάδα μας ότι στην κυτταρική επιφάνεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453 και μελανώματος ποντικού B16 εντοπίζεται η συνοδός πρωτεΐνη HSP90. Η λειτουργική παρεμπόδιση της επιφανειακής HSP90 από το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι αυτής της πρωτεΐνης που παράγεται στο εργαστήριο μας, το mAb 4C5, έδωσε κάποια αποτελέσματα σχετικά με τον ρόλο του μορίου αυτού στην κυτταρική επιφάνεια. Πιο συγκεκριμένα, η επιφανειακή HSP90 αλληλεπιδρά με το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα HER-2, εμπλέκεται στα φαινόμενα διήθησης και μετάστασης καρκινικών κυττάρων καθώς και στη μεταγωγή σήματος (signal transduction) από τον υποδοχέα αυτό [116]. Έχοντας αυτά τα δεδομένα υπόψη, προχωρήσαμε στη διερεύνηση της πιθανής ύπαρξης και άλλων συνοδών μορίων (chaperons) στην κυτταρική επιφάνεια. Ειδικότερα εστίασαμε την προσοχή μας στη μελέτη της πρωτεΐνης Cdc37.

#### **A.1. Η Cdc37 εντοπίζεται ανοσοϊστοχημικά στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων μαστού**

Στο συγκεκριμένο πείραμα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI που περιείχε 10% FCS για 24 ώρες πάνω σε καλυπτρίδες. Την επόμενη μέρα το υλικό καλλιέργειας απομακρύνθηκε και αφού τα κύτταρα ξεπλύθηκαν προσεκτικά με υλικό χωρίς ορό, επώαστηκαν για 2 ώρες με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το mAb 4C5, το οποίο σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, δεσμεύεται στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453. Ως επιπλέον θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε το αντι-HER-2 αντίσωμα για τα MDA-MB 453 και αντι-EGFR αντίσωμα για τα MDA-MB 231 κύτταρα, αντίστοιχα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντι-EGFR αντισώματα για τα MDA-MB 453 κύτταρα και αντι-HER-2 για τα MDA-MB 231. Με το πέρας της επώασης, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με υλικό και προστέθηκε παγωμένη ακετόνη για 2-3 λεπτά ώστε να μονιμοποιηθούν. Έπειτα ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και επώαστηκαν στους 4°C για 16 ώρες με δεύτερο αντι-αντίσωμα,

στο οποίο ήταν προσδεμένη πράσινη φθορίζουσα ουσία που εκπέμπει στην περιοχή του πράσινου χρώματος (520nm) όταν διεγερθεί στα 485nm. Κατόπιν, οι καλυπτρίδες στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα ξεπλυθήκαν με PBS, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**, η Cdc37 εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια και των δύο κυτταρικών σειρών. Στα MDA-MB 453, όπως ήταν αναμενόμενο και οι δύο θετικοί μάρτυρες (mAb 4C5 και αντι-HER-2 αντισώματα) έδωσαν επιφανειακή χρώση. Ομοίως και στα MDA-MB 231 κύτταρα, ο θετικός μάρτυρας (αντι-HER-2 αντίσωμα) έδωσε επιφανειακή χρώση. Επιπλέον, κανένας από τους αρνητικούς μάρτυρες δεν εμφάνισε θετική επιφανειακή χρώση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την ορθότητα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειώσουμε πως το mAb 4C5 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε αυτή τη κυτταρική σειρά και η χρώση του ήταν επίσης θετική.

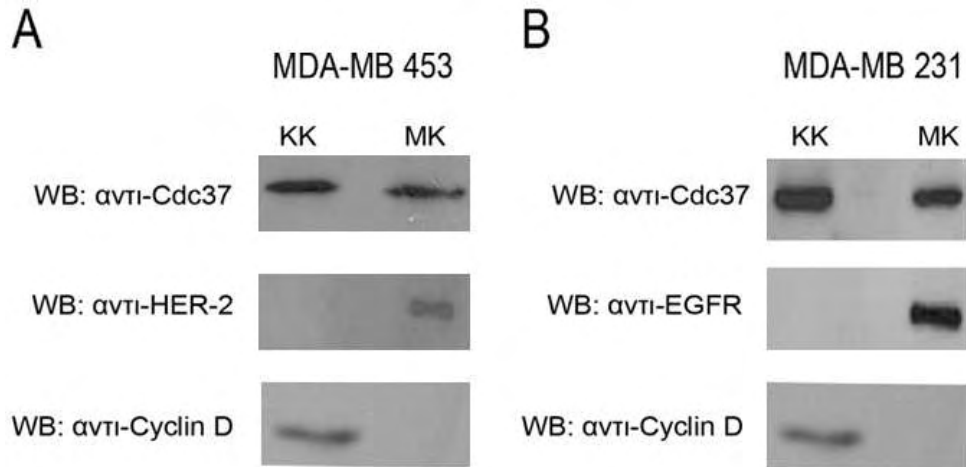


**Εικόνα 1: Εντοπισμός της Cdc37 στην επιφάνεια των MDA-MB 453 (A) και MDA-MB 231 (B) καρκινικών κυττάρων.** Ζωντανά κύτταρα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 επώαστηκαν με τα αναφερόμενα αντισώματα. Το αντίσωμα έναντι του HER-2 λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας για τα MDA-MB 453 και ως αρνητικός μάρτυρας για τα MDA-MB 231. Το ίδιο ισχύει αντίστροφα για το αντι-EGFR αντίσωμα. Κλίμακα= 20 μm.

### **A.1.2. Επιβεβαίωση του εντοπισμού της Cdc37 στην κυτταρική μεμβράνη των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 με ανοσοαποτύπωση**

Έχοντας υπόψη πως η Cdc37 αποτελεί ένα από τα κυριότερα συν-συνοδά μόρια στα πρωτεϊνικά συμπλέγματα της HSP90 προχωρήσαμε στην επιβεβαίωση των παρατηρήσεων μας από τα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας μια δεύτερη τεχνική, αυτή της ανοσοαποτύπωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε εμπορικό σκεύασμα κλασμάτωσης κυττάρων (cell fractionization kit). Με το συγκεκριμένο προϊόν είναι δυνατός ο διαχωρισμός κυτταρικών πρωτεϊνών, ανάλογα με τη κυτταρική διαμερισματοποίησή τους, δηλαδή σε κυτταροπλασματικές, μεμβρανικές, πυρηνικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες.

Κύτταρα από τις σειρές MDA-MB 453 και MDA-MB 231 αφού ξεπλύθηκαν τρεις φορές με κρύο PBS υποβλήθηκαν σε πρωτεϊνική κλασμάτωση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα μεμβρανικά και κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά κλάσματα, αφού έγινε προσδιορισμός της συνολικής πρωτεϊνικής τους συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντι-Cdc37, αντι-HER-2, αντι-EGFR και αντι-cyclin D αντισώματα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2**, η Cdc37 εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό κλάσμα όπως αναμενόταν, αλλά και στο μεμβρανικό πρωτεϊνικό κλάσμα. Η ανίχνευση των HER-2 και EGFR μόνο στο μεμβρανικά κλάσματα των MDA-MB 453 (**εικόνα 2A**) και MDA-MB 231 (**εικόνα 2B**) αντίστοιχα, αποδεικνύει πως δεν έχει υπάρξει επιμόλυνση του κυτταροπλασματικού κλάσματος από το μεμβρανικό. Επίσης, η ανίχνευση της κυτοσολικής κυκλίνης μόνο στο κυτταροπλασματικό κλάσμα και όχι στο μεμβρανικό, αποδεικνύει τη μη επιμόλυνση του μεμβρανικού κλάσματος από το κυτταροπλασματικό.

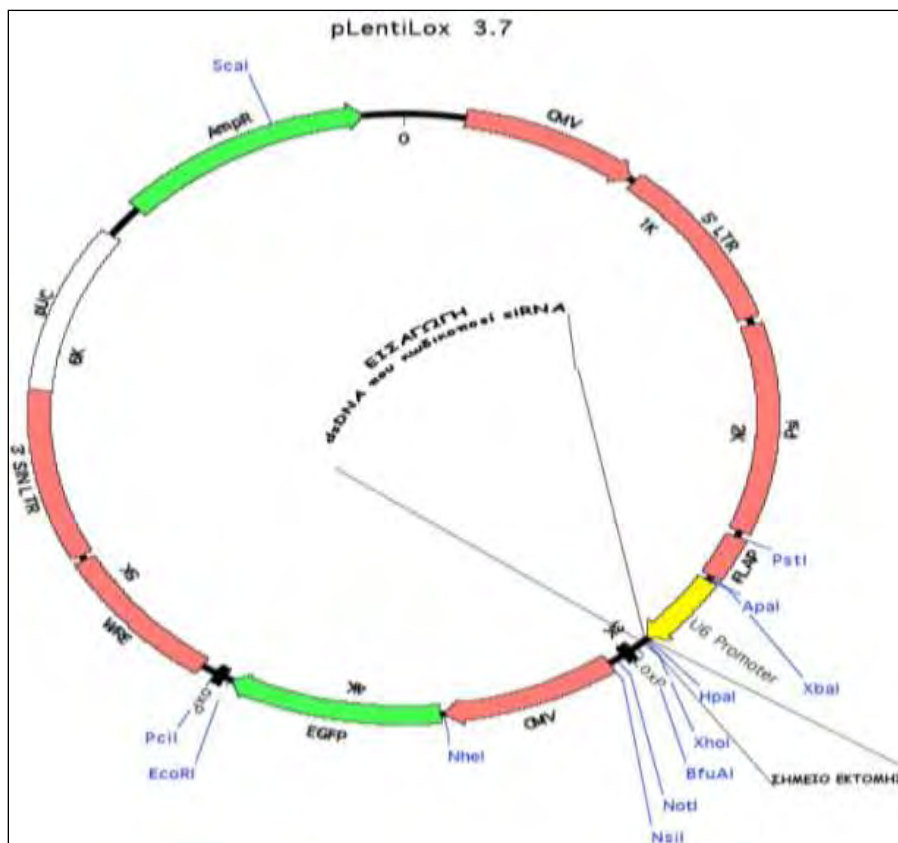


**Εικόνα 2: Επιβεβαίωση του επιφανειακού εντοπισμού της Cdc37 με ανοσοαποτύπωση.** Πρωτεϊνικά κυτοσολικά (KK) και μεμβρανικά (MK) κλάσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε (A) MDA-MB 453 και (B) MDA-MB 231 κύτταρα, χρησιμοποιώντας αντι-Cdc37, αντι-HER-2, αντι-EGFR και αντι-κυκλίνη D αντισώματα.

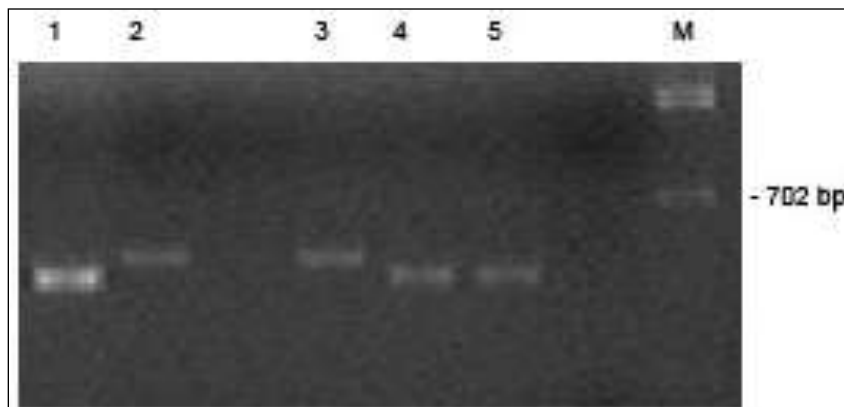
### **A.1.3. Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικά κύτταρα με τη χρήση της τεχνολογίας siRNA**

Για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα του εμπορικού αντι-Cdc37 αντισώματος στην πρόσδεση του στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων επιστρατεύτηκε η τεχνολογία αποσιώπησης γονιδίων siRNA. Για το σχεδιασμό των ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το cDNA της Cdc37 με τη βοήθεια του προγράμματος “WI siRNA Selection Program” του Whitehead Institute for Biomedical Research. Με σκοπό το σχηματισμό δομής φουρκέτας εισήχθη μια επιπλέον αλληλουχία (TTCAAGAGA). Τα ολιγονουκλεοτίδια κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις κλωνοποίησης HpaI και XpaI του φορέα pLL3.7 (**Σχήμα 1**) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στο μετασχηματισμό βακτηρίων *Escherichia coli* της σειράς XL1 Blue.

Ο φορέας περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη, οπότεν όσα κύτταρα *E.coli* δεν έχουν μετασχηματιστεί, δεν αναπτύσσονται σε υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό αυτό. Το πλασμιδιακό DNA, αφού απομονώθηκε από τις καλλιέργειες μετασχηματισμένων *E.coli* επώαστηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και NotI. Οι θετικοί κλώνοι δίνουν δύο προϊόντα πέψης μεγέθους 7,000bp και 510bp, ενώ οι αρνητικοί κλώνοι ένα προϊόν 7,000bp και ένα 449bp (**Εικόνα 3**).

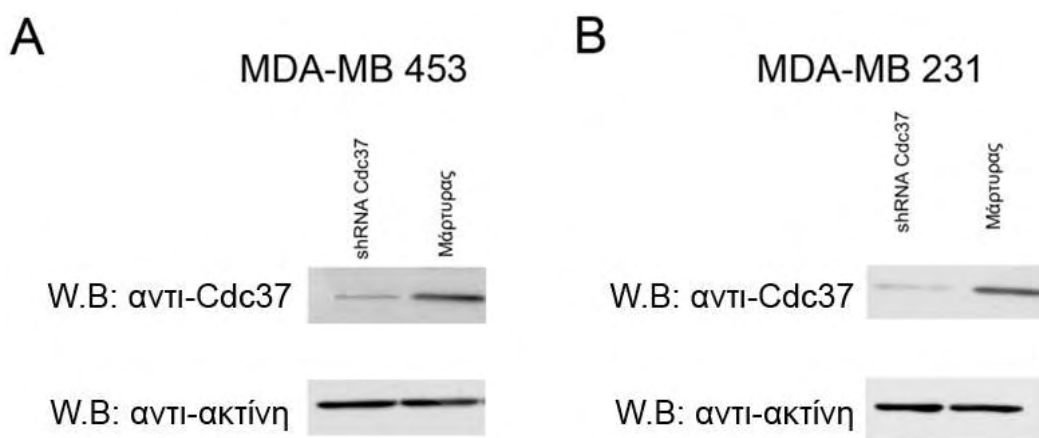


**Σχήμα 1: Μοριακός χάρτης του πλασμιδίου pLentiLox 3.7 (pLL3.7).** Διακρίνονται οι θέσεις εκτομής και εισαγωγής της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το siRNA που στοχεύει στην Cdc37.



**Εικόνα 3: Κατασκευή φορέων έκφρασης siRNA.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αραρόζης 2% για την ταυτοποίηση θετικών πλασμιδιακών κλώνων στο φορέα pLL3.7, στον οποίο έχουν κλωνοποιηθεί ολιγονουκλεοτίδια που κωδικοποιούν siRNA έναντι της Cdc37. 1, Αρνητικός μάρτυρας (pLL3.7). 2-3, Θετικοί κλώνοι. 4-5, Αρνητικοί κλώνοι. M, πρότυπο μοριακών βαρών.

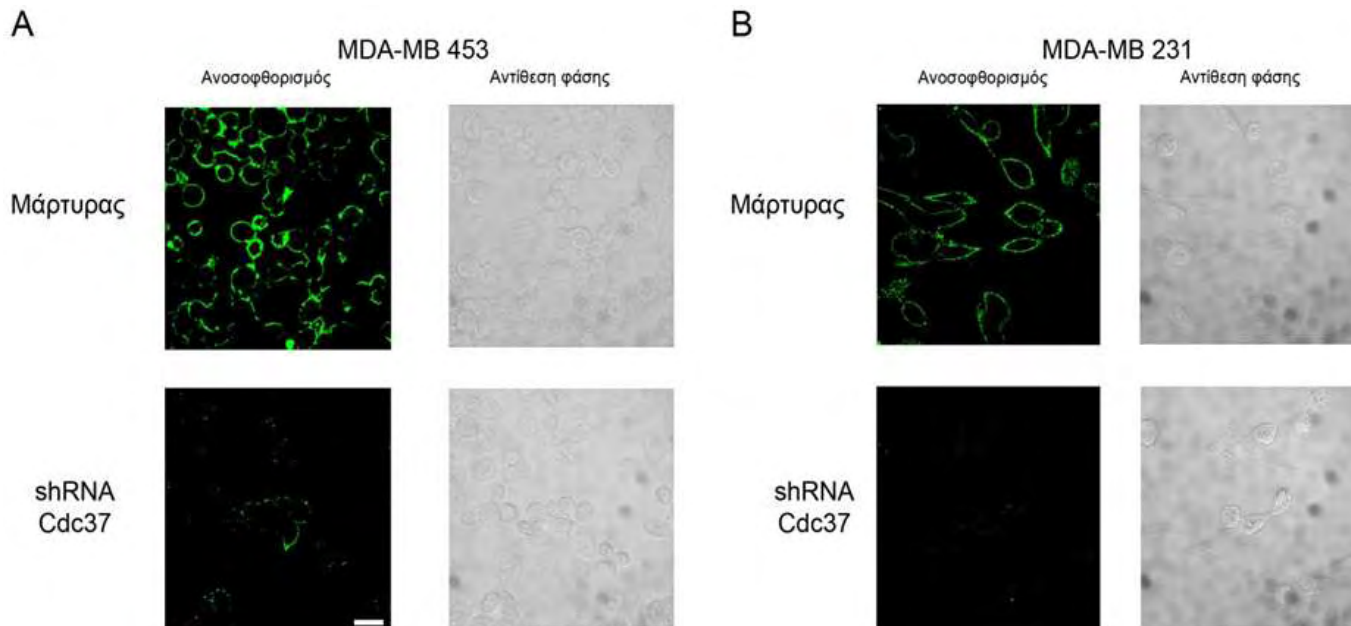
Στη συνέχεια, έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας των θετικών κλώνων για να πιστοποιηθεί η ακριβής εισαγωγή του ολιγονουκλεοτιδίου στους φορείς. Καρκινικά κύτταρα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 επιμολύνθηκαν με το φορέα στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί επιτυχώς το ολιγονουκλεοτίδιο που κωδικοποιεί για το siRNA που στοχεύει την Cdc37, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Xfect Transfection. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pLL3.7 στο οποίο δεν είχε εισαχθεί κανένα ολιγονουκλεοτίδιο. Μετά από 72 ώρες έγινε λύση των κυττάρων και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση. Τα αποτελέσματα της **εικόνας 4** δείχνουν πως η αποσιώπηση της Cdc37 με τη χρήση της τεχνολογίας siRNA ήταν επιτυχής.



**Εικόνα 4: Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία siRNA.** Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από (A) MDA-MB 453 και (B) MDA-MB 231 κύτταρα που επιμολύνθηκαν με φορέα που κωδικοποιεί για siRNA έναντι της Cdc37 (shRNA Cdc37) και με το φορέα χωρίς καμιά κωδικοποίηση για siRNA (Μάρτυρας). Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της Cdc37 (αντι-Cdc37) και της ακτίνης (αντι-ακτίνη).

Ακολούθως, ζωντανά κύτταρα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 τα οποία είχαν επιμολυνθεί με τους ίδιους πλασμιδιακούς φορείς, εξετάστηκαν για την παρουσία επιφανειακής Cdc37. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 5**, μετά από την αποσιώπηση της Cdc37 το αντι-Cdc37 αντίσωμα προσδένεται σε λιγότερα κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό στην κυτταρική επιφάνεια και των δύο κυτταρικών σειρών. Η παρατήρηση αυτή πιστοποιεί πως η πρόσδεση του αντι-Cdc37 αντισώματος στην κυτταρική επιφάνεια οφείλεται στην ειδική αναγνώριση της Cdc37 και όχι σε μη ειδική πρόσδεση του ή άλλα φυσικοχημικά φαινόμενα. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε την παρουσία της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια και των δύο καρκινικών σειρών, αλλά και μας

επέτρεψε την χρήση του αντι-Cdc37 αντισώματος για τη διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων για την αποσαφήνιση του ρόλου της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια.



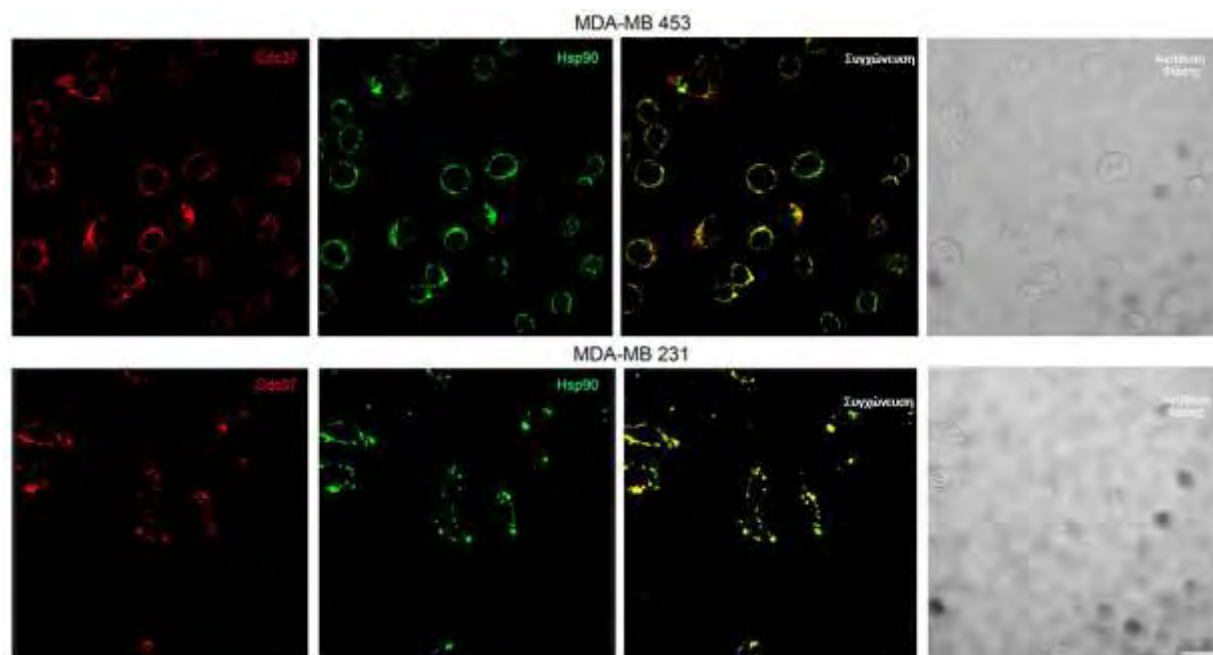
**Εικόνα 5: Επιβεβαίωση της ειδικότητας του αντι-Cdc37 αντισώματος χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία siRNA.** MDA-MB 453 (A) και MDA-MB231 (B) κύτταρα επιμολύνθηκαν με το φορέα που κωδικοποιεί για siRNA έναντι της Cdc37 (shRNA Cdc37) ή με το φορέα που δεν περιέχει κάποια αλληλουχία κωδικοποίησης για siRNA (Μάρτυρας). Μετά από 72 ώρες τα ζωντανά κύτταρα επώαστηκαν με το αντι-Cdc37 αντίσωμα για 2 ώρες, εκπλύθηκαν και μονιμοποιήθηκαν με κρύα ακετόνη. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών κατσίκας το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική που διεγείρεται στα 647 nm. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Διακρίνεται έντονα η επιφανειακή χρώση στα κύτταρα που στα οποία δε μεταγράφονται siRNA μόρια (Μάρτυρας), ενώ στα κύτταρα που έχει γίνει αποσιώπηση της Cdc37 με shRNA( shRNA Cdc37) η επιφανειακή χρώση είναι κατά πολύ μεγάλο βαθμό ελαττωμένη, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδικότητα του αντισώματος έναντι της Cdc37. Κλίμακα =20nm

#### A.1.4. Η Cdc37 και Hsp90 συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια

Αφού δείχθηκε η ειδικότητα του αντι-Cdc37 και η ειδική του πρόσδεση στην επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κυττάρων, διερευνήθηκε η πιθανότητα τα δύο αυτά μόρια να συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια των δύο κυτταρικών σειρών. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επώαστηκαν ταυτόχρονα με το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4C5 έναντι της HSP90 και το πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας έναντι της Cdc37. Είναι σημαντικό στα πειράματα αυτά να χρησιμοποιούνται αντισώματα από ζώα όσο το δυνατό απομακρυσμένα εξελικτικά, για να αποκλειστεί η πιθανότητα ψευδούς αναγνώρισης από τα συζευγμένα με φθοριόχρωμα αντι-αντισώματα. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 6**, το αντι-Cdc37 αντίσωμα ανιχνεύτηκε με το αντι-



αντίσωμα που είναι συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα ουσία (Alexa fluor 546, donkey anti-goat IgGS), και η HSP90 με αντι-αντίσωμα συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα ουσία (Alexa fluor 488, donkey anti-mouse IgGS). Η αλληλοεπικάλυψη των δύο εικόνων με τη χρήση ειδικού προγράμματος αποκάλυψε το συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια και των δύο κυτταρικών σειρών. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν πιθανή λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο μορίων στην κυτταρική επιφάνεια.

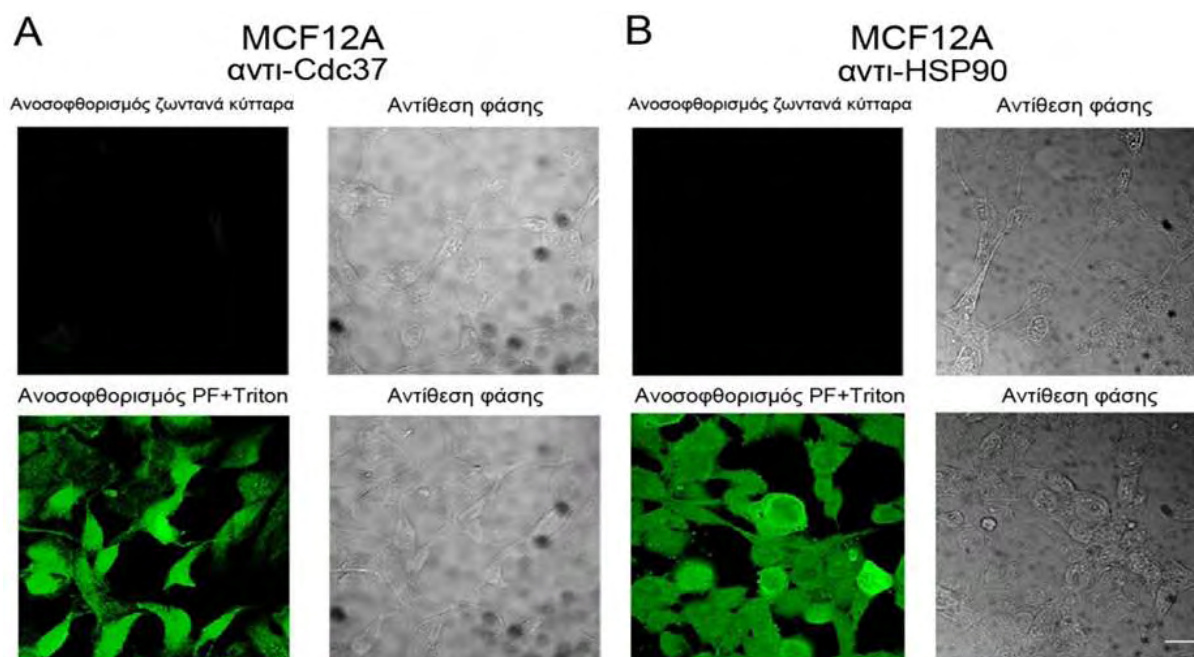


**Εικόνα 6: Συνεντοπισμός των Cdc37 και HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια.** Η Cdc37 (κόκκινο χρώμα) και η Hsp90 (πράσινο χρώμα) συνεντοπίζονται τόσο στα MDA-MB 453 όσο και στα MDA-MB 231 κύτταρα. Κλίμακα = 20μm

#### **A.1.5. Η HSP90 και η Cdc37 δεν εντοπίζονται στην επιφάνεια μη καρκινικών κυττάρων (φυσιολογικών) μαστού**

Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο η παρουσία της HSP90 και της Cdc37 στην κυτταροπλασματική επιφάνεια παρατηρείται και σε φυσιολογικά κύτταρα ή χαρακτηρίζει μόνο τα καρκινικά, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε ζωντανά, μη καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF12A. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 7**, καμία από τις δύο συνοδές πρωτεΐνες HSP90 και Cdc37 δεν εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ακολούθως και προκειμένου να ελέγξουμε την παρουσία των προαναφερθέντων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου, εφαρμόσαμε μια κλασική μέθοδο ανοσοφθορισμού, κατά την οποία ανιχνεύονται

κυρίως ενδοκυτταρικοί επίτοποι. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε στρογγυλές καλυπτρίδες, ξεπλένονται τρεις φορές με PBS και μονιμοποιούνται με παραφολμαδεύδη (4%) για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται απορρυπαντικό TRITON X-100 διαλυμένο σε PBS (0.1%). Το συγκεκριμένο απορρυπαντικό καθιστά διαπερατές τις κυτταρικές μεμβράνες. Ακολούθως τα κύτταρα επωάζονται για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με MAPS για να απενεργοποιηθούν (μπλοκαριστούν) οι μη ειδικοί επίτοποι. Η επώαση με το προς μελέτη αντίσωμα γίνεται για 16 ώρες στους 4°C. Την επομένη γίνονται τρεις πλύσεις με PBS και επώαση με δεύτερο αντι-αντίσωμα στο οποίο είναι προσδεμένο φθοριόχρωμα. Τέλος, τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Σύμφωνα με την **εικόνα 7**, τόσο η HSP90 όσο και η Cdc37 εντοπίζονται ενδοκυτταρικά όπως ήταν αναμενόμενο.



**Εικόνα 7: Οι Cdc37 και HSP90 δεν εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού.** Στα φυσιολογικά κύτταρα μαστού φαίνεται πως η Cdc37 (A) και η HSP90 (B) δεν εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια τους. Σε αντίθεση η παρουσία και των δύο στο κυτταρόπλασμα είναι άφθονη. Κλίμακα=20μm

## **B. *In vitro* μελέτη της συμμετοχής συνοδών πρωτεϊνών στη διηθητική συμπεριφορά καρκινικών σειρών**

Η διήθηση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο σε παρακείμενους ιστούς ή μέσω της κυκλοφορίας σε απομακρυσμένα όργανα και η δημιουργία μεταστάσεων σχετίζεται με την

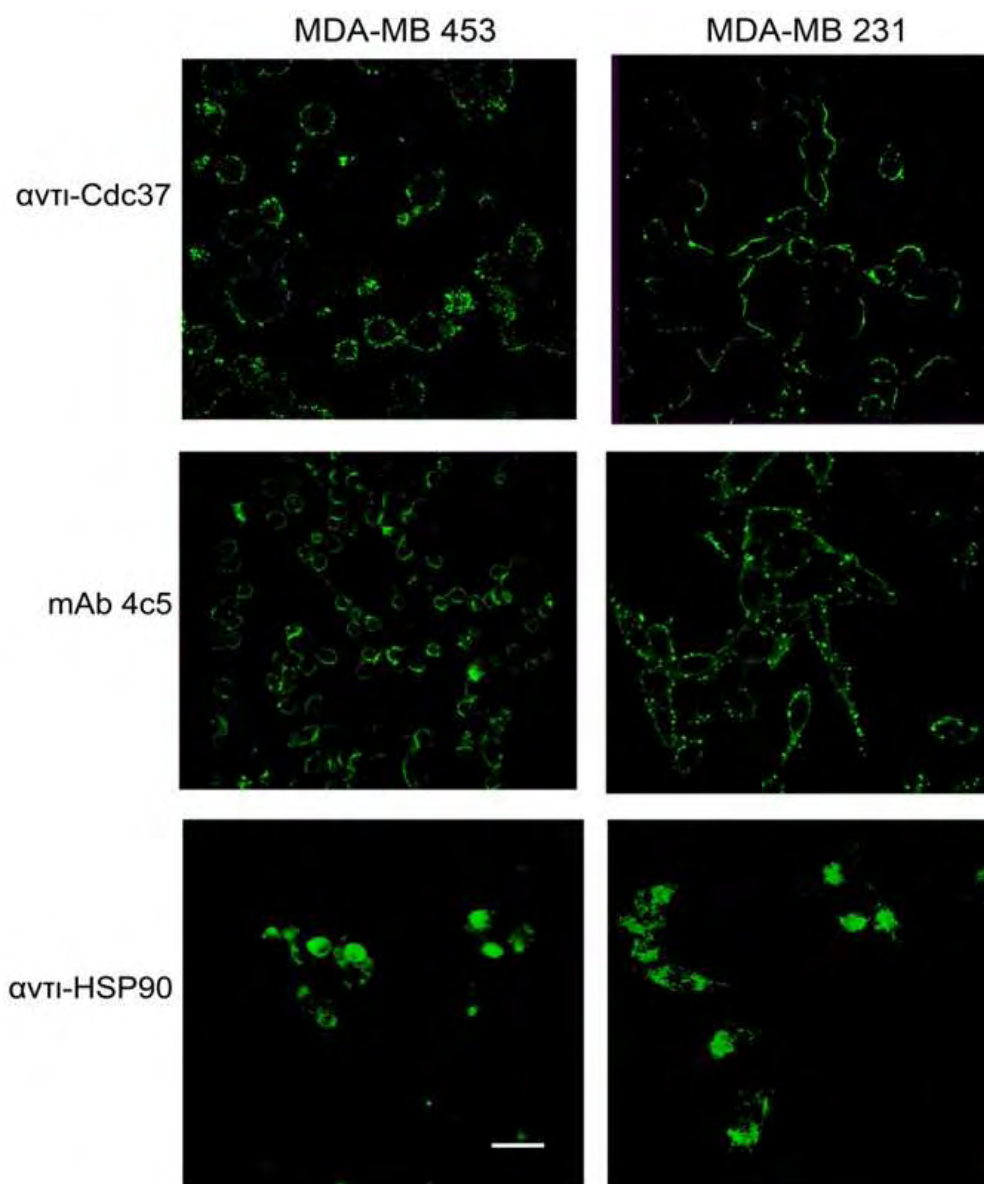
αυξημένη κυτταρική κινητικότητα. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας βρέθηκε πως η επιφανειακή HSP90 εμπλέκεται στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων από μελάνωμα ποντικού B16F10 αλλά και των καρκινικών μαστικών MDA-MB 453 [115,116]. Έχοντας προηγουμένως δει πως η Cdc37 εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια διερευνήσαμε την πιθανή συμμετοχή της στη διηθητική ικανότητα των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κυττάρων. Επιπλέον διερευνήσαμε τη συμμετοχή της επιφανειακής HSP90 στη διηθητική δραστηριότητα των MDA-MB 231 κυττάρων.

Για να μελετηθούν *in vitro* βιομόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή έχουν αναπτυχθεί αρκετές πειραματικές διατάξεις και διαδικασίες. Μια από αυτές είναι η μέθοδος ‘επούλωσης της πληγής’ (wound healing assay). Επιλέξαμε αυτή τη μέθοδο για τη μελέτη της συνοδών μορίων στη διηθητική συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων καθώς είναι σχετικά εύκολη, γρήγορη, οικονομική και αξιόπιστη.

### **B.1.1. Το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώνεται αλλά παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κυττάρων**

Προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή συμβολή της επιφανειακής Cdc37 στη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, όπως και με την επιφανειακή HSP90, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Cdc37 το οποίο όμως δε διεισδύει στα ζωντανά κύτταρα. Για την επιλογή του κατάλληλου αντισώματος, διενεργήθηκε δοκιμασία ενδοκύττωσης του αντισώματος (internalization assay). Στο συγκεκριμένο πείραμα τα κύτταρα καλλιεργούνται σε στρογγυλές καλυπτρίδες για 24 περίπου ώρες. Έπειτα, αφού ξεπλύθηκαν προσεκτικά με σκέτο υλικό καλλιέργειας, προστέθηκε υλικό το οποίο περιείχε διαλυμένο το προς μελέτη αντίσωμα. Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστήρα για τουλάχιστον 8 ώρες. Ακολούθως, αφού ξεπλύθηκαν με σκέτο υλικό, μονιμοποιήθηκαν με παραφολμαλδεϋδη 4% για 20 λεπτά, ξεπλύθηκαν με PBS και κατεργάστηκαν με TRITON-X100 για 2-3 λεπτά ώστε να γίνουν διαπερατά. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με δεύτερα αντι-αντισώματα σημασμένα με φθοριόχρωμα, σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 8**, το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώνεται, αλλά παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια. Το mAb 4c5 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μη ενδοκύττωσης, ενώ το πολυκλωνικό αντι-HSP90 αντίσωμα ως μάρτυρας ενδοκύττωσης. Το εμπορικό αντίσωμα έναντι της Cdc37 που επιλέχθηκε ανάμεσα σε πολλά

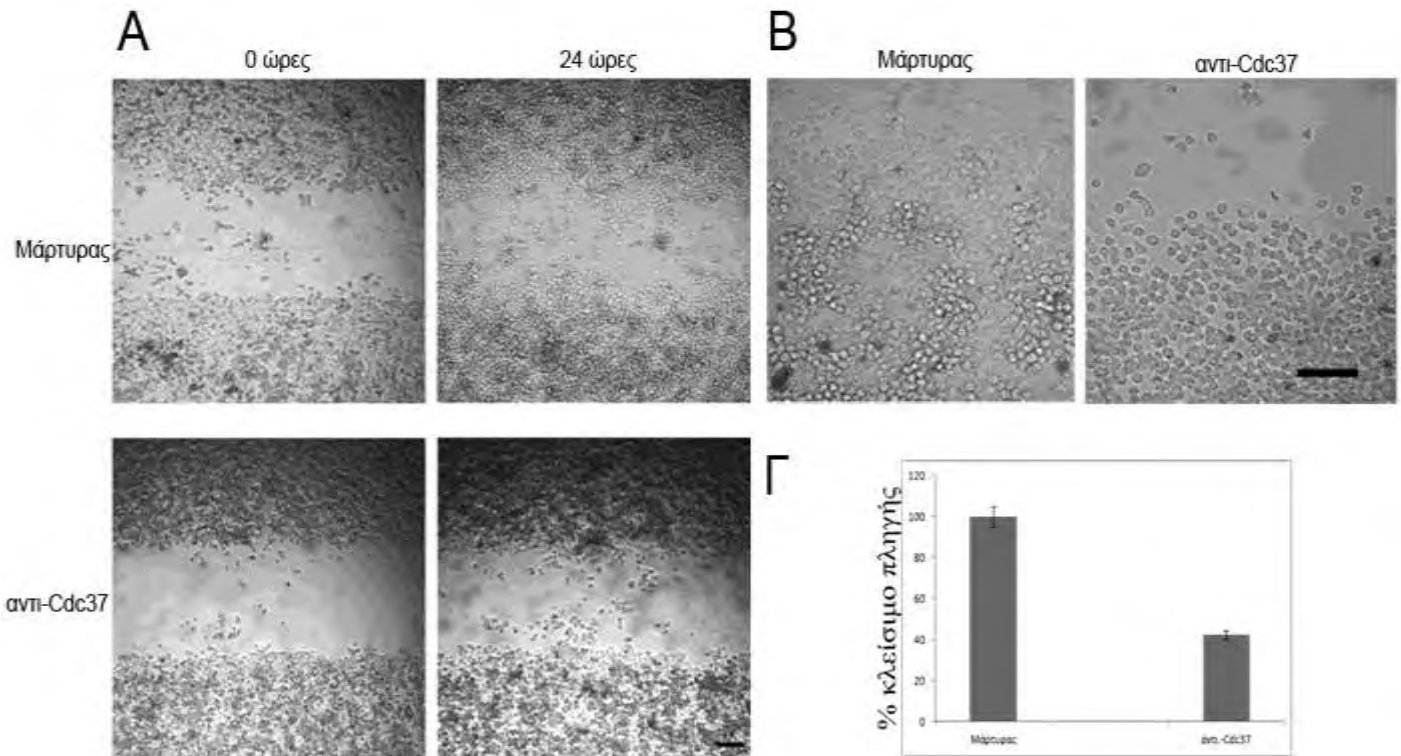
άλλα διαθέσιμα, δε διεισδύει στο εσωτερικό των ζωντανών κυττάρων, ομοίως με το mAb 4C5. Το γεγονός αυτό το καθιστά ιδανικό για μελέτη της επιφανειακής Cdc37 σε φαινόμενα κυτταρικής μετανάστευσης.



**Εικόνα 8: Το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώνεται αλλά παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια.** Τόσο στα MDA-MB 453 όσο και στα MDA-MB 231 κύτταρα, το αντι-Cdc37 δεν ενδοκυτταρώνεται, ομοίως με το mAb 4C5, σε αντίθεση με το πολυκλωνικό αντι-Hsp90 αντίσωμα. Κλίμακα= 20  $\mu\text{m}$ .

### **B.1.2. Η παρεμπόδιση της επιφανειακής Cdc37 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453 και MDA-MB 231 *in vitro***

Αφού επιλέχθηκε το κατάλληλο αντίσωμα έναντι της Cdc37 το οποίο παραμένει προσδεδεμένο στην κυτταρική επιφάνεια όπου αναγνωρίζει ειδικά την Cdc37, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία ‘επούλωσης της πληγής’ (wound healing). Στο συγκεκριμένο πείραμα  $1,5 \times 10^5$  κύτταρα MDA-MB 453 και  $1,5 \times 10^4$  MDA-MB 231 ανά φρεάτιο επιστρώθηκαν σε πλάκα 48 φρεατίων και αφέθηκαν να αναπτυχθούν παρουσία ορού. Μετά το πέρας 16 ωρών, το θρεπτικό υλικό με τον ορό αντικαταστάθηκε από θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Τα κύτταρα παρέμειναν σε θρεπτικό χωρίς ορό για 24 ώρες, οπότε και δημιουργήθηκε χάσμα μεταξύ των κυττάρων στο κέντρο του φρεατίου με την άκρη ενός ακρορυγχίου. Τέλος, τα κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν παρουσία και απουσία 200μg/ml του επιλεγμένου αντισώματος έναντι της Cdc37 πρωτεΐνης ή mAb 4C5. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 9** η παρουσία του αντι-Cdc37 στο υλικό καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 57,7% στη διηθητική ικανότητα των MDA-MB 453 κυττάρων. Η μείωση αυτή δεν οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο καθώς χρώση με Trypan blue, έδειξε πολύ μικρό αριθμό κυττάρων, όμοιο με εκείνο του μάρτυρα. Μείωση της διήθησης παρατηρήθηκε και στα MDA-MB 231 κύτταρα, όταν αφέθηκαν να μεταναστεύσουν παρουσία 200μg/ml αντι-Cdc37 αντισώματος (**Εικόνα 10**). Ομοίως με τα MDA-MB 453, δεν παρατηρείται κυτταρικός θάνατος και στα MDA-MB 231 κύτταρα. Η στατιστική επεξεργασία τριών ανεξάρτητων πειραμάτων με Student’s *T* test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά  $P < 0,005$  για όλα τα πειράματα. Όταν στο υλικό προστέθηκε μαζί με το αντι-Cdc37 αντίσωμα και το mAb 4C5, η μείωση της διήθησης των κυττάρων δεν ήταν αθροιστική των επιμέρους αναχαιτίσεων που παρατηρήθηκαν όταν τα αντισώματα αυτά είχαν προστεθεί ξεχωριστά στο υλικό καλλιέργειας.

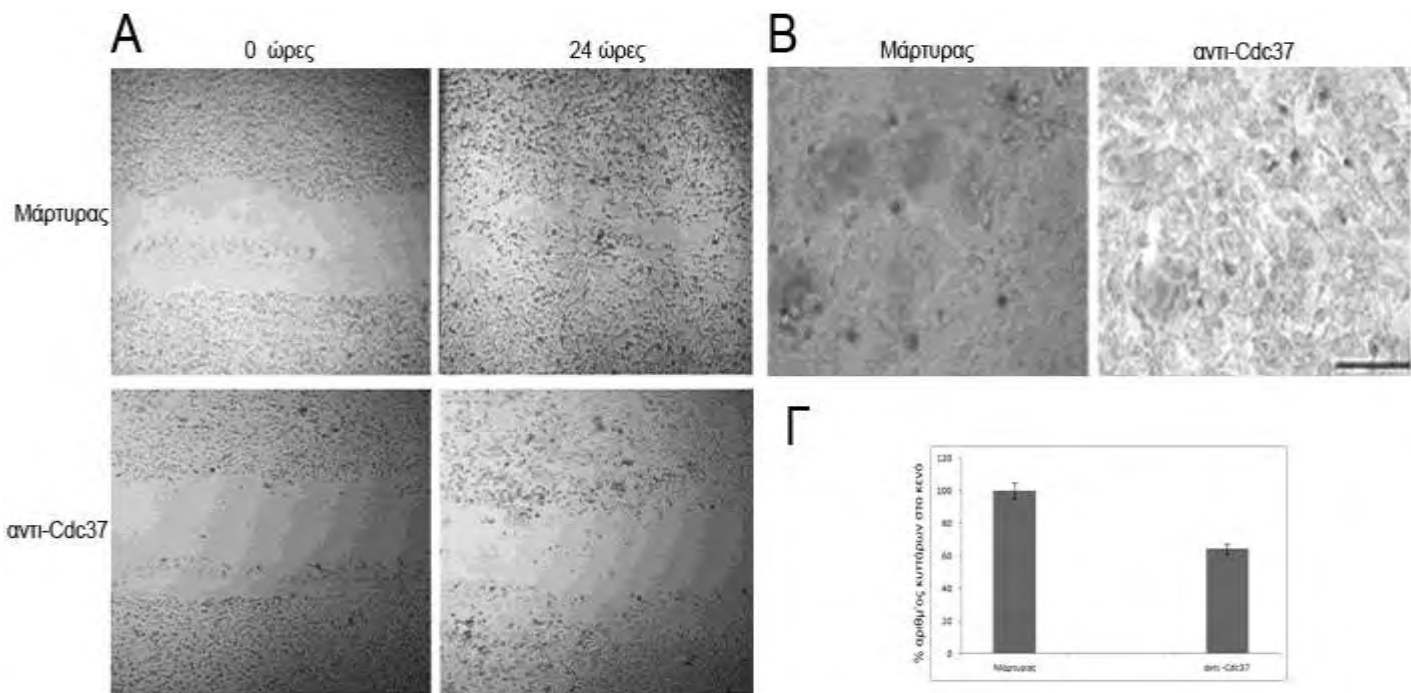


**Εικόνα 9: Η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 453.** Η παρεμπόδιση της επιφανειακής Cdc37 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453.

A.  $1,5 \times 10^5$  κύτταρα ανά φρεάτιο επιστρώθηκαν σε πλάκα 48 φρεατίων ώστε να δημιουργήσουν ομοιογενή στοιβάδα κυττάρων. Μετά από 24 ώρες, δημιουργήθηκε μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων και τα καρκινικά κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν στην κενή περιοχή για 24 ώρες, παρουσία (α) υλικού χωρίς ορό-μάρτυρα (πάνω εικόνα) και (β) παρουσία 200  $\mu\text{g/ml}$  αντι-Cdc37 αντισώματος (κάτω εικόνα). Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, x5. Κλίμακα=165  $\mu\text{m}$

B. Μετά το τέλος του πειράματος τα κύτταρα βάφτηκαν με Trypan Blue, το οποίο βάφει τα νεκρά κύτταρα. Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, x20. Κλίμακα=80  $\mu\text{m}$

Γ. Ποσοτικοποίηση της επίδρασης του αντι-Cdc37 αντισώματος. Το χάσμα μετρήθηκε στις φωτογραφίες στις 0 και 24 ώρες με το πρόγραμμα Image-Pro. Σε σχέση με το μάρτυρα τα κύτταρα που επώαστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα παρουσίασαν 57,7 % μείωση της διήθησης.



**Εικόνα 10:** Η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 231. Η παρεμπόδιση της επιφανειακής Cdc37 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 231.

A.  $1,5 \times 10^4$  κύτταρα ανά φρεάτιο επιστρώθηκαν σε πλάκα 48 φρεατίων ώστε να δημιουργήσουν ομοιογενή στοιβάδα κυττάρων. Μετά από 24 ώρες, δημιουργήθηκε μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων και τα καρκινικά κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν στην κενή περιοχή για 24 ώρες, παρουσία (α) υλικού χωρίς ορό-μάρτυρα (πάνω εικόνα) και (β) παρουσία 200  $\mu\text{g/ml}$  αντι-Cdc37 αντισώματος (κάτω εικόνα). Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, x5. Κλίμακα=165  $\mu\text{m}$

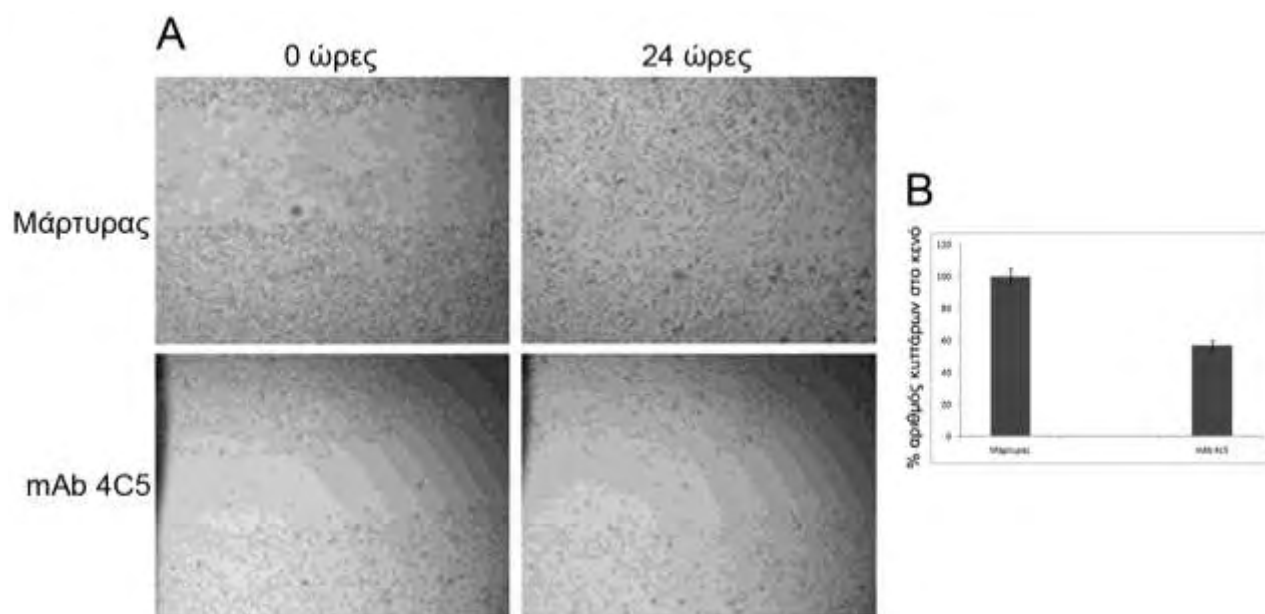
B. Μετά το τέλος του πειράματος τα κύτταρα βάφτηκαν με Trypan Blue. Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, x20. Κλίμακα=80  $\mu\text{m}$

Γ. Ποσοτικοποίηση της επίδρασης του αντι-Cdc37 αντισώματος. Το χάσμα μετρήθηκε στις φωτογραφίες στις 0 και 24 ώρες με το πρόγραμμα Image-Pro. Σε σχέση με το μάρτυρα τα κύτταρα που επώαστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα παρουσίασαν 35,8 % μείωση της διήθησης.

### B.1.3. Η παρεμπόδιση της επιφανειακής HSP90 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 231 *in vitro*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στο παρελθόν είχε διαπιστωθεί πως το mAb 4C5 παρεμποδίζει τη διήθηση των MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων [116]. Η παρεμπόδιση αυτή συσχετίστηκε με την ικανότητα του mAb 4C5 να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της

επιφανειακής HSP90 με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2 υποδοχέα. Σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα, όπου είχαμε διαπιστώσει πως το mAb 4C5 δεν ενδοκυτταρώνεται και παραμένει δεσμευμένο στην επιφάνεια των MDA-MB 231 κυττάρων, καθώς επίσης και το γεγονός πως η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στη διήθηση των MDA-MB 231 κυττάρων, εξετάσαμε τη συμμετοχή και της HSP90 στη διηθητική συμπεριφορά αυτής της κυτταρικής σειράς. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 11**, όταν τα κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν απουσία (μάρτυρας) ή παρουσία 200μg/ml αντισώματος mAb 4C5, είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθεί κατά 41,2% η διήθησή τους.



**Εικόνα 11: Η επιφανειακή HSP90 συμμετέχει στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 231.** Η παρεμπόδιση της επιφανειακής HSP90 συμβάλλει στη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 231.

A.  $1,5 \times 10^4$  κύτταρα ανά φρεάτιο επιστρώθηκαν σε πλάκα 48 φρεατίων ώστε να δημιουργήσουν ομοιογενή στοιβάδα κυττάρων. Μετά από 24 ώρες, δημιουργήθηκε μια ευθύγραμμη περιοχή ελεύθερη κυττάρων και τα καρκινικά κύτταρα αφέθηκαν να μεταναστεύσουν στην κενή περιοχή για 24 ώρες, παρουσία (α) υλικού χωρίς ορό-μάρτυρα (πάνω εικόνα) και (β) παρουσία 200 μg/ml αντισώματος mAb 4C5 (κάτω εικόνα). Φωτογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Κλίμακα=165 μm

B. Ποσοτικοποίηση της επίδρασης του αντισώματος mAb 4C5. Το κύτταρα που μετακινήθηκαν στο χάσμα μετρήθηκε στις φωτογραφίες στις 0 και 24 ώρες με το πρόγραμμα Image-Pro. Σε σχέση με το μάρτυρα τα κύτταρα που επώαστηκαν με αντίσωμα mAb 4C5 παρουσίασαν 41,2 % μείωση της διήθησής τους.



## **Γ. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των εξωκυττάρων συνοδών μορίων**

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα συνοδά μόρια δρουν συνεργατικά μέσω των αλληλεπιδράσεων τους σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Η πλειονότητα των μελετών αφορά κυρίως ενδοκυτταρικές βιοχημικές διεργασίες. Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχε φανεί πως η εξωκυττάρια HSP90 αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2 υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι αναγκαία για τον ετεροδιμερισμό του με τον HER-3, για τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του καθώς και τη μεταγωγή του ενδοκυτταρικού σήματος μέσω των MAP κινασών [116].

Αφού πιστοποιήσαμε πως η Cdc37 και η HSP90 εντοπίζονται στη κυτταρική επιφάνεια στα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB 453 και MDA-MB 231 που εκφράζουν τον HER-2 και τον EGFR αντίστοιχα, προχωρήσαμε στη διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων της εξωκυττάριας Cdc37 με άλλα πρωτεϊνικά μόρια της επιφάνειας καθώς και τον πιθανό ρόλο τους στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών.

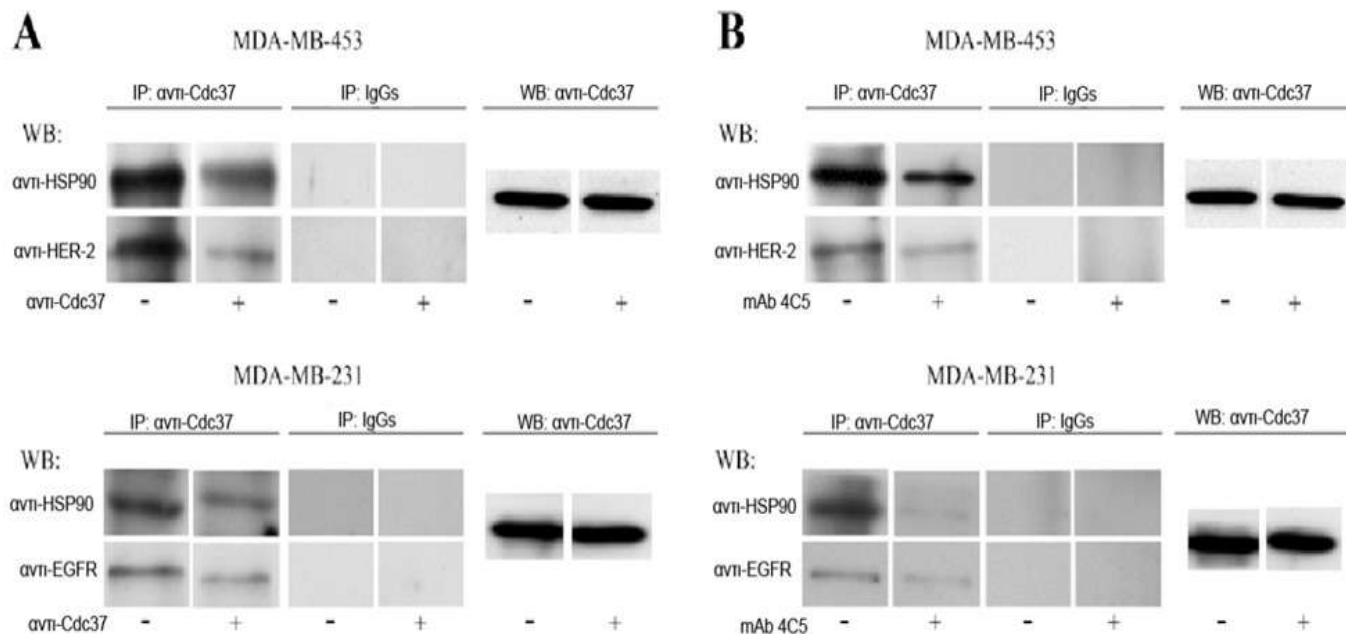
### **Γ.1.1. Η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με την επιφανειακή HSP90 στα MDA-MB 453 και MDA-MB231 κύτταρα**

Έχοντας ως δεδομένο από τη βιβλιογραφία πως η HSP90 αλληλεπιδρά με την Cdc37 ενδοκυτταρικά, διερευνήθηκε κατά πόσο ισχύει το γεγονός αυτό και στην κυτταρική επιφάνεια. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν μεμβρανικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα και ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Τα ανοσοσύμπλοκα που σχηματίστηκαν προσδέθηκαν στη συνέχεια σε σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G (protein G Sepharose beads). Τέλος, τα ανοσοκατακρημνίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της HSP90. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 12** ανιχνεύεται μια ανοσοενεργή ζώνη στα εκχυλίσματα που ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα που επώστηκαν με ανοσοσφαιρίνες έναντι της λειψμανιακής ιστόνης (αρνητικός μάρτυρας) δεν έδωσαν καμία ζώνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με την επιφανειακή HSP90.

### **Γ.1.2. Η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με τον HER-2 στα MDA-MB 453 κύτταρα και με τον EGFR στα MDA-MB 231**

Αφού είδαμε πως η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με την επιφανειακή HSP90 και έχοντας ως δεδομένο πως η HSP90 αλληλεπιδρά με την HER-2 διερευνήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HER-2 στην κυτταρική επιφάνεια. Για το σκοπό αυτό μεμβρανικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Στη συνέχεια, τα ανοσοκατακρημνίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της HER-2. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 12** ανιχνεύτηκε ανοσοενεργή ζώνη όταν τα εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Καμία ζώνη δεν ανιχνεύτηκε όταν η επώαση έγινε με ανοσοσφαιρίνες. Προχωρώντας ένα βήμα ακόμα εξετάστηκε η πιθανότητα ο EGFR να αλληλεπιδρά με την επιφανειακή Cdc37, καθώς ο EGFR, όπως και ο HER-2, αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (Epidermal Growth Factor Receptor family). Ανοσοκατακρήμνιση με αντι-Cdc37 αντίσωμα μεμβρανικών εκχυλισμάτων και ακόλουθη ανάλυση με ανοσοαποτύπωση με αντι-EGFR αντίσωμα έδειξε αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών στην επιφάνεια των MDA-MB 231 κύτταρα (**Εικόνα 12**).

Όπως δείχθηκε πιο πάνω, χρησιμοποιήθηκε ένα αντι-Cdc37 εμπορικό αντίσωμα το οποίο δεν ενδοκυτταρώνεται και μειώνει τη διήθηση των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων μέσω της πρόσδεσης του στην κυτταρική επιφάνεια. Για να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της αναχαίτισης της διήθησης, προστέθηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας για 16 ώρες, προτού ληφθούν τα μεμβρανικά εκχυλίσματα. Στη συνέχεια πραγματοποιώντας ανοσοκατακρημνίσεις, με ένα δεύτερο αντίσωμα έναντι της Cdc37, διαπιστώθηκε πως το Cdc37 στο υλικό καλλιέργειας μειώνει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην επιφανειακή HSP90 και την επιφανειακή Cdc37, και στις δυο κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, μειώνει και την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην επιφανειακή Cdc37 και τον HER-2 στα MDA-MB 453, καθώς και με την Cdc37 και τον EGFR στα MDA-MB-231 κύτταρα. Έχοντας ως δεδομένο από τις προηγούμενες πειραματικές παρατηρήσεις πως το αντι-Cdc37 αντίσωμα που προστέθηκε στην καλλιέργεια δεν ενδοκυτταρώνεται αλλά παραμένει δεσμευμένο στην κυτταρική επιφάνεια, επιβεβαιώνεται πως οι αλληλεπιδράσεις της Cdc37 που παρατηρούνται λαμβάνουν χώρο στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης.

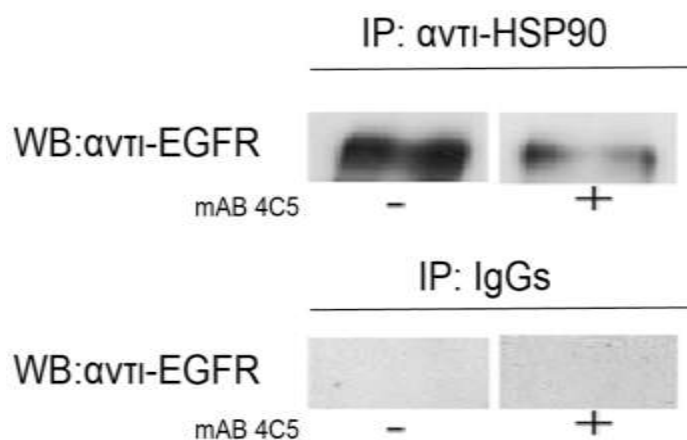


**Εικόνα 12: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειακών Cdc37-HSP90, Cdc37-HER-2 και Cdc37-EGFR.** Μεμβρανικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 ανοσοκατακρυμνίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Τα ανοσοκατακρυμνίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντι-HSP90, αντι-HER-2 και αντι-EGFR αντισώματα. Όταν στο υλικό κυτταροκαλλιέργειας προστέθηκε το αντι-Cdc37 αντίσωμα (A) οι αλληλεπιδράσεις της Cdc37 με τους πελάτες της αναχαιτίστηκαν. Με την προσθήκη όμως mAb 4C5 (B), δεν αναχαιτίστηκε μόνο η αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90, αλλά και η αλληλεπίδραση της Cdc37 με τον HER-2 και τον EGFR. Τα επίπεδα της επιφανειακής Cdc37 δε μεταβάλλονται με την προσθήκη αντι-Cdc37 αντισώματος, αλλά ούτε και με το mAb 4C5.

### **Γ.1.3. Τα συνοδά μόρια HSP90 και Cdc37 συμμετέχουν σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων**

Αφού πιστοποιήθηκε η αλληλεπίδραση της επιφανειακής Cdc37 με την επιφανειακή HSP90 και τις HER-2 και EGFR διερευνήθηκε η επίδραση του mAb 4C5 στις αλληλεπιδράσεις της Cdc37. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 12B**, επώαση των κυττάρων και των δύο καρκινικών σειρών με mAb 4C5 για 16 ώρες, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αλληλεπίδρασης άναμεσα στις Cdc37 και HSP90. Στο σημείο αυτό διερευνήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση της HSP90 με τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης EGFR. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 13** τα μεμβρανικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απο MDA-MB 231 κύτταρα ανοσοκατακρυμνίστηκαν με αντι-HSP90 αντίσωμα

και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντι-EGFR αντίσωμα, όπου φαίνεται πως η επιφανειακή HSP90 αλληλεπιδρά με τον EGFR υποδοχέα. Επιπλέον, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες παρουσία του mAb 4C5 η αλληλεπίδραση της HSP90 με τον EGFR μειώνεται σημαντικά. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την εξωκυττάρια αλληλεπίδραση των μορίων αυτών. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του mAb 4C5 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην Cdc37 και το HER-2, καθώς και με τη Cdc37 και τον EGFR στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα, αντίστοιχα.

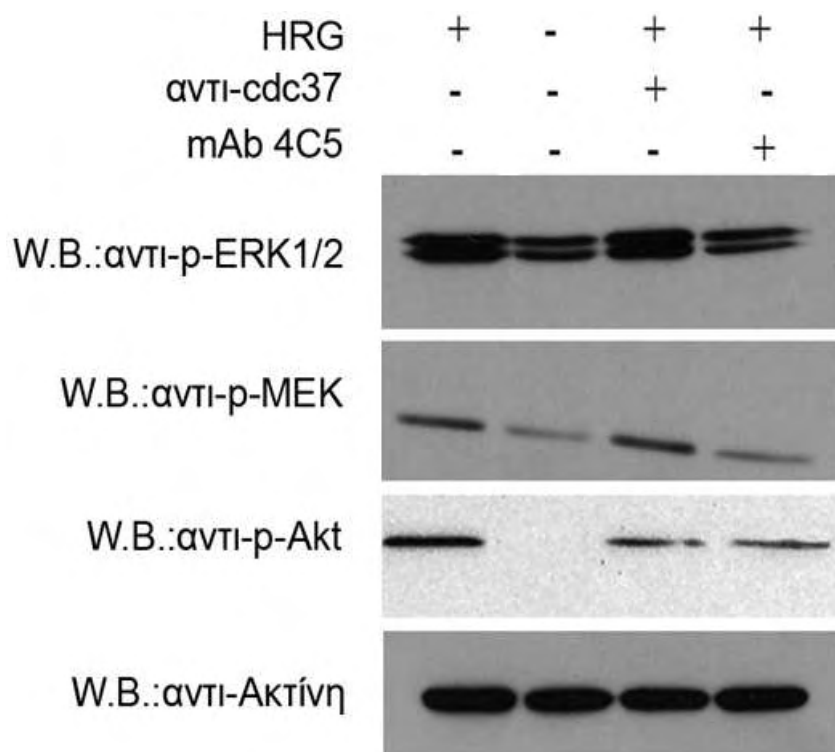


**Εικόνα 13: Η μεμβρανική HSP90 αλληλεπιδρά με τον EGFR.** Ο EGFR ανοσοκατακρυσνίζεται με την HSP90 σε μεμβρανικά εκχυλίσματα από MDA-MB 231 κύτταρα. Επίδραση με mAb 4C5 για 16 ώρες στα κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αλληλεπίδρασής τους.

#### **Γ.1.4. Μελέτη του ρόλου της επιφανειακής Cdc37 στη φωσφορυλίωση ενδοκυτταρικών κινασών - Μεταγωγή σήματος**

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο ρόλος της επιφανειακής Cdc37 στα κυτταροπλασματικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία επάγονται από τον HER-2 και τον EGFR μετά από ενεργοποίηση με HRG και EGF στα MDA-MB 453 και στα MDA-MB 231 κύτταρα, αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η φωσφορυλίωση των Akt, MEK και ERK1/2. Στο συγκεκριμένο πείραμα, κύτταρα επιστρώθηκαν σε φιάλες καλλιέργειας των 25cm<sup>2</sup>. Τα κύτταρα αφέθηκαν σε υλικό χωρίς όρο για 48 ώρες. Ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες ανά περίπτωση με 200μg/ml mAb 4C5, 200μg/ml αντι-Cdc37 αντισώματος και με σκέτο υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Το mAb 4C5 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας όσον αφορά τα MDA-MB 453 κύτταρα, αφού όπως είχε βρεθεί σε προηγούμενη εργασία, μειώνει τη

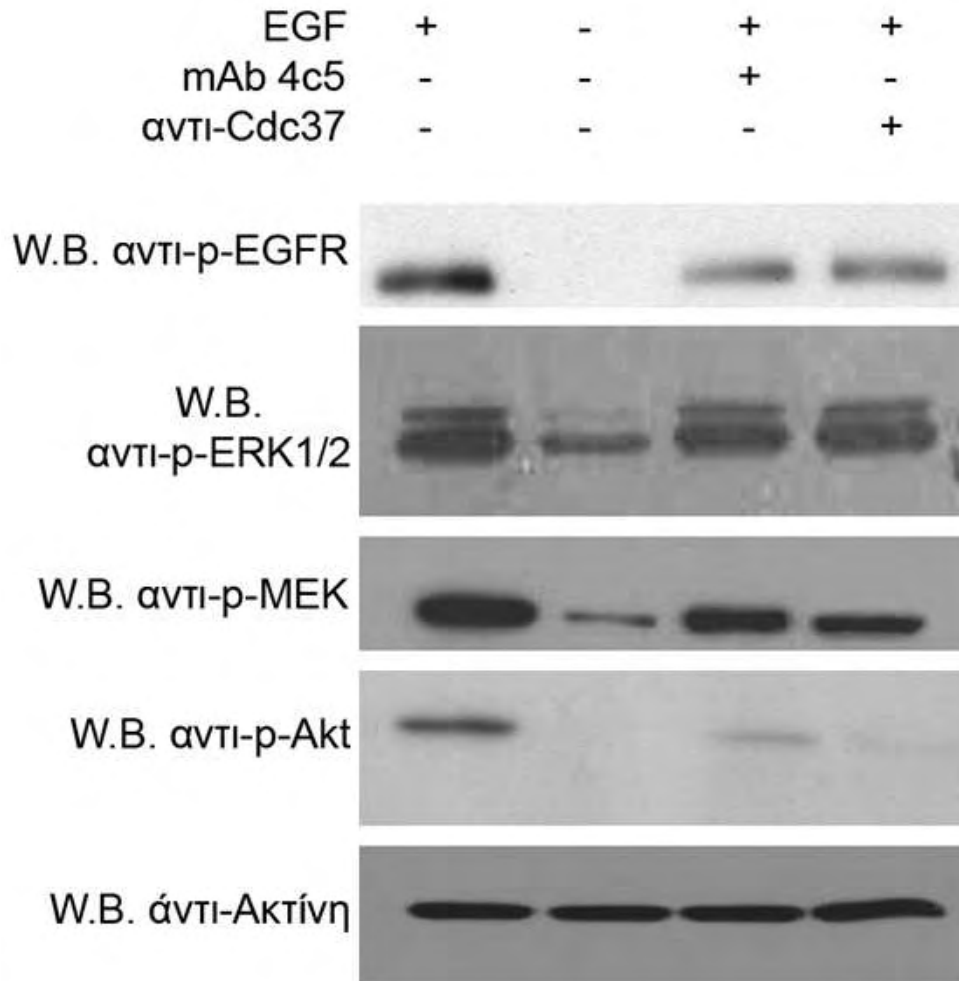
φωσφορυλίωση των ERK1/2, MEK και Akt [116]. Αφού αφαιρέθηκε το υλικό εκτέθηκαν σε 100 ng/ml HRG ή 30 ng/ml EGF για 20 λεπτά. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που λήφθηκαν εξετάστηκαν με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων κινασών Akt, MEK και ERK1/2. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 14**, η φωσφορυλίωση των MEK, ERK1/2 και της Akt μειώνονται όταν τα κύτταρα επωαστούν με mAb 4C5, ενώ μετά από επώαση με το αντι-Cdc37 επηρεάζεται μόνο η φωσφορυλίωση της Akt. Ανοσοαποτύπωμα με αντίσωμα έναντι της ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο των ολικών πρωτεϊνών που φορτώθηκαν στο πήκτωμα.



**Εικόνα 14: Μελέτη της επίδρασης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 στη μεταγωγή σήματος σε MDA-MB 453 κύτταρα.** Μελέτη της φωσφορυλίωσης κινασών που συμμετέχουν στο μηχανισμό μεταγωγής σήματος του HER-2, MEK, ERK1/2 και Akt. Όταν απενεργοποιείται η επιφανειακή Cdc37, μόνο η φωσφορυλίωση της Akt μειώνεται, ενώ με την απενεργοποίηση της HSP90 μειώνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης και των τριών κινασών.

Στα MDA-MB 231 κύτταρα, όπως φαίνεται στην **εικόνα 15** το mAb 4C5 προκαλεί μείωση στη φωσφορυλίωση του EGFR και της καταρροϊκής κινάσης Akt, όπως και το αντι-Cdc37 αντίσωμα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η λειτουργική παρεμπόδιση των επιφανειακών HSP90 και

Cdc37 με τα αντίστοιχα προαναφερθέντα αντισώματα άφησε ανεπηρέαστη τη φωσφορλίωση των ERK1/2.



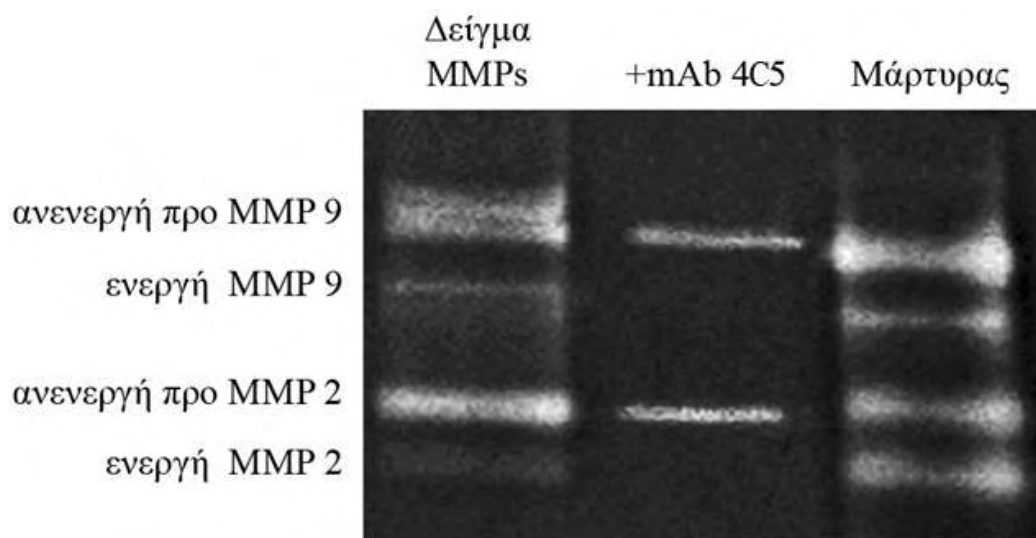
**Εικόνα 15: Μελέτη της επίδρασης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 στη μεταγωγή σήματος στα MDA-MB 231 κύτταρα.** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από MDA-MB 231 τα οποία επώαστηκαν όπως περιγράφεται πιο πάνω, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του φωσφορλιωμένου υποδοχέα EGFR καθώς και των φωσφορλιωμένων κινασών ERK1/2, MEK και Akt. Ανοσοαποτύπωμα με αντίσωμα έναντι της ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο των ολικών πρωτεϊνών που φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Επώαση των κυττάρων με mAb 4C5 είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων φωσφορλίωσης του EGFR καθώς και των κυτταρικών κινασών MEK και Akt. Επώαση με αντι-Cdc37 είχε επίσης ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων φωσφορλίωσης του EGFR καθώς και των MEK και Akt. Η φωσφορλίωση των ERK1/2 δεν παρουσίασε καμία μεταβολή όταν τα κύτταρα επώαστηκαν είτε με το αντι-Cdc37 αντίσωμα είτε με το mAb 4C5.

### **Γ.1.5. Μελέτη του ρόλου της εξωκυττάριας HSP90 στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9**

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (Κεφάλαιο Γ.), οι μεταλλοπρωτεάσες συμμετέχουν στη διαδικασία της καρκινικής διήθησης-μετάστασης. Ειδικότερα οι MMP-2 και MMP-9 διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε μεταστατικά φαινόμενα στο καρκινικό του μαστού [120]. Επιπλέον οι Eustace *et al.* είχαν δείξει πως η εξωκυττάρια HSP90 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της MMP-2 και κατ' επέκταση της διεισδυτικότητας των καρκινικών κυττάρων [28].

#### **Γ.1.5.1. Η εξωκυττάρια HSP90 συμβάλει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 που εκκρίνονται από τα MDA-MB 453 κύτταρα**

Σε παράλληλη εργασία του εργαστηρίου μας, παρατηρήσαμε πως τόσο η HSP90α όσο και η HSP90β εκκρίνονται στο υλικό καλλιέργειας των MDA-MB 453 κυττάρων. Θελήσαμε στη συνέχεια να εξετάσουμε την πιθανή επίδραση της εκκρινόμενης HSP90 στην εκκρινόμενες MMP-2 και MMP-9. Στη συγκεκριμένη εργασία δείξαμε πως η εξωκυττάρια HSP90 αλληλεπιδρά τόσο με τις ανενεργές όσο και με τις ενεργές μορφές των MMP-2 και MMP-9. Επίδραση με mAb 4C5 είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των MMP-2 και MMP-9 όπως φάνηκε τόσο με ανοσοαποτύπωση όσο και με την τεχνική της ζυμογραφίας. Στη συγκεκριμένη τεχνική, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (10%) το οποίο περιέχει και ζελατίνη (5%). Ακολούθως, τα ένζυμα ενεργοποιούνται μετά από κατεργασία ρυθμιστικών διαλυμάτων και οι ζώνες των ενεργών ενζύμων αλλά και των προ-ενζύμων εμφανίζονται στο πήκτωμα ύστερα από χρώση με Coomassie Brilliant Blue (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, Κεφάλαιο Β.5.). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 16**, παρουσία mAb 4C5 στο υλικό καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των MMP-2 και MMP-9 στα MDA-MB 453 κύτταρα.

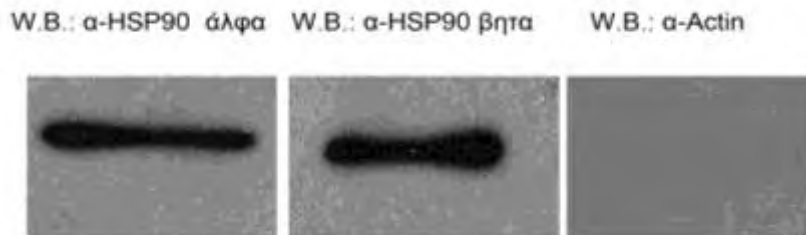


**Εικόνα 16:** Η εκκρινόμενη HSP90 συμβάλλει στην ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9. Πρωτεΐνες από συμπυκνωμένα υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων παρουσία ή απουσία 200 µg/ml mAb 4C5 αναλύθηκαν με τη τεχνική της ζυμογραφίας.

#### **Γ.1.5.2. Η HSP90 εκκρίνεται στο υπερκείμενο των κυττάρων MDA-MB 231 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9**

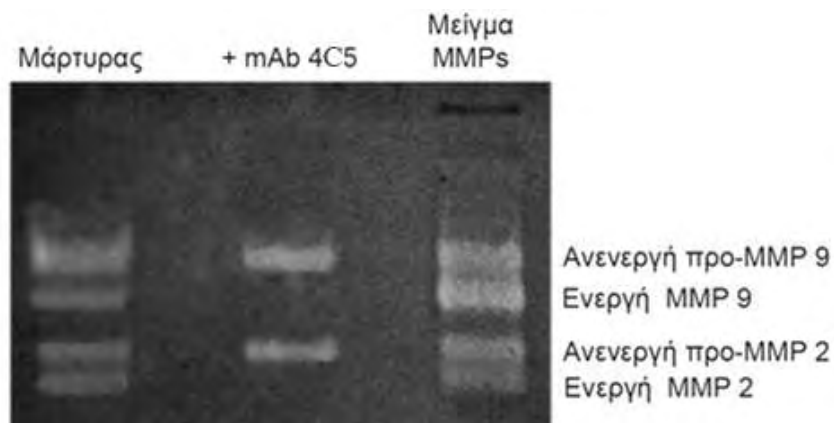
Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε και η έκκριση της HSP90 από τα MDA-MB 231 καρκινικά κύτταρα. Σε αυτό το πείραμα αφού καλλιεργήθηκαν κύτταρα MDA-MB 231 σε πυκνότητα 80%, ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS ώστε τα νεκρά και αιωρούμενα κύτταρα να απομακρυνθούν. Ακολούθως τα κύτταρα αφέθηκαν σε υλικό καλλιέργειας χωρίς ορό για 24 ώρες. Την επομένη το υλικό συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε με τη χρήση ειδικών φίλτρων. Το συμπυκνωμένο υλικό αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 17**, τόσο η HSP90α όσο και η ισομορφή της HSP90β εντοπίζονται στο συμπυκνωμένο μέσο καλλιέργειας. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση στο ίδιο υλικό με αντίσωμα έναντι της ακτίνης δεν έδωσε καμία ζώνη. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως οι HSP90 α και β στο υλικό δεν προέρχονται από λύση κυττάρων αλλά εκκρίνονται σε αυτό.





**Εικόνα 17: Η HSP90α και HSP90β εκκρίνονται στο υλικό καλλιέργειας των MDA-MB 231 κυττάρων.** Συμπυκνωμένο υλικό καλλιέργειας από MDA-MB 231 κύτταρα αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση. Εντοπίζονται και οι δύο ισομορφές της HSP90, ενώ η ακτίνη απουσιάζει.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση του mAb 4C5 στην ενεργότητα των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 με την τεχνική της ζυμογραφίας. Τα κύτταρα, αφού ξεπλύθηκαν 3 φορές επώαστηκαν για 16 ώρες με υλικό καλλιέργειας απουσία ορού (μάρτυρας) ή παρουσία 200μg/ml mAb 4C5. Αφού συλλέχτηκε το υλικό από τις δύο ομάδες συμπυκνώθηκε με ειδικά φίλτρα φυγοκέντρησης και το υλικό αναλύθηκε με ζυμογραφία. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 18**, παρουσία mAb 4C5 μόνο οι ανενεργές μορφές των MMP-2 και MMP-9 εντοπίζονται. Όπως στα MDA-MB 453 κύτταρα, έτσι και στα MDA-MB 231 η εξωκυττάρια HSP90 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9.



**Εικόνα 18: Η εξωκυττάρια HSP90 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9 στα κύτταρα MDA-MB 231.** Τα υπερκείμενα από καλλιέργειες MDA-MB 231 κυττάρων απουσία ή παρουσία mAb 4C5 αναλύθηκαν με ζυμογραφία. Μόνο οι ανενεργές μορφές των MMP-2 και MMP-9 ανιχνεύονται παρουσία mAb 4C5, ενώ στην καλλιέργεια μάρτυρα ανιχνεύονται και οι δύο μορφές των μεταλλοπρωτεασών.

## **Δ. *In vivo* μελέτη του ρόλου της επιφανειακής συνοδής πρωτεΐνης HSP90 στη μεταστατική συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων**

Στην παρούσα εργασία έχει τεκμηριωθεί ο ρόλος της εξοκυττάριας HSP90 στη διηθητική συμπεριφορά των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vitro*. Ειδικότερα έχει δειχθεί ότι το mAb 4C5 αναστέλλει σημαντικά τη διηθητική ικανότητα των προαναφερθέντων κυττάρων. Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση του σε *in vivo* πειράματα μελέτης της διηθητικής-μεταστατικής συμπεριφοράς των καρκινικών αυτών σειρών. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια SCID, το κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ανεπαρκής κυτταρική και χυμική ανοσία.

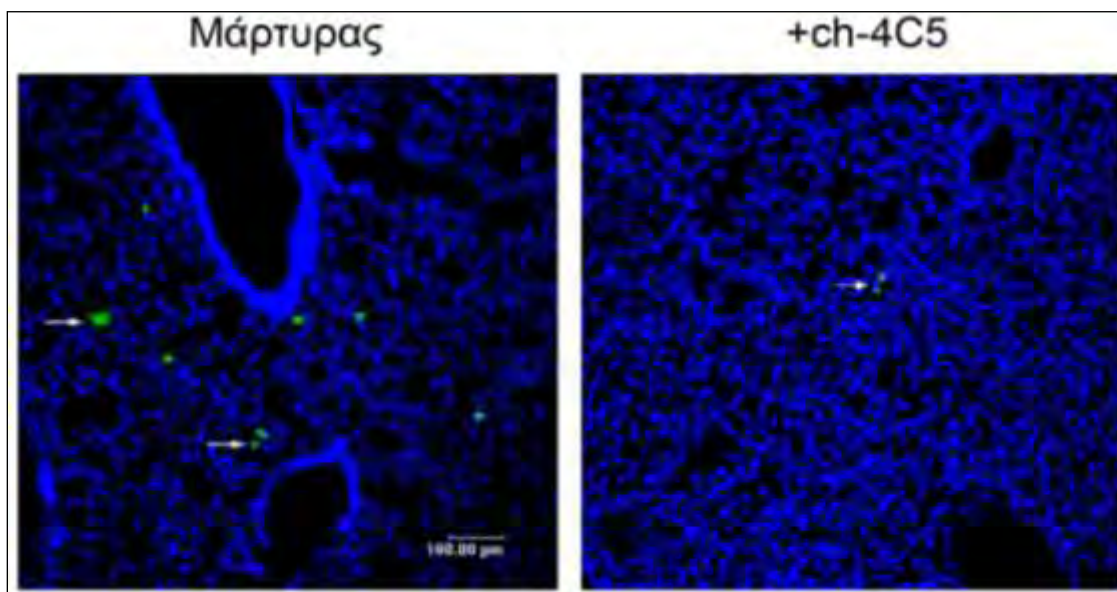
### **Δ.1. *In vivo* μελέτη της παρεμπόδισης μεταστατικής απόθεσης των MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια SCID**

Λαμβάνοντας υπόψη βιβλιογραφικά δεδομένα όλα τα προηγούμενα *in vitro* πειραματικά δεδομένα, τόσο από προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου μας όσο και από την παρούσα μελέτη, προχωρήσαμε στην *in vivo* μελέτη της παρεμπόδισης της μεταστατικής απόθεσης των MDA-MB 453 κυττάρων στους πνεύμονες ποντικών, μέσω της λειτουργικής αναχαίτισης της HSP90 από το mAb 4C5.

Το συγκεκριμένο πείραμα έγινε σύμφωνα με τους Heimburg *et al.* [121]. Πριν τη χορήγηση, τα κύτταρα επώαστηκαν ζωντανά για 2 ώρες παρουσία ή απουσία 200μg/ml χμιαϊκού αντισώματος ch-mAb 4C5, το οποίο παρουσιάζει τις ίδιες ιδιότητες με το mAb 4C5 [114]. Ακολούθως, αφού ξεπλύθηκαν με θρεπτικό υλικό, επώαστηκαν για 1 ώρα με τη χρωστική DiO, η οποία προσδέεται στα κυτταρικά λιπίδια. Ξεπλύθηκαν με στείρο PBS, συλλέχθηκαν και αναδιαλύθηκαν πάλι σε στείρο PBS. Η χορήγηση των κυττάρων στα ζώα έγινε ενδοφλέβια, στην πλευρική ουραία φλέβα. Χορηγήθηκαν  $2 \times 10^6$  κύτταρα σε κάθε ζώο. Μετά από 12 ώρες τα ζώα θανατώθηκαν με ατμούς ισοφλουρανίου και αμέσως συνδέθηκε περισταλτική αντλία στην αριστερή κοιλία της καρδιάς του ζώου, μέσω της οποίας διοχετεύτηκαν 100ml PBS, ώστε να απομακρυνθεί όλο το αίμα. Ταυτόχρονα, με τον τρόπο αυτό απομακρύνθηκαν και όλα τα κύτταρα MDA-MB 453 που υπήρχαν είτε ελεύθερα στη κυκλοφορία είτε σε ιστούς χωρίς να έχουν εδραιωθεί. Τα ζώα μονιμοποιήθηκαν με 100ml παραφολμαδεύδης (4%). Αφού αφαιρέθηκαν οι πνεύμονες, επώαστηκαν στους 4°C για 24 ώρες σε διάλυμα σουκρόζης (30%), το οποίο λειτούργησε ως κρυοπροστατευτικό μέσο. Στη συνέχεια, οι πνεύμονες τοποθετήθηκαν

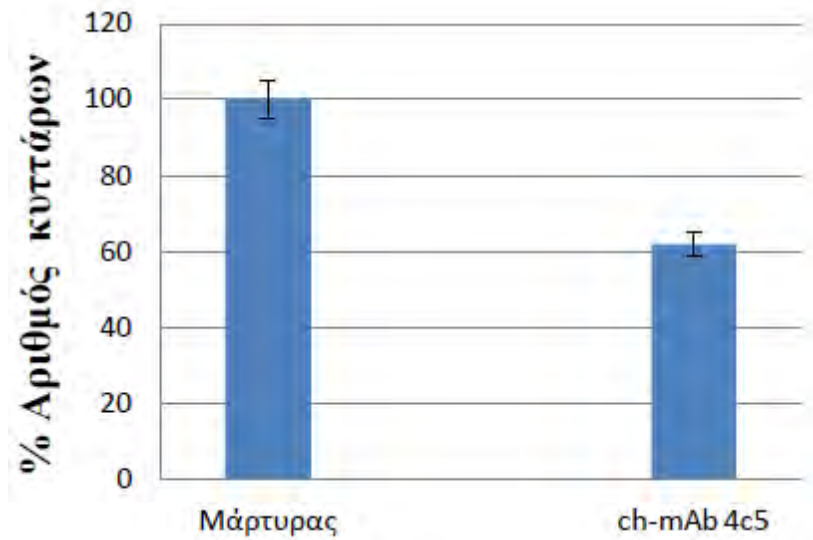
σε μέσο παγώματος ιστών (OCT) και μεταφέρθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Οι ιστοί κόπηκαν σε τομές των  $10\mu\text{m}$  με τη βοήθεια κρυοστάτη και αφού χρώστηκαν με TPR3 παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου και έγινε καταμέτρηση των MDA-MB 453 κυττάρων σε κάθε πνεύμονα.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 19**, τα ζώα στα οποία χορηγήθηκαν κύτταρα επωασμένα με το ch-mAb 4C5, παρουσίασαν μικρότερο αριθμό μεταστατικών αποθέσεων στους πνεύμονες τους σε σχέση με τους μάρτυρες.



**Εικόνα 19: Παρεμπόδιση της εναπόθεσης MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων στους πνεύμονες ποντικού από το mAb 4C5.** Τομές από πνεύμονες ποντικών SCID στα οποία χορηγήθηκαν ανθρώπινα MDA-MB 453 κύτταρα, τα οποία είτε είχαν επωαστεί με αντίσωμα ch- mAb 4C5 (+ch-4C5) είτε όχι (μάρτυρας). Και οι δύο ομάδες κυττάρων είχαν σημειωθεί με τη φθορίζουσα ουσία DiO. Παρατηρείται σημαντική μείωση των μεταστατικών αποθέσεων στους πνεύμονες που είχαν χορηγηθεί κύτταρα με ch-mAb 4C5.

Ποσοτικοποίηση του πειράματος, έδειξε 38% ανάσχεση των μεταστατικών αποθέσεων από το ch-mAb 4C5 (**Σχήμα 2**). Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα συγκεκριμένα ποντίκια είναι ουσιαστικά ανοσοκατασταλμένα, οπότε η διαφορά που παρατηρείται δεν οφείλεται σε ανοσολογική απόκριση έναντι του ch-mAb 4C5. Επιπλέον, το πείραμα αυτό εξετάζει τη διήθηση και απόθεση των καρκινικών κυττάρων και όχι το σχηματισμό καρκινικών όγκων.

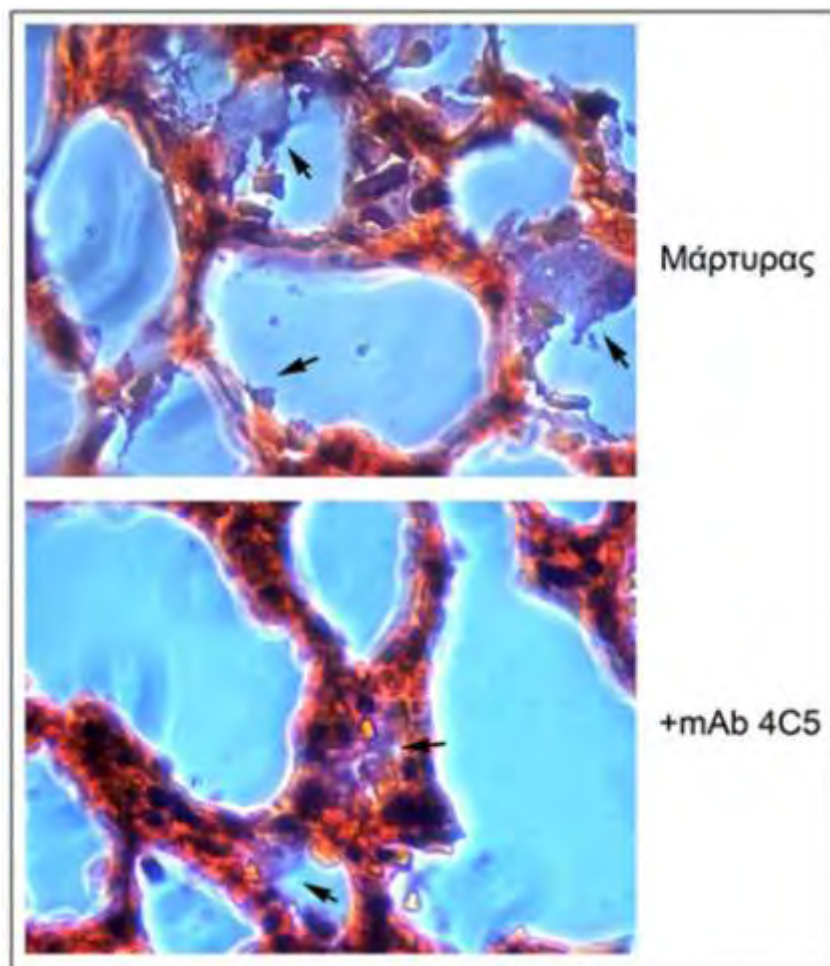


**Σχήμα 2: Αναχαίτιση του σχηματισμού μεταστατικών αποθέσεων.** Η ποσοτικοποίηση της ανάσχεσης σχηματισμού μεταστατικών αποθέσεων από το ch-mAb 4C5 έδειξε μείωση κατά 38%. Η στατιστική ανάλυση με Student's *T* test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά με  $P < 0,005$ .

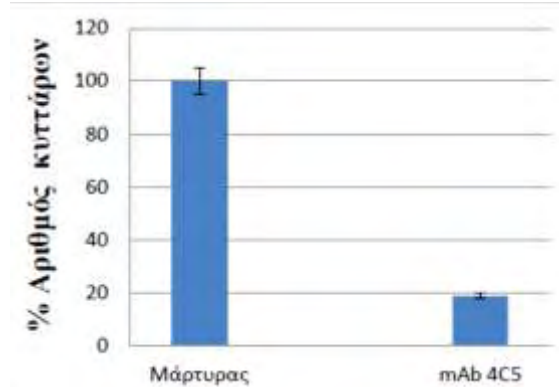
#### **Δ.2. *In vivo* μελέτη της παρεμπόδισης της μεταστατικής συμπεριφοράς των MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια SCID**

Σε συνέχεια με το προηγούμενο πείραμα, εξετάστηκε η παρεμπόδιση σχηματισμού όγκων μέσω της απενεργοποίησης της επιφανειακής HSP90. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν MDA-MB 231 κύτταρα, τα οποία προέρχονται από ανθρώπινο όγκο μαστού και μπορούν να σχηματίσουν όγκους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Εφαρμόστηκε το ευρέως διαδεδομένο μεταστατικό μοντέλο [115] σύμφωνα με το οποίο χορηγήθηκαν  $5 \times 10^5$  κύτταρα MDA-MB 231 ενδοφλέβια στην πλευρική ουραία φλέβα ποντικών SCID. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και την αμέσως επόμενη μέρα της χορήγησης των κυττάρων, η μία ομάδα ξεκίνησε να λαμβάνει 200μg αντισώματος mAb 4C5 και η άλλη 200μl PBS (μάρτυρας), σε καθημερινή βάση για 15 μέρες. Τόσο το αντίσωμα όσο και το PBS χορηγούνταν σε μορφή ενέσιμου διαλύματος ενδοπεριτοναϊκά. Ακριβώς 7 εβδομάδες μετά τη λήψη των κυττάρων, τα ζώα θυσιάστηκαν, συλλέχθηκαν οι πνεύμονες και μονιμοποιήθηκαν με παραφίνη. Ακολούθως οι ιστοί αυτοί κόπηκαν με μικροτόμο σε τομές των 10μm και αναλύθηκαν με ιστοχημεία.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 20**, τόσο ο αριθμός των σχηματιζόμενων μεταστατικών εστιών όσο και το μέγεθος τους διαφέρουν κατά μεγάλο βαθμό στα ζώα που δέχθηκαν mAb 4C5 για 15 συνεχόμενες μέρες. Η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος αυτού (**σχήμα 3**) έδειξε 81% λιγότερα κύτταρα στους πνεύμονες των ζώων που έλαβαν mAb 4C5.



**Εικόνα 20: Μείωση της δημιουργίας μεταστατικών εστιών MDA-MB 231 κυττάρων στους πνεύμονες ποντικού από το mAb 4C5.** Τομές από πνεύμονες ποντικών SCID ύστερα απο ενδοφλέβια χορήγηση MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων, το οποία είτε είχαν λάβει αντίσωμα mAb 4C5 (+mAb 4C5) είτε όχι (μάρτυρας). Με βέλη διακρίνεται ο σχηματισμός όγκων χρώματος μωβ. Χρώση αιματοξυλίνης-εωζίνης. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (x40).



**Σχήμα 3: Αναχαίτιση της δημιουργίας μεταστατικών εστιών.** Η ποσοτικοποίηση της ανύψωσης σχηματισμού μεταστατικών εστιών έδειξε μείωση κατά 81% στα ζώα που δέχτηκαν mAb 4C5 σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Η στατιστική ανάλυση με Student's *T* test έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά με  $P < 0,005$ .

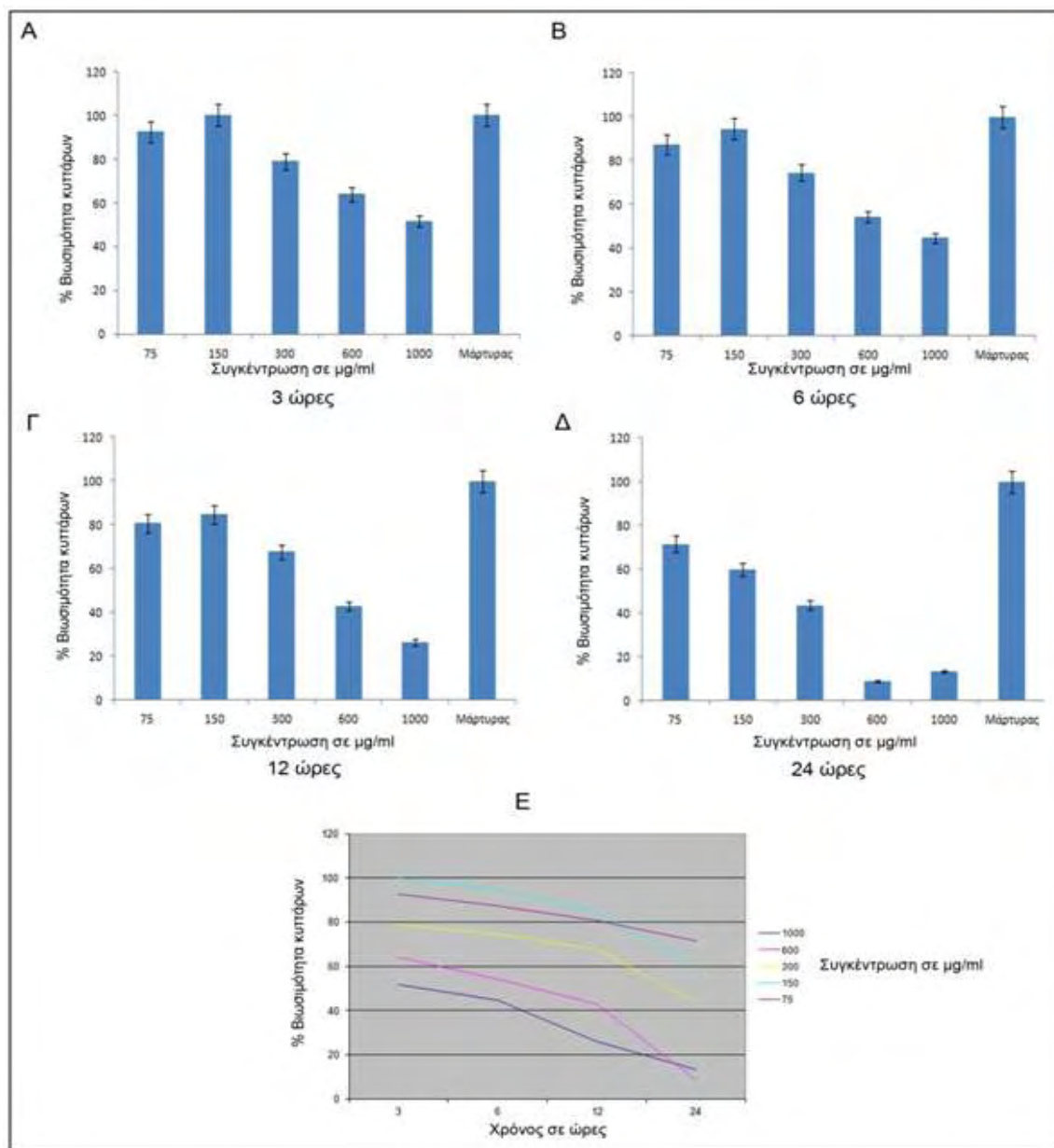
## **Ε. Μελέτη φυσικού εκχυλίσματος στη βιοχημεία του καρκίνου**

Τα τελευταία χρόνια καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια στη μελέτη φυσικών προϊόντων και παράγωγων τους (ανάλογα-analogues) σε σχέση με τις πιθανές θεραπευτικές τους ιδιότητες τόσο στον καρκίνο όσο και σε άλλες νόσους. Αρκετά από αυτά φαίνεται να παρουσιάζουν αξιόλογη φαρμακευτική δράση. Παράδειγμα αποτελεί η γελδαναμυκίνη (geldanamycin), αναστολέας της HSP90 που παράγεται από τον *Streptomyces hygroscopicus*, και τα παράγωγα της 17-AAG και 17-DMAG. Σε ερευνητικό επίπεδο, αξιόλογη δράση παρουσιάζουν επίσης τα φυτικά εκχυλίσματα όπως η κουρκουμίνη, η Withaferin A, η Celastrol και η ρεζβερατρόλη. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του φυτού *Vitis vinefera* (σταφύλι) σε καρκινικά κύτταρα μαστού.

### **Ε.1. Επίδραση στη βιωσιμότητα των MDA-MB 453 κυττάρων**

Το πρώτο βήμα που έγινε ήταν η μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό, MDA-MB 453 κύτταρα επώαστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις με το εκχύλισμα και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (time points). Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη χρωστική Alamar Blue, κύριο συστατικό της οποίας είναι η resazurin (μπλε χρώμα) που μεταβολίζεται από τα υγιή και ζωντανά κύτταρα σε resorufin

(φθορίζον κόκκινο χρώμα). Ακολούθως, με φασματοφωτόμετρο γίνεται μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 570 nm. Η βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εκατοστιαίο ποσοστό της απορρόφησης του κάθε δείγματος ως προς το δείγμα μάρτυρα. Μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος σε συγκεντρώσεις 75μg/ml, 150μg/ml, 300μg/ml, 600μg/ml και 1000μg/ml σε χρόνους έκθεσης των 3, 6, 12 και 24 ωρών. Όπως φαίνεται **σχήμα 4**, ήδη στις 3 ώρες έκθεσης, το 37% των κυττάρων δεν είναι ζωντανό στη συγκέντρωση των 1000μg/ml.



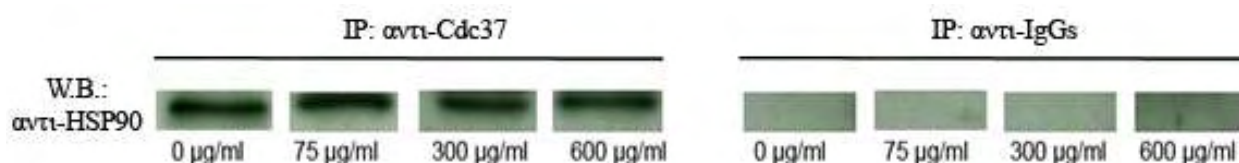
**Σχήμα 4: Επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του *Vitis vinefera* στην επιβίωση των MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων. Επίδραση στα κύτταρα για 3 ώρες (Α), 6 ώρες (Β), 12 ώρες (Γ)**

και 24 ώρες (Δ) με εκχύλισμα από *Vitis vinifera* σε συγκεντρώσεις 75μg/ml, 150μg ml, 300μg/ml, 600μg/ml και 1000μg/ml. (E)= συγκεντρωτικά αποτελέσματα της βιωσιμότητας σε σχέση με το χρόνο και την συγκέντρωση.

Όπως φαίνεται στο **σχήμα 4**, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη επίδραση της βιωσιμότητας με τα μέγιστα της κυτταρικής νέκρωσης να παρουσιάζονται στις 24 ώρες (**σχήμα 4Δ και 4Ε**).

## E.2. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στις συνοδές πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (Κεφάλαιο A.4.3), ουσίες όπως η Withaferin A μπορούν και αναχαιτίζουν την αλληλεπίδραση των Cdc37-Hsp90 ενδοκυτταρικά, κάτι που οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα στην απόπτωση. Διερευνήθηκε μια παρόμοια πιθανή δράση από το εκχύλισμα αυτό στα MDA-MB 453. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με διάλυμα εκχυλίσματος στις συγκεντρώσεις 75μg/ml, 300μg/ml και 600μg/ml. Ακολούθως, τα νεκρά κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS, και τα παραμένοντα ζωντανά κύτταρα λύθηκαν με διάλυμα λύσης. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φωτομετρήθηκαν και ίσες ποσότητες ολικών πρωτεϊνών ανοσοκατακρυσμίστηκαν με αντι-Cdc37 αντίσωμα. Τα ανοσοκατακρημνίσματα αναλύθηκαν με ανασοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντι-HSP90 αντίσωμα.

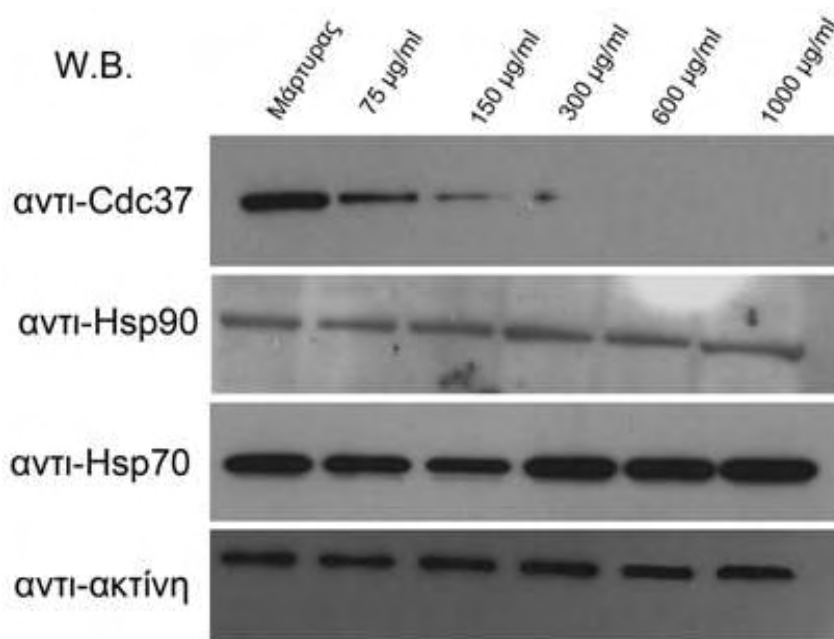


**Εικόνα 21: Διερεύνηση πιθανής αναχαιτίσης της αλληλεπίδρασης των Cdc37 και HSP90 από εκχύλισμα *Vitis vinifera*.** Το φυτικό εκχύλισμα δεν έχει κάποια επίδραση στην αναχαιτίση της αλληλεπίδρασης μεταξύ Cdc37 και HSP90, καθώς ίσες ποσότητες HSP90 ανοσοκατακρυσμίζονται με τη Cdc37.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 21**, δεν παρατηρήθηκε αναχαιτίση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Cdc37- Hsp90. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών Cdc37, HSP90 καθώς και της HSP70, σε όλες τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Στην **εικόνα 22** παρατηρείται δραστική μείωση των επιπέδων της Cdc37 αυξανόμενης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, ενώ τα επίπεδα της HSP90 παραμένουν αμετάβλητα. Η HSP70, φαίνεται πως



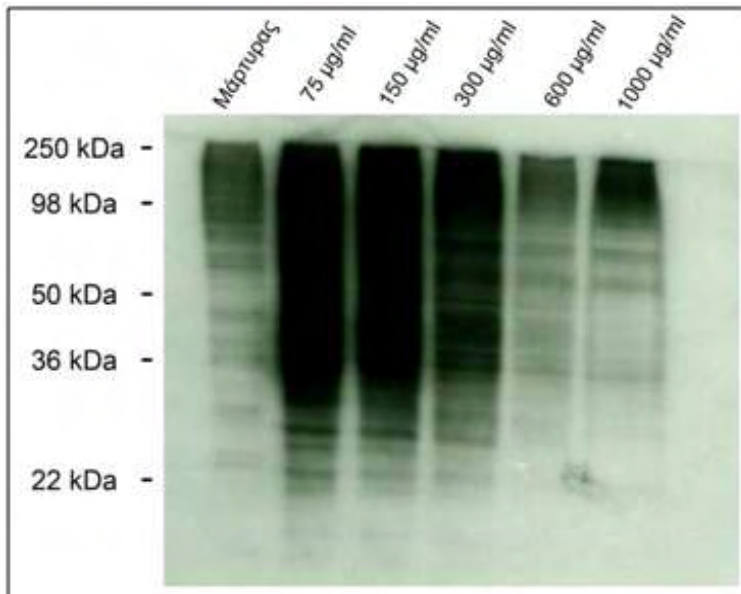
μειώνεται μέχρι τα 175μg/ml και έπειτα αυξάνεται σε επίπεδα υψηλότερα από εκείνα του μάρτυρα.



**Εικόνα 22: Επίδραση του εκχυλίσματος στα επίπεδα των συνοδών πρωτεϊνών Cdc37, HSP90 και HSP70.** Τα επίπεδα της Cdc37 μειώνονται δραματικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, σε αντίθεση με την HSP90 τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά, ενώ η HSP70 μειώνεται στα 150μg/ml και ακολούθως αυξάνεται. Όπως φαίνεται από το ανοσοαποτύπωμα της ακτίνης, ηλεκτροφορήθηκαν ίσες ποσότητες ολικών πρωτεϊνών.

### **E.3. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στην ουμπικιτώση των κυτταρικών πρωτεϊνών**

Γνωρίζοντας το ρόλο της HSP70 σε σχέση με το κυτταρικό στρες (αύξηση των επιπέδων της), αλλά και τη συμμετοχή της στα μονοπάτια της κυτταρικής πρωτεόλυσης, εξετάστηκαν τα επίπεδα ουμπικυτώσης, που ως γνωστόν αυξάνονται προτού οι πρωτεΐνες οδηγηθούν για αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα.



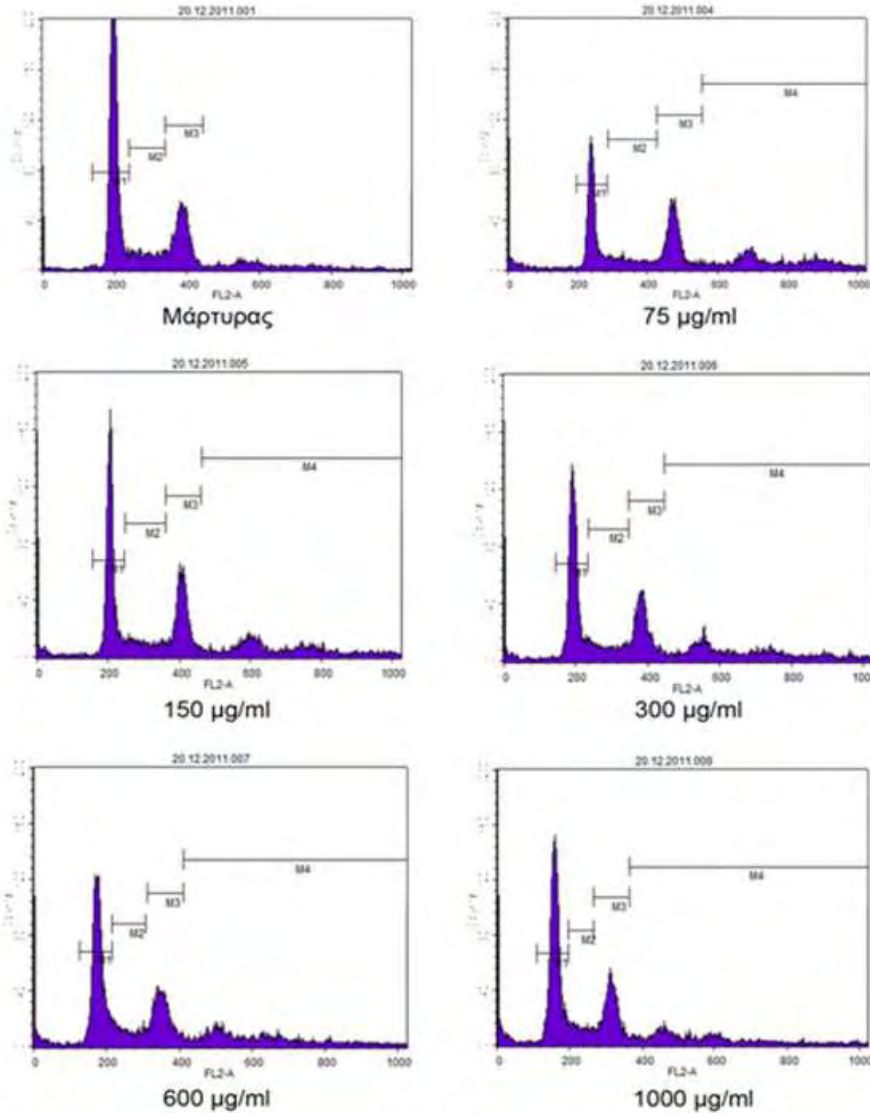
**Εικόνα 23:** Ουμπικιτίωση των πρωτεϊνών στα MDA-MB 453 κύτταρα μετά από επίδραση εκχυλίσματος καρπού *Vitis vinifera*.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 23**, η επίδραση του εκχυλίσματος καρπού του *Vitis vinifera*, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ουμπικιτίωσης των πρωτεϊνών, από τις συγκεντρώσεις 75µg/ml έως τη συγκέντρωση 300µg/ml. Στα 600µg/ml και 1000µg/ml η ουμπικιτίωση υποχωρεί στο μεγαλύτερο κλάσμα των πρωτεϊνών, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες με μοριακό βάρος από 250 kDa έως 98 kDa περίπου. Η μέγιστη ουμπικιτίωση παρατηρείται στη συγκέντρωση των 75µg/ml.

#### **Ε.4. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στο κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων**

Για να διαλευκανθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης του εκχυλίσματος στα καρκινικά κύτταρα, μελετήθηκε η επίδραση του στον κυτταρικό κύκλο. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροή (FACS). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού και επώαστηκαν για 6 ώρες με εκχύλισμα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με αλκοόλη (70%), κατεργάστηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide) παρουσία RNAάσης και αναλύθηκαν. Η αρχή της ανάλυσης στηρίζεται στο γεγονός πως το ιωδιούχο προπίδιο δεσμεύεται μη ειδικά στο μόριο DNA με στοιχειομετρική αναλογία 1 μόριο προς 4-5 βάσεις DNA. Η ιδιότητα του να φθορίζει όταν διεγείρεται στα 488nm

ενισχύεται κατά 20-30 φορές. Το κυτταρόμετρο ροής μπορεί να μετράει με αυτό τον τρόπο το περιεχόμενο DNA του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 24**, με την επίδραση του εκχυλίσματος ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων (σε όλες τις συγκεντρώσεις) δεν μπορεί να ολοκληρώσει τη μίτωση, παρόλο που το DNA εξακολουθεί τους να διπλασιάζεται. Το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων αυτών παρατηρείται στη συγκέντρωση των 75μg/ml. Αντίστοιχα, το μικρότερο ποσοστό παρουσιάζεται στις συγκεντρώσεις των 600μg/ml και 1000μg/ml, όπου ταυτόχρονα παρουσιάζουν το υψηλότερο ποσοστό στην G1 φάση.



C= 0 µg/ml											C=75 µg/ml										
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch	Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
M1	136	242	5229	52.39	100.00	192.81	197.72	6.43	197.00	196	M1	196	296	2219	23.19	23.19	240.71	240.20	5.76	239.96	237
M2	242	348	1030	10.30	10.30	291.41	288.93	10.04	282.00	289	M2	286	426	887	8.97	8.97	351.76	349.03	11.54	348.86	328
M3	348	444	2290	22.89	22.89	384.58	384.90	5.30	385.00	385	M3	426	554	2173	21.73	21.73	473.72	473.14	5.90	471.80	475
M4											M4	554	5223	3954	39.54	39.54	670.36	651.67	17.79	602.00	5223

C=150 µg/ml											C=300 µg/ml										
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch	Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
M1	157	246	3139	31.39	100.00	208.36	205.86	6.09	205.86	206	M1	144	233	3257	32.57	32.57	193.54	193.97	7.00	192.00	190
M2	246	359	929	9.29	9.29	302.48	300.58	10.82	300.00	308	M2	235	345	997	9.67	9.67	288.28	286.30	11.56	289.00	236
M3	359	499	2287	23.87	23.87	409.15	404.71	4.68	405.00	400	M3	345	447	1932	19.22	19.22	364.65	364.29	6.46	362.00	362
M4	499	5223	3198	31.88	31.88	775.88	752.38	24.33	754.00	5223	M4	447	5223	3375	33.75	33.75	758.54	730.80	26.84	720.00	5223

C=600 µg/ml											C=1000 µg/ml										
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch	Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
M1	127	216	3622	36.22	100.00	217.05	216.43	8.42	216.00	179	M1	111	180	3630	36.30	36.30	188.65	188.07	8.05	188.00	159
M2	216	308	811	8.11	8.11	259.09	257.57	10.85	258.00	226	M2	186	280	787	7.87	7.87	228.74	227.82	8.98	227.00	200
M3	308	411	2093	20.93	20.93	351.60	351.10	6.49	348.00	340	M3	283	364	2098	20.98	20.98	311.04	310.20	8.84	311.00	311
M4	411	5223	2827	28.27	28.27	687.88	689.26	29.68	638.00	5223	M4	364	5223	2391	23.85	23.85	846.45	838.31	33.01	834.00	5223

**Εικόνα 24:** Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επίδρασης του εκχυλίσματος στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453. M1. κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, M2. κύτταρα στην S φάση, M3. κύτταρα στην G2/M φάση, M4. κύτταρα που δεν μπορούν να ολοκληρώσουν τη μίτωση.

## IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι συνοδές πρωτεΐνες (chaperones) αποτελούν μια ομάδα μορίων απαραίτητων για τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών που απαντάται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Ο ρόλος τους έγκειται στη σωστή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, την ενδοκυτταρική τους διανομή, την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωμάτων από αδρανείς πρωτεΐνες και την επαγωγή της πρωτεόλυσης τους. Τα υποστρώματα τους αποτελούν βιομόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, διαφοροποίησης και επιβίωσης. Η έκφραση των περισσότερων συνοδών πρωτεϊνών επάγεται υπό συνθήκες πρωτεοτοξικού στρες όπως η θερμότητα, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, η υποξία και η οξείωση. Ένα από τα σημαντικότερα και περισσότερο μελετημένα μέλη της οικογένειας των συνοδών πρωτεϊνών είναι η Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90 (Heat Shock Protein 90, HSP90). Παρά το ότι υποδηλώνει το όνομά της, η HSP90 βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών κυττάρων σε ποσοστό που φτάνει το 1 έως 2 % των συνολικών ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Η δράση της είναι πλειοτροπική, αφού συμμετέχει σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η μετανάστευση, μέσω της ρύθμισης που ασκεί σε κινάσες, σηματοδοτικά μόρια, υποδοχείς στεροειδών ορμονών και μεταγραφικούς παραγόντες.

Για τη λειτουργία της HSP90 είναι αναγκαία η συνεργιστική δράση των συν-συνοδών πρωτεϊνών (co-chaperones), οι οποίες συμμετέχουν στο πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχηματίζει η HSP90 με τις πρωτεΐνες στόχους της, σε ένα καλό ρυθμιζόμενο κύκλο δέσμευσης - αποδέσμευσης που απαιτεί υδρόλυση ATP. Η Cdc37, μια συν-συνοδή πρωτεΐνη της HSP90, απαντάται στα περισσότερα σύμπλοκα της HSP90 με τις κινάσες, για τις οποίες παρουσιάζει εξειδίκευση. Μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης της με την HSP90 και με την κινάση-πελάτη, συμμετέχει στη ρύθμιση της σωστής αναδίπλωσης και ενεργότητας σημαντικών για τις κυτταρικές λειτουργίες κινασών όπως η Akt, Raf, Cdk4 και HER-2. Η συμβολή τόσο της HSP90 όσο και της Cdc37 είναι πλέον πολύ καλά τεκμηριωμένη, καθότι αρκετές από τις πρωτεΐνες που ελέγχουν, απορρυθμίζονται κατά την καρκινογένεση και επομένως η ενεργότητα των συνοδών πρωτεϊνών είναι απαραίτητη στα καρκινικά κύτταρα για να αποφύγουν την απόπτωση από τους ενδογενείς μηχανισμούς ελέγχου και από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

Τόσο από το εργαστήριο μας όσο και από άλλες ομάδες, έχει διαπιστωθεί πως η HSP90 εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια καρκινικών κυττάρων [28,115,116]. Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4C5 που κατασκευάστηκε στο παρελθόν στο εργαστήριο μας, αναγνωρίζει ειδικά την HSP90, δεν ενδοκυτταρώνεται και επομένως μπορεί να αναχαιτίσει λειτουργικά την δράση αποκλειστικά της επιφανειακής/εξωκυττάριας HSP90 [113]. Μελετώντας την επιφανειακή HSP90 φάνηκε πως εμπλέκεται σε μη παθολογικές συνθήκες στη μετανάστευση νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη [111,113]. Σε καρκινικά κύτταρα, η επιφανειακή HSP90 εμπλέκεται επίσης στη διήθηση και σχηματισμό μεταστατικών όγκων *in vitro* και *in vivo* αντίστοιχα [115]. Ειδικότερα, η εξωκυτταρική HSP90 αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2 υποδοχέα και το mAb 4C5 αναστέλλει τον διμερισμό του, τη μετανάστευση και την κυτταρική διήθηση *in vitro* [116]. Πειράματα *in vivo* έδειξαν πως το mAb 4C5 μειώνει τον αριθμό των μεταστατικών όγκων, το μέγεθος τους και επεκτείνει το χρόνο ζωής των πειραματόζωων στα οποία είχε προκληθεί καρκίνος [115].

#### **A. Εντοπισμός της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού**

Έχοντας ως δεδομένο τις προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας, πως η HSP90 εντοπίζεται στην επιφάνεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού MDA-MB 453, σε συνδυασμό με πλήθος των βιβλιογραφικών αναφορών που αποδεικνύουν πως η Cdc37 είναι η κυριότερη συν-συνοδή πρωτεΐνη της HSP90, διερευνήσαμε την πιθανή παρουσία της Cdc37 αρχικά στα MDA-MB 453 κύτταρα. Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια επιβεβαιώθηκε και με δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης (Western blot) μεμβρανικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Η παρουσία της HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 συσχετίστηκε σε προηγούμενη εργασία με την υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα στα κύτταρα αυτά. Για να διαπιστώσουμε κατά πόσο ο επιφανειακός εντοπισμός της Cdc37 είναι εξαρτώμενος ειδικά από την παρουσία του HER-2, διερευνήσαμε την πιθανή παρουσία της στην επιφάνεια των MDA-MB 231, επίσης καρκινικών κυττάρων μαστού, τα οποία δεν εκφράζουν τον HER-2 υποδοχέα αλλά τον EGFR. Τόσο με πειράματα ανοσοϊστοχημείας όσο και με ανοσοαποτύπωση, πιστοποιήθηκε η ύπαρξη επιφανειακής Cdc37 και σε αυτή την κυτταρική σειρά, υποδεικνύοντας πως η παρουσία των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 δεν περιορίζεται

στη δράση τους ως συνοδές για τον HER-2. Επιπλέον και στις δύο κυτταρικές σειρές, μετά από επώαση ζωντανών κυττάρων με mAb 4C5 και αντι-Cdc37 αντισώματος, οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, κάτι που επιβεβαιώνει εν μέρει τη συνεργιστική τους δράση και εκτός κυτταροπλάσματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από πειράματα ανοσοιστοχημείας σε μη καρκινικά επιθηλιακά κυττάρα MCF12A διαπιστώθηκε ότι τόσο η Cdc37 όσο και η HSP90, δεν εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια σε αντίθεση με το κυτταρόπλασμα όπου και τα δύο αυτά μόρια υπάρχουν σε αφθονία, γεγονός σύμφωνο με τα μέχρι στιγμής δεδομένα. Ο επιφανειακός εντοπισμός των συνοδών πρωτεϊνών HSP90 και Cdc37 σε καρκινικά κύτταρα, και όχι σε φυσιολογικά, συσχετίζεται με την ενδοκυτταρική υπερέκφραση των HSP90 και Cdc37 σε όγκους μαστού.

Σε αντίθεση με την HSP90, τα μέχρι στιγμής δεδομένα αναφέρουν τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό της Cdc37 στο κυτταρόπλασμα, στη περί-πυρηνική περιοχή [122], και στη μιτωτική άτρακτο κατά τη μίτωση σε σπερματοκύτταρα Δροσόφιλας [123].

Στην παρούσα εργασία είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ο επιφανειακός εντοπισμός της Cdc37. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα θεωρούσαν την Cdc37 πρωτεΐνη εξειδικευμένη ως προς την σταθεροποίηση και ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών κινασών, ιδιαίτερα αυτών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Η παρουσία της HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια άλλαξε το ερευνητικό τοπίο όσον αφορά τη δράση των συνοδών πρωτεϊνών. Ο εντοπισμός και της συνοδοού Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια ενισχύει περαιτέρω την άποψη της εξωκυτταρικής συνοδείας των πρωτεϊνών (extra cellular chaperoning). Δεδομένου ότι η Cdc37 δε φέρει σήμα μυρηστιλίωσης (myristylation signal) στην αμινοξική της ακολουθία, δημιουργείται το ερώτημα πώς κατευθύνεται στην εξωκυτταρική μεμβρανική περιοχή. Ένας πιθανός τρόπος στρατολόγησής της στη μεμβράνη θα μπορούσε να είναι όπως και αυτός της HSP90. Ειδικότερα, βιβλιογραφικά δεδομένα για την HSP90 αναφέρουν πως η έκκριση της οφείλεται σε διαφορεική ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της ενδοκυτταρικά [124] και επιτελείται μέσω εξωσωμάτων [125],[126]. Ο μηχανισμός μεταφοράς της Cdc37 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων παραμένει άγνωστος και αποτελεί πεδίο μελλοντικής έρευνας.



## **B. Η επιφανειακή Cdc37 και HSP90 συμμετέχει στη διήθηση καρκινικών κυττάρων *in vitro***

Η αυξημένη κυτταρική κινητικότητα είναι ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων που σχετίζεται με τη δημιουργία μεταστάσεων. Η δημιουργία μεταστάσεων είναι ίσως το πιο δύσκολο φαινόμενο που καλείται να αντιμετωπίσει η κλινική πρακτική, και συχνά σχετίζεται με κακή πρόγνωση για τον ασθενή. Το 90% των θανάτων από καρκίνο, δεν οφείλονται στον πρωτογενή όγκο αλλά στις μεταστάσεις του σε άλλα μακρινά όργανα [127]. Στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων έχει αποδειχτεί πως συμμετέχουν μόρια της κυτταρικής επιφάνειας όπως τα μέλη της οικογένειας EGFR, οι μεταλλοπρωτεάσες, η EMPRIN [128], οι VEGFRs [129], ο IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) [130] και άλλα.

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχε αποδειχτεί πως η επιφανειακή HSP90 συμμετέχει στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 453 *in vitro*. Η λειτουργική παρεμπόδιση της δράσης της με το αντίσωμα mAb 4C5 σε πειράματα επούλωσης της πληγής (wound healing assays), αναστέλλει τη διήθηση των κυττάρων μέσω της αναχαίτισης του διμερισμού του HER-2 και τη μεταγωγή σήματος μέσω των μονοπατιών MAPK και Akt και τελικά την παρεμπόδιση της αναδιάταξης του κυτταροσκελετού [116]. Με αυτά τα δεδομένα εξετάστηκε κατά πόσο στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει και η επιφανειακή Cdc37, μέσω της λειτουργικής αναχαίτισής της, τόσο στα MDA-MB 453 κύτταρα που εκφράζουν τον HER-2, όσο και στα MDA-MB 231 που εκφράζουν τον EGFR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε εμπορικό αντίσωμα έναντι της Cdc37, το οποίο θα έπρεπε να ικανοποιεί δυο βασικές προϋποθέσεις. Πρώτον, να αναγνωρίζει ειδικά την Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια και δεύτερον να μην ενδοκυτταρώνεται κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος και επομένως να επιδρά αποκλειστικά στην επιφανειακή Cdc37.

Κάνοντας χρήση της τεχνολογίας siRNA, κατασκευάστηκαν φορείς που κωδικοποιούν shRNA μόρια έναντι της Cdc37, οπότε γίνεται αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου στο στάδιο της μεταγραφής. Με αυτή την τεχνολογία δείχθηκε ότι ο φορέας μείωσε τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής Cdc37. Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Cdc37 σε μη μονιμοποιημένα ζωντανά κύτταρα, ήταν επίσης κατά πολύ μειωμένος και στις δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδική αναγνώριση του εμπορικού αντισώματος έναντι της Cdc37 και αποκλείει την πιθανότητα μη ειδικής πρόσδεσής του στην κυτταρική επιφάνεια.

Σε επόμενο στάδιο εξετάστηκε η πιθανή ενδοκύττωση του αντι-Cdc37 αντισώματος και στις δύο κυτταρικές σειρές. Μετά από 16 ώρες επώασης του αντισώματος σε ζωντανά κύτταρα, το αντι-Cdc37 αντίσωμα δεν ενδοκυτταρώθηκε, αλλά παρέμεινε προσδεδεμένο στην επιφάνεια και των δύο κυτταρικών σειρών.

Τα δεδομένα αυτά μας επέτρεψαν να προχωρήσουμε στη διεξαγωγή δοκιμασιών 'επούλωσης της πληγής'. Η παρουσία του αντι-Cdc37 στο υλικό καλλιέργειας των MDA-MB 453 μείωσε σημαντικά τη μετανάστευση των κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει πως η μείωση αυτή οφείλεται στην αναχαίτιση της δράσης της επιφανειακής Cdc37. Η μειωμένη διηθητική ικανότητα των κυττάρων δεν οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο λόγω της δράσης του αντισώματος, καθώς ελάχιστα κύτταρα (σε ποσοστό ίσο με τη καλλιέργεια μάρτυρα που δεν περιείχε αντίσωμα) είχαν θετική χρώση (Alamar blue). Μείωση της διηθητικής ικανότητας παρατηρήθηκε και στα περισσότερα κινητικά (και ισχυρά ογκογονικά) MDA-MB 231 κύτταρα [131], παρουσία του αντι-Cdc37 αντισώματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η καλλιέργεια των προαναφερθέντων κυττάρων παρουσία του mAb 4C5 είχε επίσης ως αποτέλεσμα τη μείωση της διηθητικής ικανότητας τους. Η μείωση της διηθητικής ικανότητας των MDA-MB 231 λόγω της αναχαίτισης της επιφανειακής HSP90 από το mAb 4C5, βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτες άλλων ερευνητών, όσο και με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας [115,116,132]. Πρέπει να αναφερθεί ότι η ταυτόχρονη παρουσία των δύο αντισωμάτων (αντι-Cdc37 και mAb 4C5) στο υλικό καλλιέργειας, δεν είχε σαν αποτέλεσμα μία αθροιστική μείωση στη διηθητική συμπεριφορά και των δύο κυτταρικών σειρών. Αυτό υποδηλώνει πως οι δύο επιφανειακές πρωτεΐνες, Cdc37 και HSP90, συμμετέχουν στον ίδιο μηχανισμό κυτταρικής μετανάστευσης. Έχοντας υπόψη την αλληλεπίδραση των δύο μορίων στα πολυπρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά σύμπλοκα και επιπλέον τον συνεντοπισμό τους στην κυτταρική επιφάνεια, φαίνεται πως η λειτουργία τους στην κυτταρική μεμβράνη είναι αλληλοεξαρτώμενη. Η λειτουργική αναχαίτιση της μιας εκ των δύο φαίνεται να είναι αρκετή για τη μείωση της διήθησης των καρκινικών κυττάρων.

Η παρουσία της συν-συνοδού πρωτεΐνης Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια και η συμμετοχή της στο φαινόμενο της διήθησης των καρκινικών κυττάρων βρίσκεται εν μέρη σε συμφωνία με τα πρόσφατα αποτελέσματα των Sims *et al.*, σύμφωνα με τους οποίους οι συν-συνοδές πρωτεΐνες Hop, HSP40 και p23, καθώς και η HSP70 εντοπίζονται εξωκυτταρικά. Αλληλεπιδρώντας με την HSP90, φαίνεται ότι αυξάνουν τη διηθητική ικανότητα των MDA-MB 231 κυττάρων [132].

## **Γ. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειακών Cdc37 και HSP90 κατά τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων**

Όπως αναφέρεται στην εισαγωγή (Κεφάλαιο Α.4.3), οι HSP90 και Cdc37 δρουν συνεργιστικά κυρίως στη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών κινασών. Η παρουσία της HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια και η συμμετοχή της στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων είχε αποδειχτεί σε προηγούμενες εργασίες [115,116,132]. Σε μοριακό επίπεδο, η επιφανειακή HSP90 φάνηκε πως αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2 υποδοχέα, ενώ η αναχαίτισή της με το mAb 4C5 έδειξε αναστολή του ομοδιμερισμού και ετεροδιμερισμού του με τον ErbB-3, με επακόλουθη την αναστολή των ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος από τα MAPK και PI3K-Akt μονοπάτια [115,116,132]. Η παρουσία της Cdc37 στην κυτταρική επιφάνεια φαίνεται να επεκτείνει το μοντέλο της δράσης των συνοδών πρωτεϊνών εξωκυτταρικά. Η αναζήτηση των πρωτεϊνών πελατών-στόχων της επιφανειακής Cdc37, καθώς και οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκεί τη δράση της κατά τη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων ήταν το επόμενο βήμα της παρούσας διατριβής.

### **Γ.1. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων των επιφανειακών συνοδών πρωτεϊνών Cdc37, HSP90 και των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης HER-2 και EGFR**

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης τόσο από τα MDA-MB 453 όσο και από τα MDA-MB 231 καρκινικά κύτταρα έδειξαν πως οι επιφανειακές HSP90 και Cdc37 αλληλεπιδρούν. Σε συνδυασμό με το γεγονός πως η HSP90 και η Cdc37 συνεντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια ζωντανών κυττάρων και των δύο σειρών, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα πως ομοίως με τις ενδοκυτταρικές, έτσι και οι επιφανειακές Cdc37 και HSP90 αλληλεπιδρούν σε ένα πιθανό σύστημα επιφανειακής συνοδείας. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε καθώς στα MDA-MB 453 κύτταρα, η Cdc37 ανοσοκατακρημνίστηκε με τον HER-2 υποδοχέα, ενώ στα MDA-MB 231 τόσο η Cdc37 όσο και η HSP90 ανοσοκατακρημνίστηκαν με τον EGFR υποδοχέα, κάτι που επίσης αναφέρεται για πρώτη φορά. Επιπλέον, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με το αδιαπέραστο στα κύτταρα αντι-Cdc37 αντίσωμα, οι αλληλεπιδράσεις της επιφανειακής Cdc37 με την HSP90 μειώθηκαν σημαντικά και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ μείωση της αλληλεπίδρασης παρατηρήθηκε και μεταξύ των Cdc37-HER-2, Cdc37-EGFR στα MDA-MB 453 και στα MDA-MB 231 κύτταρα, αντίστοιχα. Η διατάραξη των αλληλεπιδράσεων αυτών από τα μη διεισδυτικά

αντι-Cdc37 και mAb 4C5, ενισχύουν την παρατήρηση αυτές λαμβάνουν χώρα στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, όπου η Cdc37 συμμετέχει στο μηχανισμό της διήθησης των καρκινικών κυττάρων. Η επίδραση με mAb 4C5 αποσαφήνισε περισσότερο το μηχανισμό αυτό. Εκτός από την αναμενόμενη μείωση της αλληλεπίδρασης των Cdc37 και HSP90, το mAb 4C5 μείωσε σημαντικά και την αλληλεπίδραση μεταξύ Cdc37-HER-2, Cdc37-EGFR και της HSP90-EGFR. Συνεκτιμώντας τα παραπάνω δεδομένα και σε συνδυασμό με τη δεδομένη αλληλεπίδραση της HSP90 με το εξωκυττάριο τμήμα του HER-2, εξάγεται το συμπέρασμα πως στην κυτταρική επιφάνεια εντοπίζονται τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα Cdc37-HSP90-HER-2 και Cdc37-HSP90-EGFR. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να γενικευτεί ως Cdc37-HSP90-υποδοχέας κίνησης τυροσίνης και φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Η παρεμπόδιση του σχηματισμού του πολυπρωτεϊνικού αυτού συμπλόκου στην κυτταρική επιφάνεια φαίνεται πως μπορεί να αναχαιτίσει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων.

Ομοίως με τις ενδοκυτταρικές κινήσεις, όπου το σύμπλεγμα Cdc37-HSP90-κίνηση (π.χ. Akt, Cdk4, Raf-1) είναι απαραίτητο για τη σωστή αναδίπλωση και ενεργοποίηση των κινασών-πελατών τους, φαίνεται πως ένα παρόμοιο σύστημα σταθεροποίησης και ορθής αναδίπλωσης υπάρχει στην κυτταρική επιφάνεια. Ειδικότερα δείχθηκε ότι το σύστημα Cdc37-HSP90 κυτταρικής επιφάνειας συμμετέχει στη ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων κίνησης τυροσίνης. Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, οι Wooley *et al.* και οι Cheng *et al.* έδειξαν επίσης την ύπαρξη εξωκυττάριας συνοδείας της HSP90 που συμβάλλει σε κυτταρική μετανάστευση. Ειδικότερα σε αυτές τις δύο νέες μελέτες, αναφέρεται πως η εξωκυττάρια HSP90 δεσμεύεται στον υποδοχέα LRP-1/CD91 για να επάγει την κυτταρική μετανάστευση [133],[134].

Όπως φάνηκε το mAb 4C5, το οποίο αναγνωρίζει την HSP90, διαταράσσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της HSP90 και των πελατών της, την αλληλεπίδραση μεταξύ της Cdc37 και της HSP90 αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Cdc37 και των πελατών της. Ο επίτοπος της HSP90 που αναγνωρίζει το mAb 4C5 δεν είναι προς το παρόν γνωστός, όμως μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη. Με βάση τα γνωστά βιβλιογραφικά δεδομένα, η HSP90 αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την Cdc37 μέσω της αμινοτελικής της περιοχής, ενώ με μια περιοχή ανάμεσα στην αμινοτελική και μεσαία περιοχή της προσδένεται με τις κινάσες-πελάτες της [135]. Επιπλέον, η Cdc37 αλληλεπιδρά με τις κινάσες-πελάτες της μέσω της αμινοτελικής της περιοχής. Με αυτά τα δεδομένα, η δράση του mAb 4C5 στις ανωτέρω πειραματικές παρατηρήσεις, πιθανόν να

οφείλεται στη δέσμευση του mAb 4C5 είτε (α) στην αμινοτελική περιοχή της HSP90 όπου αναχαιτίζει την αλληλεπίδραση της HSP90 με την Cdc37, και έτσι επάγει στερεοδομικές αλλαγές στα δύο μόρια που αποτρέπουν την δέσμευση με τους υποδοχείς κινάσης, είτε (β) να δεσμεύεται σε μια περιοχή ανάμεσα στην αμινοτελική και μεσαία περιοχή της HSP90 (linker) όπου αναχαιτίζει την αλληλεπίδραση της HSP90 με τον υποδοχέα κινάσης, και έτσι να επάγει στερεοδομικές αλλαγές που αποτρέπουν την αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 και τους υποδοχείς. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται από πρόσφατα δεδομένα, που δείχνουν πως ένα τμήμα 115 αμινοξέων της HSP90 ανάμεσα στην περιοχή σύνδεσης και την μεσαία περιοχή της εκκρινόμενης HSP90 δρά ως επαγωγικός παράγοντας στην επούλωση της πληγής στα ποντίκια. Όποια περίπτωση και αν ισχύει, τα δεδομένα από την παρούσα εργασία υποδεικνύουν πως η στερεοδομική κατάσταση των μορίων που συμμετέχουν στο σύμπλοκο Cdc37-HSP90-υποδοχέας κινάσης τυροσίνης είναι μείζονος σημασίας για την επιτυχή αλληλεπίδραση στη ρύθμιση της λειτουργίας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης.

## **Γ.2. Μελέτη της συμμετοχής των επιφανειακών συνοδών πρωτεϊνών HSP90 και Cdc37 στη μεταγωγή σήματος**

Ένας από τους τρόπους με τους οποίους τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις μεταβολές του περιβάλλοντός τους είναι η μεταγωγή σήματος (signal transduction). Τα σήματα που φτάνουν στην κυτταρική επιφάνεια γίνονται αντιληπτά από τους υποδοχείς και στη συνέχεια η πληροφορία μεταβιβάζεται μέσω κυτταροπλασματικών κινασών, κυρίως στον πυρήνα.

Έχοντας διαπιστώσει πως οι επιφανειακές Cdc37 και HSP90 αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης HER-2 και EGFR, σε συνδυασμό με την παρατήρηση πως τα συνοδά αυτά μόρια συμμετέχουν στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων, εξετάσαμε τον πιθανό τους ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Στα MDA-MB 453 κύτταρα, η επώαση με mAb 4C5 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσης των MEK, ERK1/2 και Akt κινασών, γεγονός που επιβεβαίωσε την ορθότητα του πειράματος, αφού το ανάλογο αποτέλεσμα είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη [116] και οφείλεται στην αναχαιτίση της αλληλεπίδρασης του HER-2 με την HSP90. Επώαση των κυττάρων με αντι-Cdc37 αντίσωμα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσης μόνο της Akt, ενώ η φωσφορυλίωση των MEK και ERK1/2 φαίνεται να μην επηρεάζεται. Παρόλο που η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών αυτών μονοπατιών είναι κομβικής σημασίας κατά τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων [67,136], το αντι-Cdc37 παρεμπόδιζε τη διήθηση των MDA-MB 453 κυττάρων. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να

αποτελεί το γεγονός πως η αναχαίτιση της ενεργοποίησης της Akt είναι αρκετά ισχυρή για να αναχαιτίσει τη διήθηση αυτών των κυττάρων [136]. Το γεγονός πως οι MEK και ERK1/2 εξακολουθούν να φωσφορυλιώνονται παρόλο που το αντι-Cdc37 αναχαιτίζει την αλληλεπίδραση του HER-2 με την Cdc37 αλλά και με την HSP90, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στα MDA-MB 231 κύτταρα η φωσφορυλίωση του EGFR παρεμποδίζεται και από το mAb 4C5 και από το αντι-Cdc37 αντίσωμα. Η φωσφορυλίωση των Mek και Akt επίσης μειώνεται, με αυτή της Akt να παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με το μάρτυρα. Εν αντιθέσει, η φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση της ERK1/2 φαίνεται να μην επηρεάζεται από τις εξωκυττάριας HSP90 και Cdc37.

Και στις δύο κυτταρικές σειρές, οι δύο επιφανειακές συνοδές πρωτεΐνες Cdc37 και HSP90, διαπιστώθηκε πως μειώνουν την ενεργοποίηση του Akt σηματοδοτικού μονοπατιού, πιθανόν μέσω της παρεμπόδισης της ενεργοποίησης των HER-2 και EGFR [116]. Το Akt εξάλλου με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα αποτελεί έναν από τους κυριότερους καταρροϊκούς σηματοδότες της οικογένειας των EGFR υποδοχέων [67]. Η παρεμπόδιση της ενεργοποίησής του στο μονοπάτι ενεργοποίησης από τους HER-2 και EGFR, φαίνεται πως είναι ικανή για να μειώσει τη διηθητική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων MDA-MB 453 και MDA-MB 231.

### **Γ.3. Μελέτη της συμμετοχής της HSP90 στην ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9**

Σε προηγούμενες μελέτες είχε συσχετιστεί η υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα με την αυξημένη έκφραση και ενεργότητα των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 [137],[138]. Επιπλέον, οι Jang *et al.* έχουν δείξει πως η επαγόμενη μείωση των επιπέδων του HER-2 μέσω της αποδέσμευσης του από την HSP90, οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα του PI3K-Akt σηματοδοτικού μονοπατιού και τελικά σε μείωση της ενεργότητας των MMP-2 και MMP-9 [139]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Adam *et al.* όπου έδειξαν πως η ενεργοποίηση του HER-2 από τον Heregulin (HG) οδηγεί σε ενεργοποίηση του PI3k-Akt μονοπατιού μέσω της κινάσης PAK1, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας των MMP-2 και MMP-9 με ταυτόχρονη αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας [136].

Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της MMP-2 και της ενεργοποίησης του EGFR και των κινασών c-Src, MEK-1, ERK1/2 παρατηρήθηκε από τους Siu *et al.* Στη συγκεκριμένη μελέτη η μείωση της φωσφορυλίωσης του EGFR, και των MEK-1, ERK1/2 από τη κινάση PAK4 (p21-activated kinase 4) είχε επίσης ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης της MMP-2 καθώς και την μειωμένη διήθηση των καρκινικών κυττάρων ωοθηκών [140].

Έχοντας υπόψη αυτά τα βιβλιογραφικά δεδομένα και σε συνδυασμό με τα δικά μας πειραματικά δεδομένα όπου το mAb 4C5 εμποδίζει τη φωσφορυλίωση του HER-2 και του EGFR, καθώς και την αναχαίτιση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MEK, ERK και Akt κατά την παρεμπόδιση της διήθησης καρκινικών κυττάρων [116], διερευνήσαμε την πιθανή επίδρασή του στις μεταλλοπρωτεάσες MMP-2 και MMP-9. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ζυμογραφίας, διαπιστώσαμε πως τα επίπεδα των ανενεργών MMP-2 και MMP-9 δεν μεταβλήθηκαν όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με το αντίσωμα έναντι της HSP90 (mAb 4C5) ενώ οι ενεργές μορφές τους απουσίαζαν από το ζυμογράφημα. Το αποτέλεσμα αυτό, υποδηλώνει πως η εξωκυττάρια HSP90 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9 εξωκυτταρικά.

Τα αποτελέσματα αυτά, βρίσκονται σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες εργασίες άλλων ερευνητών, όπου επίσης φαίνεται η αναγκαία, για την ενεργοποίηση των MMPs, συνοδεία τους από την εξωκυττάρια HSP90 [28].

#### **Δ. Μελέτη του ρόλου της επιφανειακής HSP90 στη μεταστατική συμπεριφορά καρκινικών κυττάρων *in vivo***

Η διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί πολλά στάδια. Σε γενικές γραμμές καρκινικά κύτταρα αποκολλούνται από τον αρχικό όγκο, μεταναστεύουν και διηθούνται σε παρακείμενους ιστούς, εισέρχονται στην κυκλοφορία και φτάνουν σε απομακρυσμένους περιοχές, εξαγγειώνονται και δημιουργούν μεταστατικές εστίες [141,142].

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, είχε φανεί πως το mAb 4C5 μέσω της επιφανειακής δέσμευσης του σε καρκινικά κύτταρα ποντικού, μπορεί και επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής ποντικών, στα οποία είχαν χορηγηθεί αυτόλογα καρκινικά κύτταρα, ενώ μειώνει σημαντικά τον αριθμό μεταστατικών εστιών καθώς και το μέγεθος των όγκων [115].

Παραπλήσιες παρατηρήσεις έγιναν και από τους Tsutsumi *et al.*, που αναφέρουν πως η

αναστολή της επιφανειακής HSP90 *in vivo* είναι ικανή να μειώσει τον αριθμό των μεταστατικών εστιών στους πνεύμονες από αυτόλογα κύτταρα μελανώματος καθώς και το μέγεθος των όγκων [143].

Σαν συνέχεια των παραπάνω μελετών εφαρμόσαμε ένα μοντέλο κατά το οποίο ξενομοσχεύματα από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231, τα οποία όπως προαναφέρθηκε έχουν ισχυρή ικανότητα σχηματισμού όγκων σε ποντίκια, χορηγήθηκαν σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το mAb 4C5 για 15 μέρες ενδοπεριτοναϊκά, έπειτα από 7 εβδομάδες παρουσίαζαν κατά μέσο όρο 81% λιγότερες μεταστατικές εστίες. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα, όπου σε ξενομοσχεύματα από αυτόλογα καρκινικά κύτταρα ποντικών, το mAb 4C5 είχε αντίστοιχη δράση [115].

Οι Nie *et al.*, έδειξαν πρόσφατα πως η αναχαίτιση του EGFR στα MDA-MB 231 BR κύτταρα, οδηγεί στο σχηματισμό λιγότερων και μικρότερων μεταστατικών εστιών στους εγκεφάλους ποντικών [144]. Επιπλέον, οι Nickerson *et al.* έδειξαν πως η αποσιώπηση του EGFR με shRNA στα MDA-MB 231 κύτταρα, μείωσε το μέγεθος των μεταστατικών όγκων στα οστά, ενώ όταν τα κύτταρα αυτά ενέθηκαν στο μαστό (fad pad) σχηματίστηκαν μικρότεροι όγκοι και η αγγειογένεση ήταν μειωμένη. Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκε επίσης μειωμένη έκφραση του προαγγειογονικού παράγοντα MCSF-1 καθώς και της MMP-9 [145].

Σε παράλληλη εργασία στο εργαστήριο μας, κατασκευάστηκε χμιαρικό αντίσωμα 4C5 (ch4C5). Ειδικότερα, η LCκ περιοχή στο ποντικίσιο mAb 4C5 αντικαταστάθηκε από την ανθρώπινη LCκ περιοχή. Το χμιαρικό ch4C5 παρουσιάζει *in vitro* τις ίδιες ιδιότητες με το ποντικίσιο mAb 4C5 [114]. Μέρος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του χμιαρικού ch4C5 στη μεταστατική απόθεση των MDA-MB 453 κυττάρων.

Χρησιμοποιώντας το χμιαρικό αντίσωμα ch4C5 που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας, δείξαμε πως η δέσμευση του στην επιφάνεια των MDA-MB 453 κυττάρων πριν τη χορήγησή τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια, μείωσε την εναπόθεσή τους στους πνεύμονες κατά 38% σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα από την ομάδα μας, όπου χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο δείχθηκε πως η δέσμευση του mAb 4C5 στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 κυττάρων μείωσε σημαντικά την εναπόθεσή τους στο πνεύμονα [146].



## **E. Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος του φυτού *Vitis vinifera* (Τυρνάβου) στα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB 453**

Η επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του *Vitis vinifera* έδειξε πως επάγει τον κυτταρικό θάνατο, με τρόπο δοσοεξαρτώμενο άλλα και χρονοεξαρτώμενο. Τα ζωντανά κύτταρα που μελετήθηκαν μετά από επίδραση του εκχυλίσματος φάνηκε να εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα της Cdc37 ενώ τα επίπεδα της HSP90 παρέμειναν σταθερά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η έκφραση της HSP70, η οποία βρέθηκε να μειώνεται μέχρι το κατώφλι των 150μg/ml ενώ μετά αυξανόταν. Η αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 δε φάνηκε να επηρεάζεται σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στον κυτταρικό κύκλο, έδειξε πως παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της μίτωσης, παρόλο που το DNA του κυττάρου εξακολουθούσε να διπλασιάζεται.

Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να αποδοθούν στη συνδυαστική δράση της ρεζβερατρόλης που περιέχουν σε υψηλή συγκέντρωση τα σταφύλια, μαζί με άλλες πολυφαινόλες και φυτοχημικά (ανθοκυανίνες κ.α.). Οι Rashid *et al.* έδειξαν πως η ρεζβερατρόλη επάγει τον κυτταρικό θάνατο και αναχαιτίζει τον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων προστάτη [147]. Επίσης, οι Bourguignon *et al.* έδειξαν πως η ρεζβερατρόλη επάγει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων μαστού [148].

Η Aurora B, είναι μία από τις κινάσες-πελάτες της Cdc37, η οποία χρειάζεται τη δράση συνοδείας της Cdc37 για τη λειτουργικότητά της. Η Aurora B συμμετέχει σε πολλά γεγονότα στη μίτωση, μεταξύ άλλων στην κίνηση των χρωμοσωμάτων, την πρόσδεση στον κινητοχώρο και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων [149]. Οι Lange *et al.* έδειξαν πως η αποσιώπιση της Cdc37 οδηγούσε σε αδυναμία ολοκλήρωσης της μίτωσης καθώς και της μείωσης στις αρσενικές Δροσόφιλες, λόγω της αναχαιτίσης της δράσης της Aurora B [123].

Με βάση τα ανωτέρω βιβλιογραφικά δεδομένα, η μη ολοκλήρωση της μίτωσης που παρατηρήθηκε στα MDA-MB 453 κύτταρα μετά από την επίδραση του εκχυλίσματος, θα μπορούσε να αποδοθεί στα μειωμένα επίπεδα της Cdc37 που με τη σειρά τους οδηγούν στην μικρότερη ενεργοποίηση της Aurora B.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας έρχονται να προσθέσουν νέα δεδομένα στο μηχανισμό εξωκυττάριας συνοδείας, τόσο για τα επιφανειακά όσο και για τα εκκρινόμενα μόρια που σχετίζονται κυρίως με τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Τα κύρια ευρήματα της εργασίας αυτής θα μπορούσαν να συνοψιστούν στα εξής:

1. Η συν-συνοδός (co-chaperone) Cdc37 πρωτεΐνη εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια των MDA-MB 453 και MDA-MB 231 καρκινικών κυττάρων μαστού.
2. Η Cdc37 και η HSP90 απουσιάζουν από την επιφάνεια των φυσιολογικών MCF12A επιθηλιακών κυττάρων μαστού.
3. Η επιφανειακή Cdc37 συμμετέχει στους μηχανισμούς διήθησης/μετάστασης των καρκινικών κυττάρων μαστού.
4. Η Cdc37 αλληλεπιδρά με την HSP90 στην κυτταρική επιφάνεια, όπως συμβαίνει και στο κυτταρόπλασμα.
5. Η επιφανειακή Cdc37 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης HER-2 και EGFR στα MDA-MB 453 και MDA-MB 231 κύτταρα αντίστοιχα, σχηματίζοντας έτσι πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα Cdc37- HSP90- HER-2/EGFR.
6. Επίδραση με το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4C5 έναντι της HSP90, αναχαιτίζει την αλληλεπίδραση των επιφανειακών HSP90 με την Cdc37, της Cdc37 με τον HER-2 και τον EGFR, καθώς και της HSP90 με τον EGFR.
7. Η αλληλεπίδραση της Cdc37 με τους HER-2 και EGFR φαίνεται πως είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση του EGFR και τη μεταγωγή σήματος ενδοκυτταρικά. Η μεταγωγή σημάτων από τον HER-2 φαίνεται επίσης να αναστέλλεται μερικώς όταν αναχαιτίζεται η αλληλεπίδραση του με την Cdc37. Η μεταγωγή σημάτων από τον EGFR επίσης μειώνεται όταν αναχαιτίζεται η αλληλεπίδραση του με τη Cdc37 και την HSP90.
8. Όπως και στα MDA-MB 453 κύτταρα, έτσι και στα MDA-MB 231 κύτταρα, η HSP90 εκκρίνεται στο υλικό καλλιέργειας, όπου συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9. Το mAb 4C5 αναστέλλει την ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9.

9. Το mAb 4C5, παρεμποδίζει τη δημιουργία εναποθέσεων MDA-MB 453 καρκινικών κυττάρων και μεταστατικών εστιών από MDA-MB 231 στους πνεύμονες ανοσοκατασταλμένων ποντικών.
10. Επίδραση εκχυλίσματος από καρπούς του *Vitis Vinifera* (σταφύλι) στα MDA-MB 453 έδειξε πως οδηγεί τα κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο.
11. Η κυτταροπλασματική αλληλεπίδραση της Cdc37 με την HSP90 φαίνεται πως δεν επηρεάζεται από το εκχύλισμα του *Vitis vinifera*. Τα επίπεδα της HSP90 μένουν σταθερά σε όλες τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που δοκιμάστηκαν, ενώ τα επίπεδα της Cdc37 μειώνονται με την αύξηση της συγκέντρωσής του. Ταυτόχρονα τα επίπεδα της HSP70 φαίνεται να μειώνονται μέχρι ένα συγκεκριμένο κατώφλι συγκεντρώσεως, ενώ μετά αυξάνονται γραμμικά. Η ουμπικιτώση των κυτταρικών πρωτεϊνών παρουσιάζεται επίσης να αυξάνεται μέχρι ένα όριο συγκεντρώσεως του εκχυλίσματος, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειώνεται κατά τρόπο αντιστρόφως ανάλογο με το μοτίβο που παρουσιάζει η HSP70. Τέλος, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έδειξε πως το εκχύλισμα από *Vitis vinifera* εμποδίζει τα κύτταρα να ολοκληρώσουν τη μίτωση.

## V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420.
2. Ellis J (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328: 378-379.
3. Caplan AJ (2003) What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* 8: 105-107.
4. Argon Y, Simen BB (1999) GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* 10: 495-505.
5. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11-15.
6. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79: 129-168.
7. Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 111-133.
8. Young JC, Hartl FU (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *Embo J* 19: 5930-5940.
9. Siligardi G, Hu B, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH, et al. (2004) Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* 279: 51989-51998.
10. Picard D (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59: 1640-1648.
11. Pearl LH, Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271-294.
12. Murphy PJ, Kanelakis KC, Galigniana MD, Morishima Y, Pratt WB (2001) Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 276: 30092-30098.
13. Johnson JL, Beito TG, Krco CJ, Toft DO (1994) Characterization of a novel 23-kilodalton protein of inactive progesterone receptor complexes. *Mol Cell Biol* 14: 1956-1963.
14. Smith DF, Toft DO (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7: 4-11.
15. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, et al. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3: 93-96.
16. Whitelaw ML, Hutchison K, Perdew GH (1991) A 50-kDa cytosolic protein complexed with the 90-kDa heat shock protein (hsp90) is the same protein complexed with pp60v-src hsp90 in cells transformed by the Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 266: 16436-16440.
17. Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K (1995) Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem* 233: 1-8.
18. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, et al. (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90: 65-75.
19. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM (1994) 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* 91: 8324-8328.

20. Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, et al. (2006) Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440: 1013-1017.
21. Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 761-772.
22. Xu W, Mimnaugh E, Rosser MF, Nicchitta C, Marcu M, et al. (2001) Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J Biol Chem* 276: 3702-3708.
23. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143: 901-910.
24. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, et al. (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J* 19: 4383-4392.
25. Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267-273.
26. Neckers L, Ivy SP (2003) Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15: 419-424.
27. Zaarur N, Gabai VL, Porco JA, Jr., Calderwood S, Sherman MY (2006) Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res* 66: 1783-1791.
28. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, et al. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 6: 507-514.
29. Xu W, Marcu M, Yuan X, Mimnaugh E, Patterson C, et al. (2002) Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12847-12852.
30. Marcu MG, Schulte TW, Neckers L (2000) Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 242-248.
31. Rosenhagen MC, Soti C, Schmidt U, Wochnik GM, Hartl FU, et al. (2003) The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation. *Mol Endocrinol* 17: 1991-2001.
32. Reed SI (1980) The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics* 95: 561-577.
33. Grammatikakis N, Grammatikakis A, Yoneda M, Yu Q, Banerjee SD, et al. (1995) A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J Biol Chem* 270: 16198-16205.
34. Ozaki T, Irie K, Sakiyama S (1995) Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of a novel gene that is homologous to cdc37. *DNA Cell Biol* 14: 1017-1023.
35. Grammatikakis N, Lin JH, Grammatikakis A, Tsihchlis PN, Cochran BH (1999) p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* 19: 1661-1672.
36. MacLean M, Picard D (2003) Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. *Cell Stress Chaperones* 8: 114-119.
37. Zhang W, Hirshberg M, McLaughlin SH, Lazar GA, Grossmann JG, et al. (2004) Biochemical and structural studies of the interaction of Cdc37 with Hsp90. *J Mol Biol* 340: 891-907.
38. Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, et al. (2004) The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* 116: 87-98.

39. Salminen A, Lehtonen M, Paimela T, Kaarniranta K (2010) Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 439-442.
40. Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, et al. (2008) A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7: 162-170.
41. Zhang T, Li Y, Yu Y, Zou P, Jiang Y, et al. (2009) Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J Biol Chem* 284: 35381-35389.
42. Yu Y, Hamza A, Zhang T, Gu M, Zou P, et al. (2010) Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol* 79: 542-551.
43. Grover A, Shandilya A, Agrawal V, Pratik P, Bhasme D, et al. (2011) Hsp90/Cdc37 chaperone/co-chaperone complex, a novel junction anticancer target elucidated by the mode of action of herbal drug Withaferin A. *BMC Bioinformatics* 12 Suppl 1: S30.
44. Nair SC, Toran EJ, Rimerman RA, Hjermstad S, Smithgall TE, et al. (1996) A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones* 1: 237-250.
45. Silverstein AM, Grammatikakis N, Cochran BH, Chinkers M, Pratt WB (1998) p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J Biol Chem* 273: 20090-20095.
46. Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA (2007) Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol* 17: 87-92.
47. Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 10: 1491-1502.
48. Scholz G, Hartson SD, Cartledge K, Hall N, Shao J, et al. (2000) p50(Cdc37) can buffer the temperature-sensitive properties of a mutant of Hck. *Mol Cell Biol* 20: 6984-6995.
49. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, et al. (2002) Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277: 39858-39866.
50. Shao J, Prince T, Hartson SD, Matts RL (2003) Phosphorylation of serine 13 is required for the proper function of the Hsp90 co-chaperone, Cdc37. *J Biol Chem* 278: 38117-38120.
51. Vaughan CK, Mollapour M, Smith JR, Truman A, Hu B, et al. (2008) Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol Cell* 31: 886-895.
52. Xu W, Mollapour M, Prodromou C, Wang S, Scroggins BT, et al. (2012) Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Mol Cell* 47: 434-443.
53. Kimura Y, Rutherford SL, Miyata Y, Yahara I, Freeman BC, et al. (1997) Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev* 11: 1775-1785.
54. Rao J, Lee P, Benzeno S, Cardozo C, Albertus J, et al. (2001) Functional interaction of human Cdc37 with the androgen receptor but not with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 276: 5814-5820.
55. Dai K, Kobayashi R, Beach D (1996) Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J Biol Chem* 271: 22030-22034.

56. Wang X, Grammatikakis N, Hu J (2002) Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 277: 24361-24367.
57. Jinwal UK, Trotter JH, Abisambra JF, Koren J, 3rd, Lawson LY, et al. (2011) The Hsp90 kinase co-chaperone Cdc37 regulates tau stability and phosphorylation dynamics. *J Biol Chem* 286: 16976-16983.
58. Thompson MA, Stumph J, Henrickson SE, Rosenwald A, Wang Q, et al. (2005) Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol* 36: 494-504.
59. Katayama Y, Sakai A, Okikawa Y, Oue N, Asaoku H, et al. (2004) Cyclin D1 overexpression is not a specific grouping marker, but may collaborate with CDC37 in myeloma cells. *Int J Oncol* 25: 579-595.
60. Feo F, De Miglio MR, Simile MM, Muroli MR, Calvisi DF, et al. (2006) Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim Biophys Acta* 1765: 126-147.
61. Casas S, Ollila J, Aventin A, Vihinen M, Sierra J, et al. (2003) Changes in apoptosis-related pathways in acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 146: 89-101.
62. Stepanova L, Finegold M, DeMayo F, Schmidt EV, Harper JW (2000) The oncoprotein kinase chaperone CDC37 functions as an oncogene in mice and collaborates with both c-myc and cyclin D1 in transformation of multiple tissues. *Mol Cell Biol* 20: 4462-4473.
63. Gray PJ, Jr., Stevenson MA, Calderwood SK (2007) Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res* 67: 11942-11950.
64. Smith JR, Clarke PA, de Billy E, Workman P (2009) Silencing the cochaperone CDC37 destabilizes kinase clients and sensitizes cancer cells to HSP90 inhibitors. *Oncogene* 28: 157-169.
65. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
66. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A (2001) The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 8: 151-159.
67. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137.
68. Bouyain S, Longo PA, Li S, Ferguson KM, Leahy DJ (2005) The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15024-15029.
69. Soltoff SP, Cantley LC (1996) p120<sup>cas</sup> is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem* 271: 563-567.
70. Rubin I, Yarden Y (2001) The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 1: S3-8.
71. Roskoski R, Jr. (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1-11.
72. Barros FF, Powe DG, Ellis IO, Green AR (2010) Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology* 56: 560-572.
73. Fleishman SJ, Schlessinger J, Ben-Tal N (2002) A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15937-15940.

74. Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284: 54-65.
75. Ben-Levy R, Paterson HF, Marshall CJ, Yarden Y (1994) A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J* 13: 3302-3311.
76. Schulze WX, Deng L, Mann M (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1: 2005 0008.
77. Chavany C, Mimnaugh E, Miller P, Bitton R, Nguyen P, et al. (1996) p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J Biol Chem* 271: 4974-4977.
78. Mimnaugh EG, Chavany C, Neckers L (1996) Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem* 271: 22796-22801.
79. Xu W, Yuan X, Xiang Z, Mimnaugh E, Marcu M, et al. (2005) Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol* 12: 120-126.
80. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, et al. (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J* 331 ( Pt 1): 299-308.
81. Stambolic V, Woodgett JR (2006) Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16: 461-466.
82. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399: 333-338.
83. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.
84. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, et al. (2003) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17: 590-603.
85. Wang SC, Hung MC (2001) HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol* 28: 115-124.
86. Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, et al. (1998) Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 2: 581-591.
87. Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y (2004) The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 3: 51-60.
88. Yen L, You XL, Al Moustafa AE, Batist G, Hynes NE, et al. (2000) Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 19: 3460-3469.
89. Eccles SA (2011) The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol* 55: 685-696.
90. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4309-4313.



91. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56: 5079-5086.
92. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, et al. (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6: 1251-1259.
93. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ (1998) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 200-206.
94. Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, et al. (2004) Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene* 23: 4594-4602.
95. Lavictoire SJ, Parolin DA, Klimowicz AC, Kelly JF, Lorimer IA (2003) Interaction of Hsp90 with the nascent form of the mutant epidermal growth factor receptor EGFRvIII. *J Biol Chem* 278: 5292-5299.
96. Perez-Soler R (2004) The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 4238s-4240s.
97. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, et al. (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 21: 2237-2246.
98. Fountzilas G, Bobos M, Kalogera-Fountzila A, Xiros N, Murray S, et al. (2008) Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation. *Cancer Invest* 26: 784-793.
99. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, et al. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634.
100. Peeters M, Balfour J, Arnold D (2008) Review article: panitumumab--a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 269-281.
101. Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, Vince GH (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J Clin Oncol* 3: 67-79.
102. Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494.
103. Murphy G, Knauper V (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 15: 511-518.
104. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5578-5582.
105. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, et al. (2001) Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7: 2396-2404.

106. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, et al. (1993) Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67: 1126-1131.
107. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149.
108. Kohler G, Milstein C (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6: 511-519.
109. Thomaidou D, Patsavoudi E (1993) Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C5. *Neuroscience* 53: 813-827.
110. Yfanti E, Nagata I, Patsavoudi E (1998) Migration behavior of rodent granule neurons in the presence of antibody to the 4C5 antigen. *J Neurochem* 71: 1381-1389.
111. Thomaidou D, Yfanti E, Patsavoudi E (1996) Expression of the 4C5 antigen during development and after injury of the rat sciatic nerve. *J Neurosci Res* 46: 24-33.
112. Yfanti E, Sidera K, Margaritis LH, Patsavoudi E (2004) The 4C5 antigen is associated with Schwann cell migration during development and regeneration of the rat peripheral nervous system. *Glia* 45: 39-53.
113. Sidera K, Samiotaki M, Yfanti E, Panayotou G, Patsavoudi E (2004) Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 279: 45379-45388.
114. Sidera K, El Hamidieh A, Mamalaki A, Patsavoudi E (2011) The 4C5 cell-impermeable anti-HSP90 antibody with anti-cancer activity, is composed of a single light chain dimer. *PLoS One* 6: e23906.
115. Stellas D, Karameris A, Patsavoudi E (2007) Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 13: 1831-1838.
116. Sidera K, Gaitanou M, Stellas D, Matsas R, Patsavoudi E (2008) A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem* 283: 2031-2041.
117. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
118. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
119. Meintanis S, Thomaidou D, Jessen KR, Mirsky R, Matsas R (2001) The neuron-glia signal beta-neuregulin promotes Schwann cell motility via the MAPK pathway. *Glia* 34: 39-51.
120. Place AE, Jin Huh S, Polyak K (2011) The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* 13: 227.
121. Heimburg J, Yan J, Morey S, Glinskii OV, Huxley VH, et al. (2006) Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen-Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia* 8: 939-948.
122. Perdew GH, Wiegand H, Vanden Heuvel JP, Mitchell C, Singh SS (1997) A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* 36: 3600-3607.
123. Lange BM, Rebollo E, Herold A, Gonzalez C (2002) Cdc37 is essential for chromosome segregation and cytokinesis in higher eukaryotes. *EMBO J* 21: 5364-5374.

124. Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, et al. (2009) The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21288-21293.
125. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 118: 3631-3638.
126. McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG (2010) Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10: 294.
127. Rabbani SA, Mazar AP (2007) Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes. *Cancer Metastasis Rev* 26: 663-674.
128. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, et al. (2012) S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res*.
129. Song G, Li Y, Jiang G (2012) Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review). *Oncol Rep* 28: 1935-1944.
130. Yamamoto T, Oshima T, Yoshihara K, Nishi T, Arai H, et al. (2012) Clinical significance of immunohistochemical expression of insulin-like growth factor-1 receptor and matrix metalloproteinase-7 in resected non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 3: 797-802.
131. Jessani N, Niessen S, Mueller BM, Cravatt BF (2005) Breast cancer cell lines grown in vivo: what goes in isn't always the same as what comes out. *Cell Cycle* 4: 253-255.
132. Sims JD, McCready J, Jay DG (2011) Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 6: e18848.
133. Woodley DT, Fan J, Cheng CF, Li Y, Chen M, et al. (2009) Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90alpha autocrine signaling to promote keratinocyte migration. *J Cell Sci* 122: 1495-1498.
134. Cheng CF, Fan J, Fedesco M, Guan S, Li Y, et al. (2008) Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* 28: 3344-3358.
135. Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, Good VM, Ali MM, et al. (2006) Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol Cell* 23: 697-707.
136. Adam L, Vadlamudi R, Kondapaka SB, Chernoff J, Mendelsohn J, et al. (1998) Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem* 273: 28238-28246.
137. La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S (2004) Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 90: 1414-1421.
138. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, et al. (2004) Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 10: 7621-7628.
139. Jang JY, Jeon YK, Kim CW (2010) Degradation of HER2/neu by ANT2 shRNA suppresses migration and invasiveness of breast cancer cells. *BMC Cancer* 10: 391.
140. Siu MK, Chan HY, Kong DS, Wong ES, Wong OG, et al. (2010) p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18622-18627.

141. Curran S, Murray GI (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189: 300-308.
142. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
143. Tsutsumi S, Scroggins B, Koga F, Lee MJ, Trepel J, et al. (2008) A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 27: 2478-2487.
144. Nie F, Yang J, Wen S, An YL, Ding J, et al. (2012) Involvement of epidermal growth factor receptor overexpression in the promotion of breast cancer brain metastasis. *Cancer* 118: 5198-5209.
145. Nickerson NK, Mohammad KS, Gilmore JL, Crismore E, Bruzzaniti A, et al. (2012) Decreased autocrine EGFR signaling in metastatic breast cancer cells inhibits tumor growth in bone and mammary fat pad. *PLoS One* 7: e30255.
146. Stellas D, El Hamidieh A, Patsavoudi E (2010) Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biol* 11: 51.
147. Rashid A, Liu C, Sanli T, Tsiani E, Singh G, et al. (2011) Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways. *Radiat Oncol* 6: 144.
148. Bourguignon LY, Xia W, Wong G (2009) Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *J Biol Chem* 284: 2657-2671.
149. Sanhaji M, Friel CT, Wordeman L, Louwen F, Yuan J (2011) Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget* 2: 935-947.

## SUMMARY

Chaperone proteins consist of a group of evolutionary conserved proteins with a broad distribution among bacteria and all eukaryotic organisms. Their presence is essential for cell survival in eukaryotic organisms. The main functions of chaperone proteins include the correct folding of newly synthesized proteins, the formation of protein complexes and the prevention of aggregates formation by missfolded proteins. This regulatory action is mainly achieved by the interaction of chaperone proteins with their clients or target proteins, which mainly consist of protein kinases and transcription factors.

Among the plethora of chaperone proteins, the most significant and well studied are HSP90 and its co-chaperone Cdc37. HSP90 is shown to have a pleiotropic action, interacting with a large group of kinases, transcription factors and steroid hormone receptors. For this pleiotropic action, HSP90 needs to cooperate with other chaperones or co-chaperone proteins. According to current experimental data, Cdc37 seems to be the favorable HSP90 co-chaperone. The dimeric HSP90-Cdc37 through the formation of multi-protein complexes regulates the activity of a large number of protein kinases, signalling molecules and steroid hormone receptors intracellularly. Both HSP90 and Cdc37 are involved in the main mechanisms for cell survival and metastasis of cancer cells, via their chaperoning activity to the deregulated kinases, transcription factors and receptors in cancer cells. For this reason Cdc37 and HSP90 are considered as attractive candidates for chemotherapy drug targeting.

Recently it was shown by our lab that HSP90 is localized not only in the cytoplasm- as known until then- but also in the cell surface of mouse melanoma and human mammary breast cancer cells. Furthermore, it was shown that cell surface HSP90 interacts with the extracellular domain (ECD) of HER-2 receptor. Using a monoclonal antibody against HSP90, namely mAb 4C5, which was produced in our laboratory previously and has the ability to remain bound on the cell surface and not to be internalized, it has been shown that functional blocking of cell surface HSP90 reduces the invasion ability of human breast cancer cells MDA-MB 453. This reduction is correlated with the blockage of the interaction of cell surface HSP90 and the ECD of HER-2, which in turn leads to lower levels of HER-2 activation. *In vivo* experiments in mice have also shown that mAb 4C5 reduces the formation of metastatic tumors from autologous melanoma cancer cells and expands the life expectancy in these mice.

Taking these data into account, at first we examined using immunofluorescence techniques, the cell surface localization of Cdc37 on MDA-MB 453 cells, where HSP90 was previously shown to be detected. To evaluate whether Cdc37 localization is restricted to MDA-MB 453 cells, which overexpress the HSP90 interacting HER-2 receptor, we further examined the cell surface localization of Cdc37 on MDA-MB 231 cancer cells, which do not express HER-2 but EGFR receptor instead. Cdc37 was indeed detected on the cell surface of both these cell lines by immunofluorescence. In order to verify the presence of Cdc37 on the cell surface of these cell lines, membrane protein extracts were analysed by Western blot analysis. The presence of Cdc37 was confirmed in both cell lines. Making a step forward we employed siRNA technology in order to knock down Cdc37 in both cell lines. siRNA-transfected cells exhibited extremely low levels of surface immunofluorescence staining compared to controls. These experimental findings further support our original observation, while they also verified the specificity of the antibody used, i.e. to specifically bind to cell surface Cdc37. Next, we showed using antibodies against Cdc37 and HSP90, that these proteins co-localize on the cell surface of live MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells.

Previously we showed that cell surface HSP90 participates in the invasion of MDA-MB 453 cancer cells. Based on these data, we decided to investigate whether cell surface Cdc37 also takes part in this process. In order to confirm that the observed results would not be caused by the inhibition of intracellular Cdc37, the internalization assay was performed in both MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cell lines using a commercial anti-Cdc37 antibody. By this assay, it was verified that the particular antibody is cell impermeable for both cell lines and remains bound to the cell surface even after 16 hours of incubation. By recruiting the “wound healing” assay it was shown that the specific anti-Cdc37 antibody significantly reduced the cell migration of both cancer cell lines, proving that cell surface Cdc37 is involved in the cancer cell invasion. By employing the same set of experiments we further demonstrate that mAb 4C5 reduces the migration of MDA-MB 231 cells.

In order to clarify the molecular mechanisms underlying the involvement of cell surface Cdc37 and HSP90 in cancer cell invasion, membrane protein fractions from both cell lines were immunoprecipitated using anti-Cdc37 antibodies. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blot, where we detected that cell surface Cdc37 interacts with cell surface HSP90 on

both MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells. In the same set of experiments it was also revealed that cell surface Cdc37 interacts with HER-2 and EGFR in MDAMB 453 and MDA-MB 231 cells, respectively. It was also shown that cell surface HSP90 interacts with EGFR in MDA-MB 231 cells. Incubation of cells with the anti-Cdc37 antibody revealed that the surface interaction of Cdc37 with HSP90 was reduced in both cell lines and simultaneously that the interaction of Cdc37 with HER-2 and EGFR was also reduced. When cells were incubated with mAb 4C5, the interaction of cell surface Cdc37 with HSP90 was also reduced in both cell lines. In the same set of experiments incubation of cells with mAb 4C5, interaction of Cdc37 with HER-2 and EGFR was also reduced in MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cell lines, respectively. These data suggest that a chaperoning system of receptor tyrosine kinase (RTK) exists on the cell surface of breast cancer cells, similar to the intracellular chaperoning machinery, with the formation of multiprotein complexes of Cdc37-HSP90-HER-2/EGFR. This model is further supported by our finding that functional inhibition of surface Cdc37 by the cell impermeable anti-Cdc37 antibody reduces the phosphorylation/activation of Akt in MDA-MB 453 cells as well as the phosphorylation/activation of EGFR, Akt and MEK in MDA-MB 231 cells. In MDA-MB 231 cells the functional inhibition of cell surface HSP90, using the cell-impermeable anti-HSP90 antibody mAb 4C5, also reduced the phosphorylation/activation of EGFR, Akt and MEK.

In a parallel study, our team showed that HSP90 is secreted in the culture media of both MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells. The secreted HSP90 seems to participate in the activation of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9.

As a next step in this study, we sought to investigate the role of cell surface HSP90 in the metastasis of breast cancer cells. For this purpose we used the two cell lines (MDA-MB 453 and MDA-MB 231) in two xenograft models using the immunodeficient mice SCID. In the first model the metastatic deposits of MDA-MB 453 cells in mice lungs were examined either with pre-incubation with the chimeric anti-HSP90 antibody ch4C5 or without pre-incubation. It was shown that cancer cell deposition in the lungs was significantly lower in SCID mice that had received cells pre-incubated with ch4C5. In the second experiment, SCID mice received MDA-MB 231 cells by intravenous injections and were treated for 2 weeks with mAb 4C5 or PBS (controls). Seven weeks later mice that had received mAb 4C5 treatment had reduced cancer metastatic nodules in their lungs.

Finally, in this thesis the effects of *Vitis vinifera* fruit (grape) extract on chaperone proteins were examined in MDA-MB 453 cells. It was shown that, although there was no effect on the dimeric HSP90-Cdc37 interaction or the total levels of HSP90 protein expression, it reduced the expression of total Cdc37 protein. Furthermore, the extract seems to affect the expression of HSP70 and proteolysis through the ubiquitination of cell proteins, in a differential manner. At this end, it has been shown that the particular plant extract induces cell death of MDA-MB 453 cancer cells and also prevents the completion of cell mitosis.

The data presented in the current thesis strengthen the notion of an extracellular chaperoning system, which is similar to the classical intracellular chaperoning machinery, where chaperone proteins act synergistically through multiple interactions in order to regulate a group of biomolecules. This system consists an attractive target for metastasis treatment.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

# Cell Surface Cdc37 Participates in Extracellular HSP90 Mediated Cancer Cell Invasion

Avraam El Hamidieh<sup>1</sup>, Nicholas Grammatikakis<sup>2</sup>, Evangelia Patsavoudi<sup>1,3\*</sup>

**1** Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, **2** Institute of Biology, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece, **3** Department of Biomedical Instrumentation Technology, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

## Abstract

Cdc37 is a 50 kDa molecular chaperone which targets intrinsically unstable protein kinases to the molecular chaperone HSP90. It is also an over-expressed oncoprotein that mediates carcinogenesis and maintenance of the malignant phenotype by stabilizing the compromised structures of mutant and/or over-expressed oncogenic kinases. Here we report that Cdc37 is not restricted intracellularly but instead it is also present on the surface of MDA-MB-453 and MDA-MB-231 human breast cancer cells, where it is shown to participate in cancer cell motility processes. Furthermore, we demonstrate using an anti-Cdc37 cell impermeable antibody, that similarly to its intracellular counterpart, this surface pool of Cdc37 specifically interacts with HSP90 as well as the kinase receptors HER2 and EGFR on the cell surface, probably acting as a co-factor in HSP90's extracellular chaperoning activities. Finally, we show that functional inhibition of surface HSP90 using mAb 4C5, a cell impermeable monoclonal antibody against this protein, leads not only to disruption of the Cdc37/HSP90 complex but also to inhibition of the Cdc37/ErbB receptors complexes. These results support an essential role for surface Cdc37 in concert with HSP90 on the cell surface during cancer cell invasion processes and strengthen the therapeutic potential of mAb 4C5 for the treatment of cancer.

**Citation:** El Hamidieh A, Grammatikakis N, Patsavoudi E (2012) Cell Surface Cdc37 Participates in Extracellular HSP90 Mediated Cancer Cell Invasion. PLOS ONE 7(8): e42722. doi:10.1371/journal.pone.0042722

**Editor:** Wanjin Hong, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore

**Received:** March 28, 2012; **Accepted:** July 10, 2012; **Published:** August 17, 2012

**Copyright:** © 2012 El Hamidieh et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** AEH received a fellowship from the Hellenic Pasteur Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: epatsavoudi@pasteur.gr

## Introduction

HSP90 is a molecular chaperone that functions in association with a cohort of co-chaperones to guide the stabilization and activation of an array of signaling proteins, including oncogenic kinases, transcription factors and hormone receptors [1,2]. Cdc37 (Cell division cycle protein 37) is considered as a key component of this multimeric chaperone machinery, playing a specialized and indispensable role in the maturation and/or stabilization of a large subset of protein kinases, implicated in signal transduction, proliferation and survival [3]. By blocking the closure of the N-terminal HSP90 ATP-binding site, Cdc37 inhibits the ATPase activity of HSP90 [4] and assists loading of kinase client proteins onto the chaperone machinery [4,5]. In particular, Cdc37 acts as an adaptor or scaffold, facilitating client kinase interaction with HSP90 [6] and subsequently by recruiting these client kinases into the HSP90 complex, it stabilizes and/or maintains them in a folding-competent conformation [7]. In addition, Cdc37 promotes the assembly of HSP90-protein kinase complexes [8] and expression of a dominant-negative form that lacks the HSP90-binding domain inhibits kinase activation in mammalian cells [9]. Many client proteins interact directly with both Cdc37 and HSP90 and their folding, maturation and stability depend on the activity of both chaperones. Hence Cdc37 mediates the formation of HSP90-Raf1 [9] and HSP90-Cdk4 complexes [10] and these interactions are necessary for protein stability and kinase function. The complex relationship between Cdc37 and HSP90 is illustrated by the finding that their interaction is stabilized by the client

protein [11]. Over the past years there has been increasing evidence demonstrating that intracellular HSP90 plays a pivotal role in the acquisition and maintenance of the malignant phenotype [12,13,14,15]. Accordingly, there is growing interest in Cdc37 in the context of malignancy [16,17] since Cdc37 also regulates multiple oncogenic kinase clients. Indeed Cdc37 levels are found increased in many clinical cancers [17]. In particular, Cdc37 is increased in proliferating tissues, and is heavily expressed in certain cancers including anaplastic large cell lymphoma [18] acute myelocytic leukaemia [19], hepatocellular carcinoma [20] and multiple myeloma [21]. Furthermore, data have been presented indicating that Cdc37 can function as an oncogene, as mice engineered to over-express Cdc37 develop tumors at a high frequency [22], suggesting that the establishment of protein kinase pathways mediated by HSP90/Cdc37 can be a rate-limiting event in epithelial cell transformation [22]. More recently it has been shown that Cdc37 is essential for maintaining prostate tumor cell growth [23]. Additionally, the platelet-derived growth factor receptor alpha which is up-regulated and activated in several malignancies forms a complex with HSP90 and the co-chaperone Cdc37 in ovarian, glioblastoma, and lung cancer cells [24]. Together, these results support the targeting of Cdc37 for cancer therapy.

We and others have previously identified an extracellular pool of HSP90 both in normal and cancer cells which was shown to be involved in migration and invasion processes, respectively [25,26,27,28,29,30]. Furthermore, and by exploiting the function

blocking properties of a cell-impermeable monoclonal antibody named mAb 4C5, specifically targeted against HSP90 we have shown that extracellular HSP90 interacts with HER-2 on the cell surface [28] as well as metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 [29]. Although a growing number of HSP90's co-chaperones such as HSP70, Hop and p23 were also found on the cell surface [31,32,33], their action and underlying mechanisms have not been elucidated yet. Taking the above into consideration, in the present work we explore the cell surface localization of Cdc37 and we examine its possible involvement in cancer cell invasion processes as well as its potential interacting partners during this process, using the MDA-MB-453 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines and a commercially available polyclonal antibody against Cdc37. Furthermore and taking into account previously reported data showing that mAb 4C5 inhibits cancer cell invasion by disrupting association of extracellular HSP90 with HER2 [28] and metalloproteinases MMP2 and MMP9 [29] in this work we investigate the possible effect of this cell impermeable anti-HSP90 antibody on the interactions of surface Cdc37 with HSP90 and the ErbB receptors.

## Materials and Methods

### Antibodies and reagents

mAb 4C5 was produced in our laboratory, as previously described [34]. In the present study, mAb 4C5 was used as concentrated serum-free supernatant in all experiments performed. Polyclonal antibodies against EGFR, HER-2 and monoclonal antibody against Cyclin D1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Two anti-Cdc37 antibodies, from Santa Cruz Biotechnology and Abcam recognizing different epitopes were used. Polyclonal antibodies against HSP90 were from Chemicon International. DMEM, RPMI and fetal bovine serum (FBS), were from Invitrogen. All other materials were from sources previously described [25].

### Cell cultures and immunofluorescence

HER-2-over-expressing MDA-MB-453, EGFR-over-expressing MDA-MB-231 breast cancer cell lines and non cancerous epithelial breast cells MCF-12A were purchased from American Type Culture Collection. MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells were maintained in RPMI and DMEM, respectively, supplemented with 10% FBS. MCF-12A cells were maintained in DMEM-HAM F12 supplemented with 20 ng/ml human EGF, 100 ng/ml hydrocortisone, 0.01 mg/ml bovine insulin and 10%FBS.

For immunofluorescence studies, cells were plated on poly-L-lysine-coated coverslips, at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well in a 48-well plate and cultured in the appropriate medium supplemented with 10% FBS. After 24 h, cells were shifted to serum-free medium for 18 h. Live MDA-MB-453, MDA-MB-231 and MCF-12A cells were labeled by indirect immunofluorescence as previously reported [28]. Briefly, unfixed cells were incubated with 2 µg/ml anti-Cdc37 antibody for 2 h. The cells were then washed, fixed in ice-cold acetone and labelled with Alexa488-conjugated secondary antibody.

### Preparation of cell lysates, Western blot analysis and Co-immunoprecipitation

Cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks in culture medium supplemented with 10% FBS until sub-confluence, shifted in serum-free medium for 24 h and then exposed to anti-Cdc37 and/or mAb 4C5 for 16 h. Control cultures were grown either in culture medium alone or in culture medium containing 200 µg/ml of an IgG2a monoclonal antibody against the unrelated protein

BM88 [35]. Excess non-bound antibody was then removed by washing with fresh medium. The cultures were immediately washed twice with ice-cold PBS and lysed as previously described [28].

Cellular fractionation was performed in cell cultures prepared and treated as described above, using the Compartmental protein extraction kit (Chemicon), according to the manufacturer's instructions.

Total and/or compartmental protein lysates were quantified, and equal amounts of total protein were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot with the appropriate antibodies. Immunoreactive bands were detected using an ECL chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences) and X-OMat AR film (Eastman Kodak Co.) as described by the manufacturers.

Co-immunoprecipitation was performed as previously described [25]. In brief, equal amounts of pre-cleared cellular lysates were incubated with the appropriate antibodies for 18 h at 4°C. The immunocomplexes were then incubated for 2 h at room temperature with protein G-Sepharose and washed three times with lysis buffer. Bound proteins were analyzed by gel electrophoresis followed by Western blot as described above. For all immunoprecipitation experiments, negative controls were performed using irrelevant IgGs.

### Antibody Internalization Assay

Antibody internalization experiments were performed as previously described [28]. Briefly, cells were incubated while in culture with 200 µg/ml anti-Cdc37 antibody for 16 h. The cells were then washed and fixed in cold acetone for 3 min. For detection of possible internalization of the antibody, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and subsequently incubated with Alexa488-conjugated secondary antibody (Molecular Probes). For all experiments, controls were performed using mAb 4C5 which is cell impermeable and the commercial anti-HSP90 which is internalized [27].

### RNA interference

Plasmid pLL3.7 with an insertion targeting Cdc37 was used. Cdc37 was knocked down using short hairpin RNAs. To this purpose the "WI siRNA Selection Program" from Whitehead Institute for Biomedical Research was used, to design and select the siRNA targeting Cdc37. In order to create a stem-loop structure, a spacer (TTCAAGAGA) was inserted into the sense and antisense sequences. DNA oligomers were annealed and cloned into the pLL3.7 plasmid. The insertion was confirmed by sequencing. MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells were grown at a density of 70% and then transfected with 3 µg of plasmid DNA with the inserted sequences or not (control), using the Xfect Transfection reagent from Clontech, according to manufacturers protocol. 72 hours after transfection, cells were collected, lysed and subjected to Western blot analysis. For immunofluorescence detection of Cdc37, cells were plated on poly-L-lysine coated coverslips and transfected with plasmid DNA as above. 72 hours after transfection, live cells were washed with PBS, incubated with anti-Cdc37 antibody for 2 hours, fixed with ice cold acetone and labeled with Alexa647-secondary antibody.

### Wound Healing Motility Assay

The assay was performed as previously described [28]. Briefly, MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells were plated in a 48-well plate at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/well and  $5 \times 10^5$  cells/well, respectively, and were left for 24 h in serum-containing medium, without further treatment. The medium was then changed to serum-free, and 16 h later, a cell-free area was generated by gently

scratching the cell monolayer with a sterile yellow Gilson-pipette tip, thus resulting in the formation of a 1-mm-wide cell-free area. Immediately after scratching, the medium was replaced with fresh medium, or medium containing the anti-Cdc37 antibody. Control cultures were grown either in culture medium alone or in culture medium containing 200 µg/ml of an IgG2a monoclonal antibody against the unrelated protein BM88 [35].

Migration of breast cancer cells within the gap was monitored microscopically at given time intervals, using a Leica DM II inverted microscope, equipped with a LEICA DM300 video camera connected to a computer. Inhibition of migration was estimated by acquiring and analyzing digital images, using the Image Pro Plus analysis software [36] and evaluated with two different ways depending on the cell line studied. More specifically for the MDA-MB-453 cells it was expressed as the percentage of distance covered by cells in control cultures, whereas for the MDA-MB-231 cells it was expressed as the percentage of cells observed within the gap of the wound in control cultures. Statistical analysis was performed by using Student's *t* test.

## Results

### Cdc37 is expressed on the cell surface of MDA-MB-453 and MDA-MB-231 breast cancer cells

In order to examine the cell surface localization of Cdc37, unfixed MDA-MB-453 and MDA-MB-231 human breast cancer cells were incubated with the anti-Cdc37 antibody. The cells were then washed, fixed and labelled with Alexa488-conjugated secondary antibody. Thus the primary antibody had access only to the external surface of the cell. The observed immunostaining confirmed the cell surface localization of Cdc37 in both human breast cancer cell lines studied (Fig. 1). As positive control, mAb 4C5 which specifically binds to surface HSP90 whose presence has been previously shown in both cell lines [28] [26] was used. At this point it is of interest to note that immunofluorescence experiments showed, as expected, absence not only of Cdc37 but also of HSP90 on the surface of adult non cancerous MCF-12A cells (Fig. S1). Additional positive controls were applied, using antibodies against HER-2 and EGFR for the MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells, respectively. Finally antibodies against EGFR and HER2 were used as negative controls in MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells, respectively (Fig. 1A and B). The above results were confirmed by Western blot using membrane fractions derived from the two cell lines (Fig. 1C and D). As positive control anti-HER2 (Fig. 1C) and anti-EGFR (Fig. 1D) antibodies were used, in MDA-MB-453 and MDA-MB-231 membrane cell lysates, respectively. In the cytosolic fractions and as expected anti-Cdc37 gave positive immunostaining whereas the antibodies against the ErbB receptors were negative. Furthermore, the cytosolic fractions of both cell lines gave positive immunostaining when immunoblotted with antibody against the intracellular protein Cyclin D1, whereas the membrane fractions were negative (Fig. 1C and D), thus confirming the purity of the fractions used here and in the immunoprecipitation experiments described below.

In order to confirm the specificity of the commercial anti-Cdc37 antibody used in our studies, the siRNA technology was applied. More specifically, when MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells transfected with siRNA targeting Cdc37 were immunostained as described above with the anti-Cdc37 antibody, an extremely weak labelling was observed when compared to cells transfected with the control vector (Fig. 2 A and B). Similarly when western blot analysis using the anti-Cdc37 antibody was performed in total cell lysates derived from the above cells, a significantly decreased immunostaining was obtained in the lysates of the transfected with

siRNA targeted against Cdc37 when compared to controls (Fig. 2C and D).

### The anti-Cdc37 antibody is cell impermeable

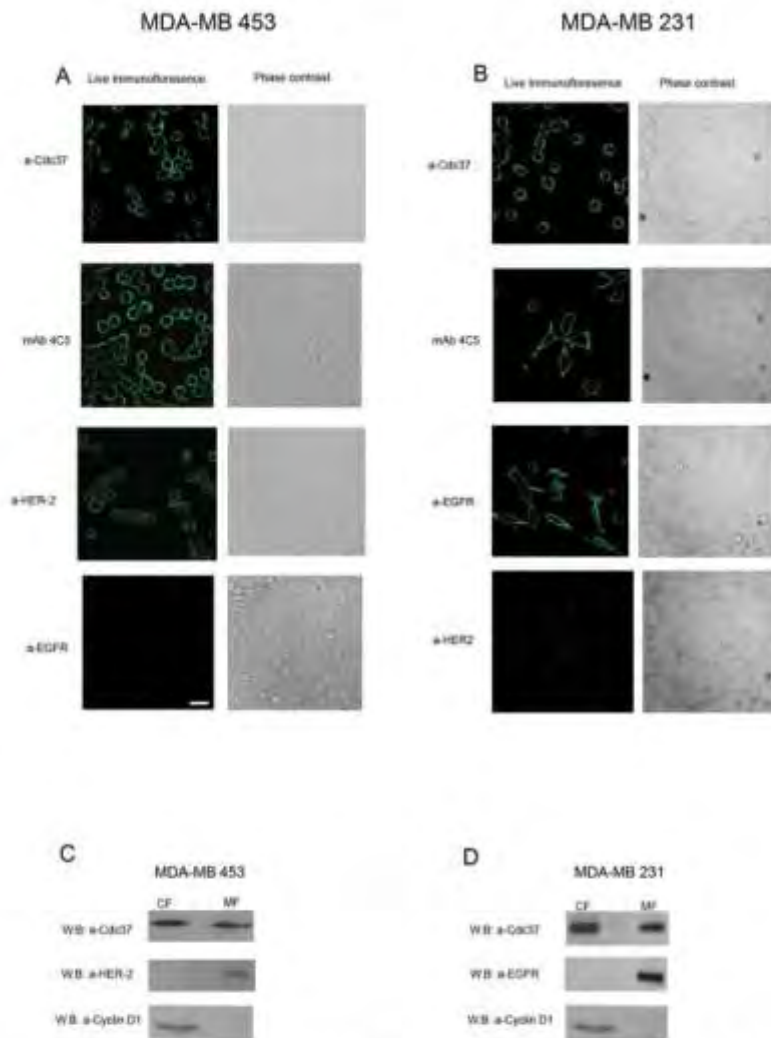
The cell impermeable nature of the anti-Cdc37 used was examined by incubating the MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells while in culture with the antibody for 16 h. The cells were then carefully washed, and binding of the antibody was analyzed after fixation and cell permeabilization, using an Alexa488-conjugated secondary antibody. We observed that for both cell lines the anti-Cdc37 antibody was not internalized and remained bound on the cell surface (Fig. 3). MAb 4C5 and the polyclonal anti-HSP90 which have previously been shown to remain on the surface and be internalized respectively [27], were used as controls (Fig. 3). It should be noted that when the above mentioned cells were incubated with culture medium alone as a negative control, no immunostaining was obtained (data not shown).

### Surface Cdc37 is involved in breast cancer cell motility

Having established that the anti-Cdc37 antibody is not internalized but instead remains specifically bound to the cell-surface when incubated with living MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells, we next examined the possible involvement of surface Cdc37 on the motility of these breast cancer cells, using the wound healing assay. Control cultures were grown either in culture medium alone or in culture medium containing 200 µg/ml of an antibody against the unrelated protein BM88 [35]. It is important to note that no statistically significant difference was observed between the two types of controls used. The control value illustrated is the mean value of the two types of control. As shown in Fig. 4A, and Fig. 5A presence of the anti-Cdc37 antibody in the culture medium of both the MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells, resulted in a significantly slower rate of wound closure, when compared to controls cultures grown in culture medium alone. More specifically, a 57.7% and 35.8% inhibition of cancer cell motility was obtained when 200 µg/ml of anti-Cdc37 was included in the culture medium of MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells respectively (Figs. 4C and 5C). Trypan blue staining carried out at the end point of the wound healing assay, showed that the death rate of cells treated with the antibody was similar to that observed in the control cultures for both cell lines (Figs. 4B and 5B). This result further supports that the decreased cell motility observed in the presence of the anti-Cdc37 antibody which is not internalized is not caused by cell death but instead by the inhibition of the surface pool of Cdc37. At this point it is important to note that in this assay, the effect of the anti-Cdc37 antibody is directed towards cell invasion and not towards cell proliferation, since very low (<7%) BrdU incorporation was observed in both human breast cancer cell cultures treated as above with no apparent differences between the different experimental conditions (data not shown).

### Surface Cdc37 interacts with HSP90 in both breast cancer cell lines and with HER-2 and EGFR in MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells respectively

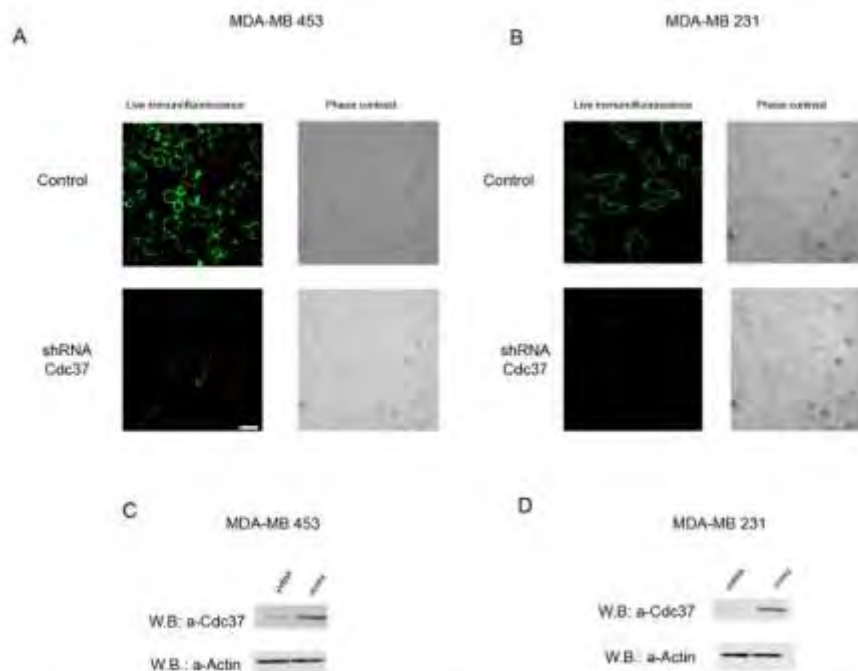
Taking into account the above shown involvement of surface Cdc37 in cancer cell invasion processes we next examined the possible interactions of this molecule with HSP90 and the ErbB kinase receptors. To this purpose we performed co-immunoprecipitation experiments using membrane fractions derived from the MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells cultured either in control medium as mentioned in Materials and Methods or in the presence of 200 µg/ml of anti-Cdc37 antibody for 16 h and



**Figure 1. Cdc37 is localized on the cell surface of MDA-MB 453 and MDA-MB 231 breast cancer cells.** **A**, Indirect immunofluorescence of live MDA-MB 453 cells using anti-Cdc37 antibody. The immunolabeling reveals the surface localization of Cdc37. Anti-HER2 and mAb 4C5 were used as positive controls. Anti-EGFR antibody was used as negative control. **B**, Indirect immunofluorescence of live MDA-MB 231 cells using anti-Cdc37 antibody. Anti-EGFR and mAb 4C5 were used as positive controls. Anti-HER2 antibodies were used as negative control. **C**, Cell fractionation of MDA-MB 453 cells followed by Western blot analysis confirmed the presence of Cdc37 in cell membrane fractions. Anti-HER2 antibodies were used as positive and negative controls in the membrane and cytosolic fractions respectively. **D**, Cell fractionation of MDA-MB 231 cells followed by western blot analysis confirmed the presence of Cdc37 on cell membrane fractions. Anti-EGFR antibodies were used as positive and negative controls in the membrane and cytosolic fractions respectively. In C and D antibody against the intracellular protein Cyclin D1 gave positive and negative immunostaining in the cytosolic and membrane fractions of both cell lines, respectively. CF, cytosolic fraction; MF, membrane fraction. Scale bar = 20  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0042722.g001

immunoprecipitated with the anti-Cdc37 antibody. Western blot analysis using anti-HSP90, anti-HER2 and anti-EGFR antibodies respectively, revealed that the anti-Cdc37 antibody specifically disrupts the surface interaction of Cdc37 with HSP90 and both

receptors in the two cell lines studied (Fig. 6A) since a reduced amount of these molecules was observed in the treated cultures when compared to the controls. At this point it is important to note that the observed disruption confirms the cell surface



**Figure 2. Specificity of the commercial anti-Cdc37 antibody and confirmation of the cell surface localization of Cdc37, using siRNA technology targeting Cdc37.** A, B, immunofluorescence of live MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells respectively, using anti-Cdc37 antibody. Cells were transfected with siRNA targeting Cdc37 (shRNA Cdc37) or with plasmid DNA without any insertion (control). ShRNA Cdc37 transfected cells exhibit extremely low levels of surface immunofluorescence staining as compared to controls. Scale bar = 20  $\mu$ m. C, D, Western blot analysis of total cell lysates derived from MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells respectively, using the anti-Cdc37 antibody, in cells transfected with siRNA targeting Cdc37 and control cells. The level of Cdc37 detected is significantly lower in both cell lines transfected with siRNA targeting Cdc37, when compared with control transfections. doi:10.1371/journal.pone.0042722.g002

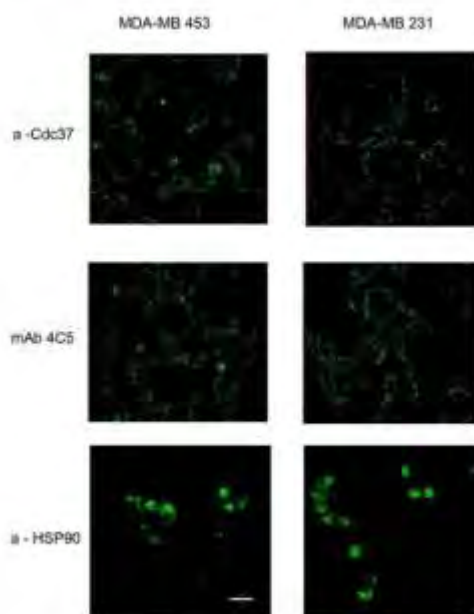
localization of the molecular interactions studied, since as shown above, the anti-Cdc37 antibody is not internalized and remains bound to the cell surface when included in the culture medium.

#### MAb 4C5 specifically disrupts the surface interaction of Cdc37 with HSP90 and the ErbB receptors

Having established that similarly to its intracellular counterpart, surface Cdc37 is physically associated with surface HSP90, we next sought to investigate the effect of the function blocking anti-HSP90 monoclonal antibody, mAb 4C5, in this interaction. To this end, membrane fractions derived from MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cultures that were treated with 200  $\mu$ g/ml of mAb 4C5 for 16 h were immunoprecipitated with the anti-Cdc37 antibody. Western blot analysis using anti-HSP90 revealed that mAb 4C5 specifically disrupts the surface interaction of Cdc37 with HSP90 in both cancer cell lines used (Fig. 6B). More specifically the anti-Cdc37 antibody co-immunoprecipitated lower levels of HSP90 in the mAb 4C5 treated cultures when compared to the controls.

We have previously shown using mAb 4C5 that surface HSP90 specifically interacts with the extracellular domain of HER-2 in MDA-MB-453 cells [28]. In the present work and in order to further examine the mode of action of surface Cdc37 in the two

cell lines studied, it was necessary to first investigate the possible interaction of the surface pool of HSP90 with EGFR. To this end, membrane fractions derived from MDA-MB-231 cultures treated in the absence or in the presence of 200  $\mu$ g/ml mAb 4C5 for 16 h, were immunoprecipitated with the anti-HSP90 antibody and immunoblotted with anti-EGFR. As shown in Fig. 6C, EGFR specifically interacts with HSP90. The observed reduction in the presence of the cell impermeable mAb 4C5 indicates the cell surface localization of this interaction. Having shown the association of surface HSP90 and EGFR and additionally that Cdc37 interacts not only with HSP90 but also with HER2 and EGFR we next sought to investigate the possible effect of mAb 4C5 on the co-chaperone's interaction with the ErbB receptors. Accordingly membrane fraction derived from MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cultures treated or not with 200  $\mu$ g/ml mAb 4C5 for 16 h were immunoprecipitated with the anti-Cdc37 antibody. Western blot analysis using anti-HER2 and anti-EGFR antibodies respectively, revealed that mAb 4C5 specifically disrupts the surface interaction of Cdc37 with both receptor molecules since lower levels of the ErbB receptors were observed in the mAb 4C5 treated cultures (Fig. 6B).



**Figure 3. The anti-Cdc37 antibody is cell impermeable.** Anti-Cdc37 antibody internalization was tested in both MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells. Live cells from the two cell lines were grown on coverslips and incubated at 37°C for 16 h with anti-Cdc37. mAb 4C5 and anti-HSP90 were used as positive and negative controls respectively. For detection of antibody internalization, cells were fixed and permeabilized as described in materials and methods and antibodies were detected by confocal microscopy using an Alexa 488 secondary antibody. No internalization of the anti-Cdc37 antibody was observed even in both cell lines. Scale bar = 20  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0042722.g003

## Discussion

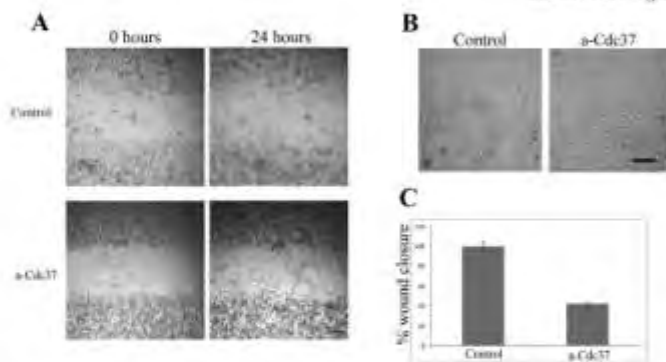
In the present work we demonstrate that the co-chaperone Cdc37 is localized on the surface of MDA-MB-453 and MDA-MB-231 breast cancer cells, where it is necessary for the motility of these cells and similarly to its intracellular counterpart it specifically interacts with the molecular chaperone HSP90. Moreover our findings show that this surface pool of Cdc37 directly interacts with members of the ErbB family of growth factor receptors possibly acting as a co-factor in HSP90 extracellular chaperoning activities implicated in cancer cell invasion processes and that the anti-HSP90 antibody mAb 4C5 disrupts these interactions.

Cell surface localization of Cdc37 was demonstrated by both immunocytochemistry on live MDA-MB-453 and MDA-MB-231 breast cancer cells and western blot using membrane fraction lysates derived from these cell lines.

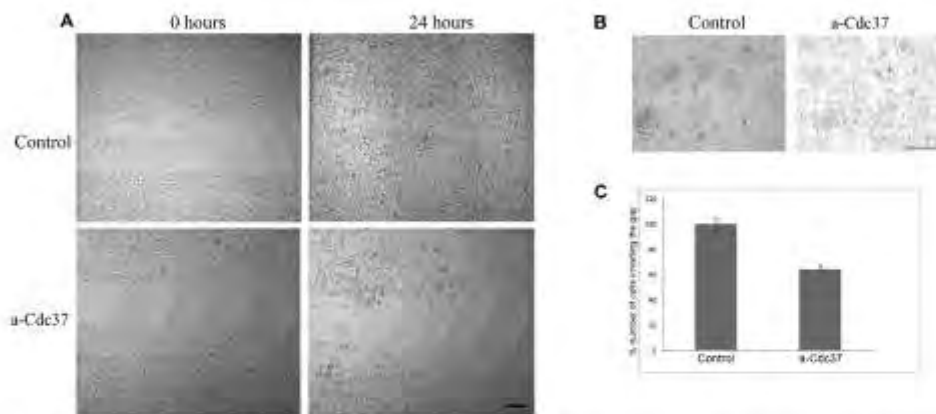
The inhibition of MDA-MB-453 and MDA-MB-231 breast cancer cell motility, by the anti-Cdc37 antibody was shown using the wound healing assay. Presence of this antibody in the culture medium significantly reduced the motility rate of both cell lines studied. At this point it is interesting to note that when the anti-HSP90 antibody mAb 4C5 and the anti-Cdc37 antibody were included either separately or combined in the culture medium of the above cells no statistically significant differences were observed in the wound closures. This is not surprising since mAb 4C5 and anti-Cdc37 are targeted against two different molecules involved in the cell motility process (data not shown).

To assess the participation of cell surface and not intracellular Cdc37 in the motility process of the cancer cells studied, internalization of the anti-Cdc37 antibody was examined. Interestingly, the antibody remained bound to the cell surface of both MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cells, even after 16 h in culture and was not internalized indicating that the previously mentioned inhibitory effect of the anti-Cdc37 antibody is due to binding of the antibody to the cell surface pool of Cdc37.

It is well established that intracellular Cdc37 acts as co-chaperone of HSP90 by targeting protein kinases to the chaperone machinery and thus contributing to their activation. Taking this into account together with the above mentioned results we next



**Figure 4. Cdc37 is involved in MDA-MB-453 cell invasion.** **A**, Wound healing assay. Images obtained at 0 hours and 24 hours after scratch formation. Cells were let to migrate in control conditions or in the presence of 200  $\mu$ g/ml of anti-Cdc37 antibody. **B**, At the end of the time point cells were stained with Trypan Blue. No significant cell death is observed in both cases. **C**, Quantitative effect of Cdc37 in cell migration. The addition of 200  $\mu$ g/ml of anti-Cdc37 antibody in the cell culture medium resulted in a 57.7% inhibition of wound closure when compared to the control that was considered as 100% wound closure ( $P < 0.005$ ). Column is the average of three independent experiments  $\pm$  SE. Within a single experiment each condition was tested in triplicate. Scale bars A = 165  $\mu$ m, B = 80  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0042722.g004



**Figure 5. Cdc37 is involved in MDA-MB 231 cell invasion.** **A**, Wound healing assay. Images obtained at 0 hours and 24 hours after scratch formation. Cells were let to migrate in control conditions as described in Materials and Methods or in the presence of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of anti-Cdc37 antibody. **B**, At the end of the time point cells were stained with Trypan Blue. No significant cell death is observed in both cases. **C**, Quantitative effect of Cdc37 in cell migration. The addition of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of anti-Cdc37 antibody in the cell culture medium resulted in 35.8% inhibition of cells invading the gap when compared to the control that was considered as 100% wound closure ( $P < 0.005$ ). Column is the average of three independent experiments  $\pm$  SE. Within a single experiment each condition was tested in triplicate. Scale bars A = 165  $\mu\text{m}$ , B = 80  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0042722.g005

examined the possible association of cell surface Cdc37 with the surface pools of HSP90 and the ErbB receptors. Indeed immunoprecipitation experiments using MDA-MB-453 and MDA-MB-231 cell lysates showed that Cdc37 interacts not only with HSP90 but also with HER2 and EGFR respectively. Disruption of these interactions when the cell impermeable anti-Cdc37 was included in the culture medium of the cell lines studied, further confirmed the cell surface localization of the interacting molecules. Our results in combination with previously reported data showing contribution of cell surface HSP90 in cancer cell invasion [28] suggest that surface Cdc37 participates in cancer cell invasion by acting similarly to its intracellular counterpart as co-chaperone to surface HSP90 in association with the protein kinase receptors.

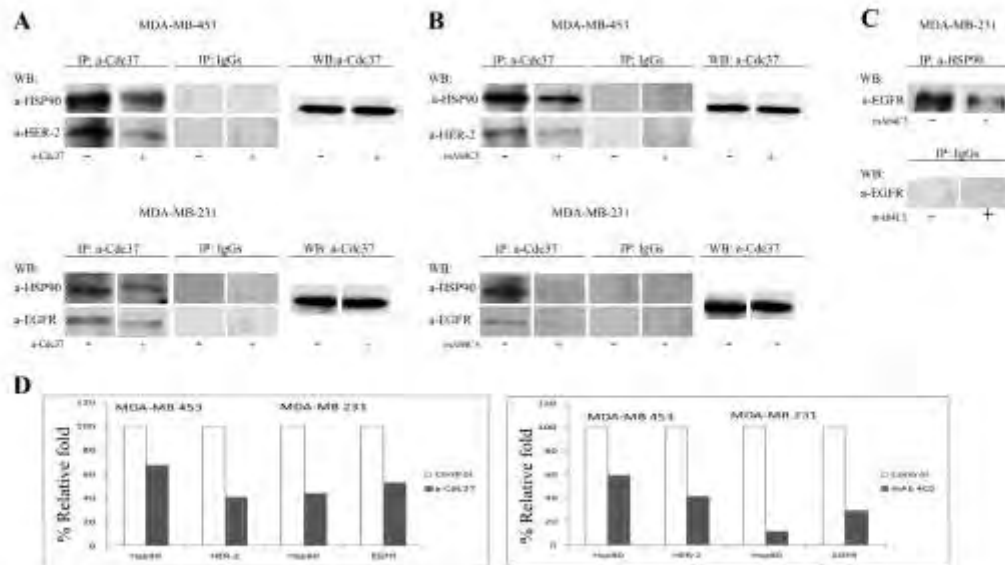
We have previously shown that participation of surface HSP90 in cancer cell invasion processes occurs through its interaction with the extracellular domain of HER-2 in MDA-MB-453 cells, and that this interaction is disrupted by the cell impermeable anti-HSP90 antibody mAb 4C5 [28]. As a follow up of these results in the present work we investigated the involvement of surface HSP90 in the invasion processes of MDA-MB-231 cells and the possible association of this chaperone with EGFR. Immunoprecipitation experiments in the presence or absence of mAb 4C5 in the culture medium of MDA-MB-231 cells revealed that mAb 4C5 strongly inhibits the invasive capacity of these cells (data not shown), and that it disrupts interaction between surface HSP90 and EGFR. To our knowledge this is the first report of a surface interaction between HSP90 and EGFR.

Taking into account all the above results we next examined the possible effect of mAb 4C5 on the interactions of Cdc37 with HSP90 and the ErbB receptors. Indeed, immunoprecipitation experiments in MDA-MB-453 and MDA-MB-231 membrane fractions of cells cultured in the absence or presence of mAb 4C5 revealed that this antibody significantly decreased the amount not only of HSP90 but interestingly also of HER-2 and EGFR respectively in the Cdc37-immunoprecipitated lysates, indicating

that the formation and/or stabilization of the Cdc37/HSP90/kinase receptor complex is disrupted by mAb 4C5. In the above mentioned complex, HSP90 interacts simultaneously with Cdc37 via its N-terminal region [5] whilst a region within the N-terminal and middle domain is associated with the kinase client protein [37]. Moreover Cdc37 is associated with the catalytic domain of the kinase client via its N-terminal domain [5]. Taking into account these reports, the following interpretation of our results is largely at the level of speculation. It is conceivable that mAb 4C5 may bind either a) to the N terminal of HSP90 and thus inhibit the HSP90-Cdc37 interaction which in turn may induce conformational changes to the two molecules that prevent their association with the kinase receptors or b) to a region within the N terminal and middle domain of the chaperone and thus inhibit the HSP90-kinase receptor interaction which may result in conformational changes of these molecules that prevent Cdc37 association with HSP90 and the ErbB receptors. This last scenario is supported by very recent data [38] demonstrating that a 115-aa fragment within the linker region and middle domain of secreted HSP90 acts as a pro-motility wound healing agent in mice. In any case our data strongly indicate that the conformational state of the molecules in the HSP90/Cdc37/kinase receptor complex is of great importance for their effective interactions.

In conclusion in the present work we demonstrate the cell surface localization of Cdc37 and its participation in invasion processes of breast cancer cells. Moreover we show that this surface pool of Cdc37 is associated with HSP90 and the ErbB kinase receptors HER2 and EGFR, thus indicating that it acts similarly to its intracellular counterpart as co-chaperone in the HSP90 machinery. Finally we show that the cell impermeable anti-HSP90 mAb 4C5 which has been previously shown to inhibit cancer cell invasion and metastasis [27,28,29] has the capacity to impair all the molecular interaction in the Cdc37/HSP90/kinase receptor complex. Our study reinforces existing reports regarding the oncogenic role of Cdc37 and its value as a target for cancer therapy.





**Figure 6. Cell surface interaction of Cdc37 and HSP90.** A, Membrane protein fractions from MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells (control) were immunoprecipitated with anti-Cdc37 antibody. Analysis of bound proteins by Western blot with anti HSP90 antibody and anti HER-2 and anti - EGFR antibodies respectively, revealed that Cdc37 interacts not only with HSP90 but also with both ErbB receptors studied. Presence of 200  $\mu$ g/ml of the cell impermeable anti-Cdc37 for 16 h in the culture medium of the two cell lines followed by immunoprecipitation and Western blot analysis as above revealed that the anti-Cdc37 antibody disrupts the association of Cdc37 with HSP90 and the ErbB receptors in the two cell lines. B, MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells were treated or not with 200  $\mu$ g/ml mAb 4C5 for 16 hours. Membrane protein fractions derived from these cultures were immunoprecipitated with anti-Cdc37 followed by Western blot analysis using anti-HSP90 and anti-HER2 and anti EGFR antibodies respectively. C, Membrane protein fractions from MDA-MB 231 cells cultured in the absence or presence of 200  $\mu$ g/ml of mAb 4C5 for 16 h were immunoprecipitated with the anti-EGFR antibody. Analysis of bound proteins by western blot with anti-HSP90 antibody revealed that surface HSP90 interacts with EGFR and that this interaction is disrupted by mAb 4C5. Irrelevant IgGs served as negative control for all the above experiments. D, Densitometry quantification of the observed reduced interactions in the presence of anti-Cdc37 in the culture medium of MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells resulted in a 33% and 59% decrease with HSP90 and HER-2 respectively regarding the MDA-MB 453 cells and in a 56% and 47% decrease with HSP90 and EGFR respectively regarding the MDA-MB 231 cells. Presence of mAb 4C5 in the culture medium of MDA-MB 453 and MDA-MB 231 cells resulted in a 60% and 58% decrease with HSP90 and HER-2 respectively regarding the MDA-MB 453 cells and in a 88% and 70% decrease with HSP90 and EGFR respectively regarding the MDA-MB 231 cells. doi:10.1371/journal.pone.0042722.g006

### Supporting Information

**Figure S1** Cdc37 and HSP90 are absent from the cell surface of adult non cancerous MCF-12A cells. Indirect immunofluorescence of live MCF-12A cells using anti-Cdc37 antibody (A) and anti-HSP90 antibody (B), revealed absence of these molecules from the cell surface. In contrast, expression of Cdc37 (A) and HSP90 (B) proteins is very intense in the cytoplasm of these cells. Scale bar = 20  $\mu$ m (TIF)

### References

- Picard D (2005) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59: 1649–1648.
- Pratt WB, Toth DO (2005) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* (Maywood) 230: 111–135.
- Smith JR, Workman P (2009) Targeting GDC37: an alternative, kinase-directed strategy for disruption of oncogenic chaperoning. *Cell Cycle* 8: 362–372.
- Silgard G, Panatier B, Meyer P, Singh S, Washford DN, et al. (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the  $\alpha$ -chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem* 277: 20151–20159.
- Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan GK, Panatier B, et al. (2004) The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific chaperone p50cdc37. *Cell* 116: 87–98.
- Silverstein AM, Grammatikakis N, Cochran BH, Chinkers M, Pratt WB (1996) p50cdc37 binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetrapeptide repeat binding site. *J Biol Chem* 271: 30990–30995.
- Kimura Y, Balesarford SL, Miyata Y, Yataira I, Freeman BC, et al. (1997) Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev* 11: 1775–1785.

### Acknowledgements

We thank Dr. K. Sidera for stimulating and valuable discussions, and Dr. E. Picard for precious suggestions and for critically reading the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EP. Performed the experiments: AEH NG. Analyzed the data: EP AEH. Contributed reagents/materials/analysis tools: NG. Wrote the paper: EP.

6. Stepanova L, Long X, Harper JW (1997) Analysis of mammalian Cdc37, a protein kinase targeting subunit of heat shock protein 90. *Mol Cell Biochem* 203: 220–229.
9. Grammatikakis N, Lin JH, Grammatikakis A, Tschida YS, Cochran BH (1999) p50(Cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* 19: 1661–1672.
10. Stepanova L, Long X, Parker SB, Harper JW (1996) Mammalian p30(Cdc37) is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Gsk3. *Genes Dev* 10: 1491–1500.
11. Hartono SD, Irwin AD, Shao J, Scroggins BT, Volk L, et al. (2007) p30(Cdc37) is a nonexclusive Hsp90 cohort which participates intimately in Hsp90-mediated folding of immature kinase molecules. *Biochemistry* 46: 7631–7644.
12. Baggett R, Whitesell L (2006) Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Mol Cancer Ther* 5: 1021–1030.
13. Calderwood SK, Khandelwal MA, Sawyer DB, Cincea DR (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31: 164–172.
14. Neckers L (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8: 555–61.
15. Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 761–772.
16. Yeat LH (2005) Hsp90 and Cdc37 – a chaperone cancer conspiracy. *Curr Opin Genet Dev* 15: 55–61.
17. Gray PJ Jr, Prince T, Cheng J, Stevenson MA, Calderwood SK (2008) Targeting the oncogene and kinase chaperone CDC37. *Nat Rev Cancer* 8: 491–495.
18. Thompson MA, Stumph J, Hennickson SE, Rosenwald A, Wang Q, et al. (2005) Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 36: 494–504.
19. Casio S, Olla J, Avetis A, Vihlsten M, Sierra J, et al. (2005) Changes in apoptosis-related pathways in acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 146: 89–101.
20. Foa F, De Maglio MR, Simir MM, Mariani MR, Cobbi DF, et al. (2006) Hepatosplenic carcinoma as a complex polygenic disease: Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim Biophys Acta* 1767: 126–147.
21. Kasayama Y, Sakai A, Okikawa Y, Oue N, Asaoku H, et al. (2004) Cyclin D1 overexpression is not a specific grouping marker, but may collaborate with CDC37 in myeloma cells. *Int J Oncol* 25: 579–595.
22. Stepanova L, Finegold M, DeMayo F, Schmidt EV, Harper JW (2000) The oncogene kinase chaperone CDC37 functions as an oncogene in mice and collaborates with both c-myc and cyclin D1 in transformation of multiple tissues. *Mol Cell Biol* 20: 4462–4473.
23. Gray PJ Jr, Stevenson MA, Calderwood SK (2007) Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Res* 67: 11942–11950.
24. Maiti D, Sarpathy M, Guo L, Lai YC, Nalashrin H, et al. (2007) The platelet-derived growth factor receptor alpha is destabilized by geldanamycin in cancer cells. *J Biol Chem* 282: 445–453.
25. Sidra K, Samionaki M, Yfanti E, Panayotou G, Patsavoudi E (2004) Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 279: 45379–45388.
26. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, et al. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for Hsp90alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 6: 507–514.
27. Stellas D, Kazanietz A, Patsavoudi E (2007) Monoclonal antibody 4C3 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 13: 1031–1039.
28. Sidra K, Gazanou M, Stellas D, Maiti D, Patsavoudi E (2008) A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem* 283: 2031–2041.
29. Stellas D, El Hamidieh A, Patsavoudi E (2010) Monoclonal antibody 4C3 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biol* 11: 54.
30. Tsubota S, Neckers L (2007) Extracellular heat shock protein 90: a tale for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* 98: 4336–4339.
31. Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3: 1096–1100.
32. Sims JD, McGready J, Jay DG (2010) Extracellular heat shock protein (Hsp70) and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 5: e10040.
33. Walsh N, Larkin A, Swan N, Goulton K, Dowling P, et al. (2011) RNAi knockdown of Hsp (Hsp70/Hsp90 organizing protein) decrease invasion via MMP-2 down-regulation. *Cancer Lett* 306: 100–109.
34. Thomsidou D, Patsavoudi E (1993) Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C3. *Neuroscience* 53: 813–827.
35. Patsavoudi E, Hurl C, Matus R (1991) Purification and characterization of neuron-specific surface antigen defined by monoclonal antibody BM00. *J Neurochem* 56: 782–788.
36. Menzies S, Thomsidou D, Jones RB, Mirsky R, Matus R (2001) The neurotrophin signal beta-neurotrophin promotes Schwann cell motility via the MAPK pathway. *Glia* 34: 39–51.
37. Vaughan CK, Gohille U, Schott E, Good VM, Al MM, et al. (2006) Structure of an Hsp90-Cdc37-Gsk3 complex. *Mol Cell* 23: 697–707.
38. Cheng CP, Salm D, Tsien P, Zhao Z, Fan J, et al. (2011) A fragment of secreted Hsp90alpha carries properties that enable it to accelerate effectively both acute and diabetic wound healing in mice. *J Clin Invest* 121: 4346–4361.

# The 4C5 Cell-Impermeable Anti-HSP90 Antibody with Anti-Cancer Activity, Is Composed of a Single Light Chain Dimer

Katerina Sidera<sup>1</sup>, Avraam El Hamidieh<sup>1</sup>, Avgi Mamelaki<sup>1</sup>, Evangelia Patsavoudi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, <sup>2</sup>Department of Medical Instruments Technology, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

## Abstract

MAb 4C5 is a cell impermeable, anti-HSP90 murine monoclonal antibody, originally produced using hybridoma technology. We have previously shown that mAb 4C5 specifically recognizes both the  $\alpha$ - and to a lesser extent the  $\beta$ -isoform of HSP90. Additionally, *in vitro* and *in vivo* studies revealed that by selectively inhibiting the function of cell-surface HSP90, mAb 4C5 significantly impairs cancer cell invasion and metastasis. Here we describe the reconstitution of mAb 4C5 into a mouse-human chimera. More importantly we report that mAb 4C5 and consequently its chimeric counterpart are completely devoid of heavy chain and consist only of a functional kappa light chain dimer. The chimeric antibody is shown to retain the original antibody's specificity and functional properties. Thus it is capable of inhibiting the function of surface HSP90, leading to reduced cancer cell invasion *in vitro*. Finally, we present *in vivo* evidence showing that the chimeric 4C5 significantly inhibits the metastatic deposit formation of MDA-MB-453 cells into the lungs of SCID mice. These data suggest that a chimeric kappa light chain antibody could be potentially used as an anti-cancer agent, thereby introducing a novel type of antibody fragment, with reduced possible adverse immunogenic effects, into cancer therapeutics.

**Citation:** Sidera K, El Hamidieh A, Mamelaki A, Patsavoudi E (2011) The 4C5 Cell-Impermeable Anti-HSP90 Antibody with Anti-Cancer Activity, Is Composed of a Single Light Chain Dimer. PLoS ONE 6(9): e23906. doi:10.1371/journal.pone.0023906

**Editor:** Paul C. Driscoll, MRC National Institute for Medical Research, United Kingdom

**Received:** May 11, 2011; **Accepted:** July 28, 2011; **Published:** September 1, 2011

**Copyright:** © 2011 Sidera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: epatsavou@pasteur.gr

## Introduction

Heat shock protein 90 (HSP90) is considered a very attractive drug-target for cancer therapy, since most of its client proteins play key roles in the acquisition and/or maintenance of the malignant phenotype [1–4]. Recently, we and others have identified a pool of HSP90 at the cell surface [5–8], where it was shown to participate in cancer cell invasion and metastasis [9–11]. Increasing evidence continues to reinforce the notion of a wide-ranging phenomenon of extracellular HSP90 chaperoning, implicated in cancer progression and metastatic spread [12–16] thus supporting the development of inhibitors that specifically target the cell surface HSP90. MAb 4C5 is a cell-impermeable murine monoclonal antibody produced using hybridoma technology [17], that specifically recognizes both the  $\alpha$  and to a lesser extent the  $\beta$  isoform of HSP90 [8]. MAb 4C5 was initially shown to inhibit cell migration processes *in vitro* during development of the nervous system [18,19] by affecting actin cytoskeletal re-arrangement and formation of motile structures such as lamellipodia [8,20]. Subsequently evidence was presented showing that by binding selectively to the surface pool of HSP90, mAb 4C5 significantly reduces melanoma cell invasion and metastasis [11]. Furthermore mAb 4C5 was shown to inhibit the extracellular interaction between HSP90 and the growth factor receptor ErbB-2 in MDA-MB-453 breast cancer cells, leading to impaired downstream signalling and reduced cancer cell motility and invasion [21]. Finally, mAb 4C5 was

shown to inhibit a functional interaction between secreted HSP90 and the inactive forms of metalloproteinases 2 and 9, necessary for the enzymes' activation which is essential for cancer cell invasion and extravasation [14]. These combined data suggested that the unique capacity of mAb 4C5 to specifically inhibit the extracellular pool of HSP90 without affecting the wide range of important intracellular roles of this chaperone could have clinical benefits in the treatment of human malignancies. However, murine mAbs do not constitute ideal therapeutic agents, since their potential immunogenicity represents a limitation to their clinical use. The application of mouse mAbs to human therapy has become feasible by the advent of recombinant DNA technologies which has led to the development of chimeric and humanized antibodies which exhibit reduced immunogenicity [22] without a significant loss in the affinity, especially in the case of chimeric antibodies [23,24].

In the current work we describe the cloning and sequencing of the mAb 4C5 genes from the originating hybridoma cell line and the successful construction of a functional mouse-human chimera, which is shown to retain the properties of the parental antibody. More importantly we report that mAb 4C5 is completely devoid of heavy (H)-chain and consists of only a functional immunoglobulin kappa light chain dimer and its properties can be recapitulated in a recombinant protein containing only this light (L)-chain polypeptide. Finally, we demonstrate the potential therapeutic efficacy of this novel type of antibody fragment.

## Results

### MAb 4C5 is an antibody fragment completely devoid of a heavy chain

The electrophoretic motility of mAb 4C5 studied under reducing and non-reducing SDS-PAGE revealed that it is not a conventional IgG molecule. More specifically, when purified mAb 4C5 was subjected to reducing SDS-PAGE, followed by immunoblotting with an anti-Fab, we did not observe the typical 25 kDa and 50 kDa bands corresponding to the L- and H-chain, respectively of a conventional IgG antibody, but instead a single band at approximately 25 kDa (Fig. 1A). Interestingly an identical 25 kDa band was obtained after immunoblotting with an anti-kappa L-chain antibody (Fig. 1A). Accordingly, after non-reducing electrophoresis immunoblotting with both of these standard-antibodies, shows mAb 4C5 to be significantly smaller than a conventional IgG1 molecule since it migrated at approximately 50 kDa (Fig. 1A). Finally, no immunoreactivity was detected after electrophoresis of mAb 4C5 under both reducing and non-reducing conditions, followed by immunoblotting using an anti-Fc $\gamma$  (Fig. 1A). These combined data indicated that mAb 4C5 may either lack a part of its H-chain, or that it is completely devoid of H-chain. In order to further explore these possibilities we next performed northern blot analysis using an IgG1 H-chain probe. RNA derived from hybridoma cells that produce an intact IgG1 immunoglobulin named 2D10 served as positive control. In contrast to the positive control, no radioactivity was detected after hybridization of the RNAs derived from the mAb 4C5 hybridoma and NSO myeloma cells (negative control) (Fig. 1B), indicating that mAb 4C5 may completely lack a H-chain gene. This was further confirmed by H-chain PCR amplification experiments. For the amplification of the H-chain cDNA of mAb 4C5, a panel of eight mouse universal primers and a polyA+ primer respectively directed against the 5' and the 3' ends of the mRNA, were tested in several separate PCR reactions. In all conditions tested no amplification of a specific H-chain product was observed (data not shown). These combined data suggested that mAb 4C5 is devoid of H-chain and we therefore proceeded to the recombinant expression of the antibody L-chain alone in order to explore its properties.

### Construction of the chimeric L-chain antibody

The initial amplification of the mAb 4C5 kappa chain gene from the first strand cDNA template was performed using universal mouse L-chain primers according to Barbas [25]. The PCR product corresponding to the full length mAb 4C5 L-chain, was then subcloned into the pComb3H vector. Sequence analysis of recombinant L-chain (rec-4C5) revealed that it belongs to the kappa chain subgroup I [26] (Fig. 2).

Chimeric L-chain antibody (ch-4C5) was constructed by replacing the mouse LCK coding region with the corresponding human LCK insert. The sequence analysis of several recombinant clones confirmed the successful construction of the chimeric mouse-human antibody.

Both rec-4C5 and ch-4C5 were expressed in the bacterial periplasmic space and purified as described in Materials and Methods. The electrophoretic motilities of the purified antibodies were tested under reducing and non-reducing conditions and were found to be similar to the corresponding motility of the original mAb 4C5 antibody (Fig. 3A).

### ch-4C5 specifically recognizes HSP90

In order to explore the specificity of the antibodies, western blot analysis was performed in MDA-MB-453 breast cancer cell lysates using a commercial polyclonal anti-HSP90 $\alpha$  antibody (Chemicon

International, USA), mAb 4C5, rec-4C5 and ch-4C5. In all cases a single identical immunoreactive band was observed (Fig. 3B), confirming that both rec-4C5 and ch-4C5 retain the specificity of the paternal mAb 4C5. This result was further confirmed by immunoprecipitation experiments performed in pre-cleared MDA-MB-453 cell lysates using anti-HSP90 $\alpha$ , followed by immunoblotting with mAb 4C5, rec-4C5 or ch-4C5. In all cases, a single immunoreactive band was observed, indicating that the chimeric L-chain specifically recognize HSP90 (Fig. 3C). The same result was obtained when immunoprecipitation was performed using mAb 4C5, rec-4C5 and ch-4C5 followed by western blot with the anti-HSP90 $\alpha$  antibody (Fig. 3D). In all experiments an irrelevant mouse IgG was used as negative control.

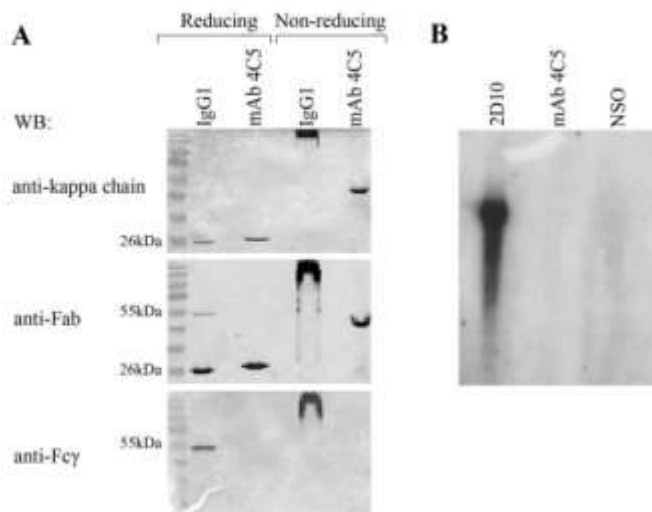
### ch-4C5 is cell-impermeable and does not affect the function of intracellular HSP90

In order to investigate whether ch-4C5 binds to surface HSP90, unfixed MDA-MB-453 cells were incubated with either rec-4C5 or ch-4C5 while in culture. Thus, the antibodies had access only to the external surface of the cells. Following incubation, cells were processed for indirect immunofluorescence using a fluorescently-labelled secondary antibody. The observed typical punctuate immunostaining confirmed the cell surface labeling (Fig. 4A). Similar results were obtained when using anti-HSP90 $\alpha$  and mAb 4C5 (Fig. 4A). It is noteworthy that similarly to mAb 4C5, ch-4C5 as well as rec-4C5 also recognize the intracellular pool of HSP90 as demonstrated by immunofluorescence after fixation and permeabilization of MDA-MB-453 cells (Fig. 4B). Finally, the binding of antibodies to live MDA-MB-453 cells was monitored at various time intervals. As shown in Fig. 4C, similarly to mAb 4C5, rec-4C5 and ch-4C5 were not internalized and remained bound on the cell surface for up to 24 h in culture.

The significance of ch-4C5 cell-impermeability was investigated by monitoring the levels of a subset of intracellular HSP90 client proteins. To date more than 100 intracellular HSP90 client proteins have been identified. Cell-permeable HSP90 inhibitors induce the degradation of these proteins because their stability depends on intracellular HSP90 function [3]. Since our data suggested that mAb 4C5 and subsequently rec-4C5 and ch-4C5 are cell impermeable, we examined their ability to impact the stability of three well-characterized HSP90 client proteins, Akt, cRaf and ErbB-2. Following incubation of MDA-MB-453 cells with different concentrations of mAb 4C5, rec-4C5 and ch-4C5, the levels of Akt, cRaf and ErbB2 were monitored by western blotting. As shown in Figure 4D these antibodies did not affect the steady-state levels of any of the kinases studied. In contrast when the cells were incubated with the cell permeable anti-HSP90 $\alpha$ , expression levels of these kinases were significantly reduced (Fig. 4D).

### ch-4C5 inhibits cancer cell invasion

Previous studies have shown that mAb 4C5 inhibits MDA-MB-453 breast cancer and B16 F10 melanoma cell invasion in a wound healing assay [11,21]. In order to confirm that ch-4C5 exhibits the same functional property, we performed *in vitro* wound healing assays using MDA-MB-453 and B16 F10 cancer cells. Control cultures were grown either in culture medium alone, or in culture medium containing 200  $\mu$ g/ml of the irrelevant BM88 antibody. No statistically significant difference was observed between the two types of controls used. The mean value of the two types of control was considered as 100% of wound closure. As shown in Fig. 5A,B the presence of ch-4C5 in the culture medium significantly reduced the extend of MDA-MB-453 cancer cell invasion within the migration gap after 24 h, as compared to control cultures. More specifically, the presence of ch-4C5 resulted in a 46% inhibition of



**Figure 1. mAb 4C5 is a kappa L-chain dimer.** **A.** Electrophoretic analysis of mAb 4C5, followed by immunoblotting with an anti-mouse kappa chain, an anti-mouse Fab and an anti-Fc $\gamma$  antibody. Intact IgG1 immunoglobulin produced by the 2D10 hybridoma cells serves as positive control. Under reducing electrophoresis followed by western blot with the anti-Fab antibody, a single 25 kDa-immunoreactive band is observed, instead of the 25- and 50-kDa bands corresponding to the L- and H-chain, respectively, of an intact IgG1. This 25 kDa band is identical to the band corresponding to the kappa L-chain as shown by western blot with the anti-mouse kappa chain antibody. Under non-reducing electrophoresis followed by western blot with both the anti-kappa and the anti-Fab antibodies, mAb 4C5 is shown to migrate at approximately 50 kDa, and not at 150 kDa as expected for an intact IgG1 molecule. No mAb 4C5 immunoreactivity is detected after electrophoresis under both reducing and non-reducing conditions followed by western blot with an anti-Fc $\gamma$  antibody. In the case of the IgG1 immunoglobulin under the same conditions a 50 kDa and a 150 kDa band is observed, respectively. **B.** No radioactivity is detected after northern blot analysis of 4C5 hybridoma-derived RNA with a H-chain radiolabelled probe. RNA derived from the IgG1-producing 2D10 hybridoma cells and the NSO myeloma cells served as positive and negative control, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0023906.g001

wound closure, which was similar to that obtained when the anti-HSP90 $\alpha$ , as well as mAb 4C5 and rec-4C5 were included in the culture medium (Fig. 5A,B). The bars in Fig. 5B represent the average of three independent experiments  $\pm$  SEM. Within a single experiment, each condition was tested in triplicate. Similar results were obtained using B16 F10 melanoma cells and increasing concentrations of ch-4C5 which yielded a dose dependent inhibition of cell invasion (Fig. 5C,D). It is important to note that in the wound healing assay the effect of ch-4C5 is directed towards cell invasion and not cell proliferation as judged by an independent MTT assay (data not shown). This is in accordance with previously published data demonstrating that the presence of mAb 4C5 in the culture medium of B16 F10 [11] and MDA-MB-453 [21], does not affect cell proliferation, since low BrdU incorporation was observed with no apparent differences in the absence or presence of the antibody.

At this point it should be noted that the inhibitory effect of the anti-HSP90 $\alpha$  antibody on the MDA-MB-453 invasion rate was in great part due to increased cell death as judged by trypan blue staining, which selectively colours dead cells (Fig. 5E). In contrast, when cultures were treated with mAb 4C5 and ch-4C5, the incidence of cell death was similar to that observed in the control cultures (Fig. 5E). This result further supports that ch-4C5, in contrast to the cell-permeable anti-HSP90 $\alpha$  antibody, is cell-impermeable and does not affect the intracellular pool of HSP90, which is important for cell survival.

Finally these cultures were examined with respect to actin re-arrangement dynamics using fluorescently labelled phalloidin. MDA-MB-453 cells exposed to ch-4C5 were less spread compared to cells in control cultures, and their morphology was indicative of

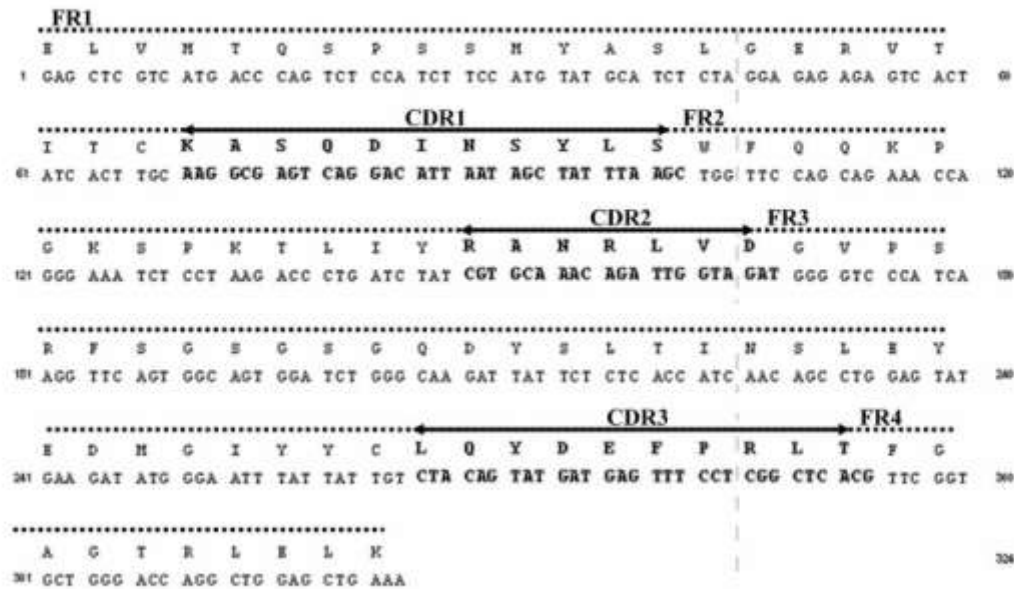
non-motile cells. Furthermore, when visualized at a higher magnification, the lamellipodia in treated cultures were less developed and less spread out compared to lamellipodia in control cultures (Fig. 5 F,G). These results are in accordance with previously published data regarding the effect of mAb 4C5 on actin re-arrangement and lamellipodia development [21].

#### ch-4C5 reduces the MDA-MB-453 metastatic deposition into the lungs of SCID mice

We next sought to investigate the *in vivo* effect of ch-4C5 on the metastatic behaviour of MDA-MB-453 cancer cells. For this purpose, MDA-MB-453 cells were pre-treated or not with 200  $\mu$ g/ml ch-4C5 and then labelled with the fluorescent dye DiO and injected intravenously into SCID mice via the tail vein. Twelve hours after the injection, mice were euthanized and the metastatic deposits of MDA-MB-453 cells were traced and evaluated in the lungs of both the control and the ch-4C5-treated groups. As shown in Fig. 6A, a significant decrease in the deposition of MDA-MB-453 cells was detected in the ch-4C5 treated mice as compared to the control animals. More specifically, quantification of the metastatic deposit formation showed a 38% inhibition in the ch-4C5 treated mice when compared to control mice (Fig. 6B).

#### Discussion

In this study, we describe the cloning and sequencing of an anti-HSP90 murine monoclonal antibody, named mAb 4C5. More importantly, we demonstrate that mAb 4C5 is not a conventional



**Figure 2. Nucleotide and amino acid sequences of mAb 4C5.** Nucleotide and amino acid sequences of the L-chain variable region of mAb 4C5. doi:10.1371/journal.pone.0023906.g002

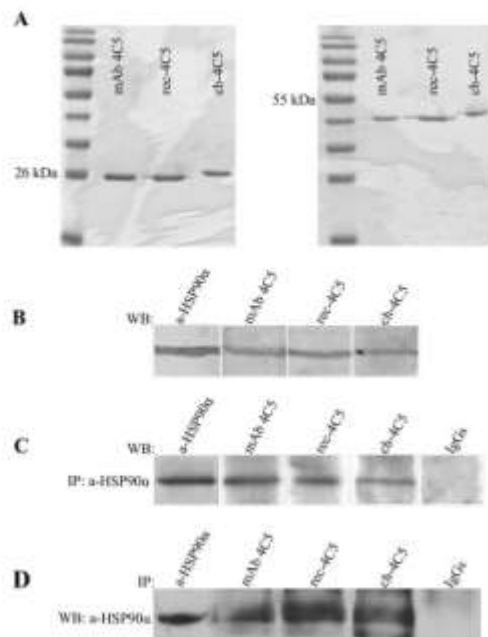
IgG molecule, but instead it is completely devoid of a H-chain and only consists of a kappa light chain dimer. This finding was initially supported by SDS-PAGE electrophoresis under denaturing and non-denaturing conditions, demonstrating that mAb 4C5 migrates unconventionally at approximately 26- and 50-kDa, respectively. Additionally, when total RNA isolated from the mAb 4C5-producing hybridoma cell line was subjected to northern blot hybridization using an IgG1 H-chain cDNA radio-labeled probe, no radioactivity could be detected. In agreement with the above results, when we attempted to amplify the H-chain cDNA using universal mouse H-chain primers we could not isolate a H-chain product in all conditions tested. Finally, the unusual nature of mAb 4C5 was confirmed beyond any doubt, since the recombinant kappa L-chain expressed in bacteria was shown to retain all the properties of the paternal antibody, including antigen binding and *in situ* inhibition of cancer cell invasion.

This monoclonal antibody was originally produced by immunization of mice with a brain-derived membrane fraction of 15 day-old rat embryos [17], and it was shown to specifically recognize and inhibit the function of surface HSP90 during cell migration processes [8]. Additionally, mAb 4C5 was shown to significantly reduce the rate of invasion and metastasis of cancer cells. More specifically, it was demonstrated that this antibody inhibits melanoma cell invasion and metastasis [11] as well as the interaction of surface HSP90 with the extracellular domain of ErbB-2, leading to impaired downstream signalling and subsequently reduced rate of *in situ* breast cancer cell invasion [21]. Even more recently, Stellas et al. [14] provided *in situ* and *in vivo* evidence showing that mAb 4C5 indirectly inhibits the activation of pro-gelatinases MMP-2 and MMP-9, necessary for cancer cell invasion, extravasation and metastasis. These combined data further supported the idea that mAb 4C5 could be useful as a

cancer therapeutic and oriented our studies towards the determination of the amino acid sequence and recombinant expression of this antibody.

It is well known that murine antibodies have limited use for *in vivo* therapy in humans because of their immunogenicity. In multiple instances this problem has been overcome using genetic engineering approaches to produce chimeric mouse-human and fully humanized antibodies. Taking into consideration the unconventional nature of mAb 4C5 in combination with the fact that during the humanization process the antibody affinity is frequently reduced, we next reconstituted the murine mAb 4C5 into a functional mouse-human chimeric version that, like the paternal antibody, binds to surface HSP90, is cell impermeable and inhibits cancer cell invasion. The chimeric antibody which was engineered by replacing the Cκ-region of the paternal murine antibody with the corresponding human Cκ-region was shown to retain the specificity and affinity of the paternal mouse antibody.

It has been a generally accepted concept that the antibody molecule requires both the H- and L-chains for its full activity [27]. Moreover, the H-chain is believed to be the predominant contributor to the free energy of antigen binding while the contribution of the L-chain is supposed to be limited [28,29]. The latter idea is further supported by the fact that cameloids possess a class of fully functional antibodies completely lacking L-chains and consisting of H-chain dimers [30,31]. In context to these findings, H-chains alone were shown to interact with a variety of antigens in a specific manner (albeit with lower affinity than the intact antibodies), which has led to the application of single domain antibodies derived from the H-chains [32] in research, biotechnology as well as human therapeutics. In the past, there have been sporadic reports of antigen binding by L-chains. The first examples of free immunoglobulin light chains concerned the



**Figure 3. Electrophoretic mobility and specificity of antibodies.**  
**A.** Left panel: SDS-PAGE of purified antibodies under reducing conditions followed by Coomassie Brilliant Blue-R staining revealed in all cases an approximately 25 kDa band corresponding to the L-chain. Right panel: Under non-reducing conditions the antibodies are shown to migrate as a L-chain dimer. **B.** Western blot of MDA-MB-453 cell lysates using mAb-4C5, rec-4C5, ch-4C5 and a commercial anti-HSP90 $\alpha$  antibody, serving as positive control. In all cases a single 90 kDa immunoreactive band corresponding to HSP90 is observed. **C.** Immunoprecipitation in MDA-MB-453 cell lysates with anti-HSP90 $\alpha$ , followed by immunoblotting with either the murine or the recombinant antibodies. In all cases a single immunoreactive band is observed. **D.** Reverse immunoprecipitation experiments in MDA-MB-453 cell lysates using mAb-4C5, rec-4C5 and ch-4C5, followed by western blot with anti-HSP90 $\alpha$ . In all cases a single immunoreactive band is observed indicating that both recombinant antibodies recognize HSP90.  
doi:10.1371/journal.pone.0023906.g003

so called Bence-Jones proteins. These were reported as L-chain dimers expressed by multiple myeloma cells, collected from the urine of human patients [33]. Furthermore, large amounts of L-chains were found to accumulate in the extracellular fluids and tissues of patients with L-chain secreting tumors [34]. A kappa light chain dimer with CD4 antigen specificity derived from a hybridoma cell line was described in 1987 by Ledbetter et al. [35] and in 1994 Mei Sun et al [36] reported that a purified L-chain from a monoclonal antibody against vasoactive intestinal polypeptide (VIP) displayed sequence-specific and high affinity binding to VIP. Accordingly, Nishimura et al. [37] reported the production of a recombinant  $\lambda$  light chain exhibiting a significantly higher activity of binding to the antigen compared with the intact antibody. Furthermore, these authors presented evidence that this recombinant light chain could serve as a potentially useful vehicle for clinical use such as radio-immunoimaging and radio-immunotherapy of lung cancers. It has been

also reported that antibody L-chain dimers produced by a mouse hybridoma react with human melanoma tissues [38]. In 1998 Pereira et al. [39] showed that a single L-chain variable sequence contains all the determinants necessary for cardiolipin binding, with an affinity similar to that of the intact antibody. More recently, Dubnovitsky et al. [40] reported that the recombinant V<sub>L</sub>-domain of a monoclonal antibody against ferritin preserved its antigen binding function with an affinity comparable to that of the full-length parental antibody.

In the present work we have demonstrated that ch-4C5 is completely devoid of a heavy chain and consists of a L-chain dimer. ch-4C5 has a high specific activity as demonstrated by immunoblotting and immunofluorescence experiments using breast cancer cells. Furthermore, and similarly to the paternal antibody ch-4C5 exhibits function-blocking properties as judged by the *in vivo* wound healing assay. Finally, using an *in vivo* assay we have demonstrated that ch-4C5 reduces the metastatic deposition of MDA-MB-453 breast cancer cells into the lungs of SCID mice.

These results provide a new perspective for the clinical application of L-chain antibodies in cancer therapeutics. Recombinant L-chain antibodies have a number of advantages over intact antibodies and V<sub>H</sub> antibodies when intended for human therapeutics, i.e. relatively facile and reproducible production, quality control procedures, and faster clearance from the circulation. Finally from a clinical point of view, surface HSP90 provides a novel and very promising extracellular drug target for the effective treatment of metastatic cancer. In this context, the ability of ch-4C5 to selectively inhibit the function of the surface pool of HSP90, as indicated by the *in vitro* and *in vivo* data presented in the current work, without interfering with HSP90 intracellular function, renders this antibody fragment a potential cancer therapeutic.

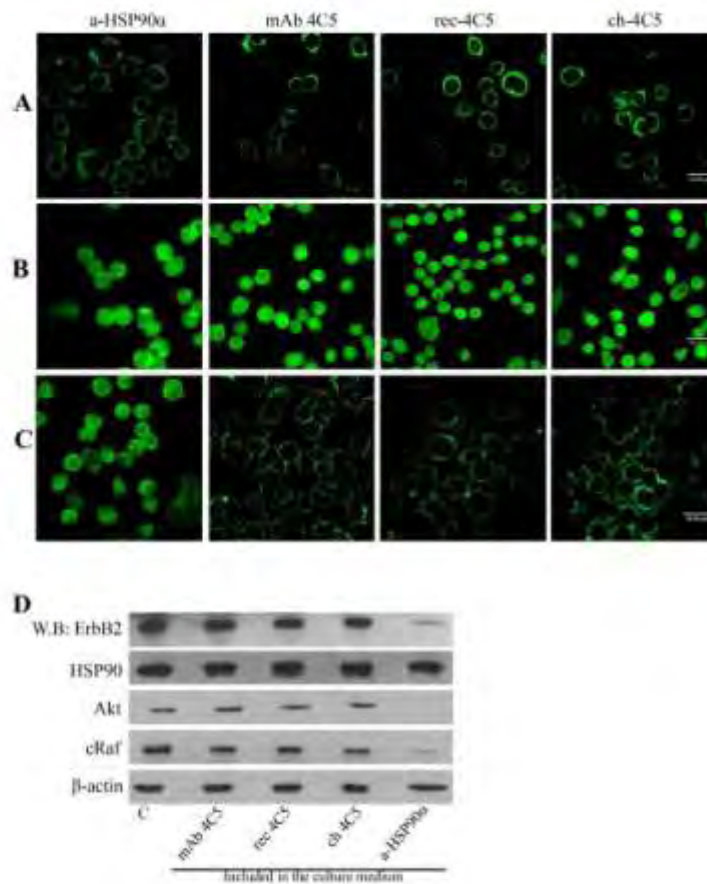
## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal studies were conducted according to the national and international guidelines and were specifically approved by the Ethical Committee of the Hellenic Pasteur Institute (Permit No: K/533, Veterinary Directorate District of Attiki). SCID mice were originally purchased from Jackson Laboratory, bred and maintained under specific pathogen free conditions at the Experimental Animal Unit of the Hellenic Pasteur Institute. All of the experiments with animals were performed in accordance with the guidelines approved by the Ethical Committee of the Hellenic Pasteur Institute.

### RNA and DNA manipulations

Total RNA was isolated from  $10^7$  hybridoma cells [17], using the 'Absolutely RNA Mini Prep kit' (Stratagene). For Northern blot analysis, 25  $\mu$ g RNA was separated by agarose electrophoresis, transferred to Zeta-Probe (Biorad) and hybridized with a 1.2-kb H-chain IgG1  $\alpha$  cDNA probe as previously described [41]. For amplification of the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> antibody fragments, specific first strand cDNAs were synthesized using the '1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR' (Roche), according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were subsequently amplified by PCR, using specific mouse immunoglobulin primers [25]. The amplified L-chain cDNA fragment was inserted into the SacI/XbaI restriction sites of the pComb3H phagemid (generous gift of Dr. C. F. Barbas and D. R. Burton, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) [25] and sequenced in both directions at the sequence facility of the Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB). The germline counterpart of the rear-



**Figure 4. ch-4C5 binds to the surface pool of HSP90 and is not internalized by MDA-MB-453 cells.** **A.** Immunofluorescence labelling of MDA-MB-453 cells using both the rec-4C5 and ch-4C5. The punctuate immunolabeling indicates the surface pool of HSP90. Negative controls were performed using an antibody against the intracellular protein  $\beta$  tubulin (data not shown). Scale bar: 20  $\mu$ m. **B.** Immunofluorescence detection of intracellular HSP90 in fixed MDA-MB-453 cells, permeabilized with 0.1% Triton X-100. Similarly to the murine antibody, rec-4C5 and ch-4C5 recognize the intracellular pool of HSP90. Scale bar: 20  $\mu$ m. **C.** For detection of antibody internalization, live cells were incubated with the antibodies for various time intervals, then fixed, permeabilized and fluorescently labelled. No internalization of mAb4C5, rec-4C5 and ch-4C5 is observed even after 24 h of incubation. In contrast the anti-HSP90 $\alpha$  antibody could be detected intracellularly after 24 h of incubation. Scale bar: 20  $\mu$ m. **D.** MDA-MB-453 cell lysates, treated with mAb 4C5, rec-4C5, ch-4C5 and anti-HSP90 $\alpha$  were analyzed by western blot using antibodies against ErbB2, Akt, cRaf and HSP90 $\alpha$ . Actin served as a loading control. Presence of mAb 4C5, rec-4C5 and ch-4C5 did not affect the levels of the kinases compared to controls. In contrast the cell permeable anti-HSP90 $\alpha$  antibody significantly reduced the levels of ErbB2, Akt and cRaf. doi:10.1371/journal.pone.023906.g004

ranged V<sub>L</sub> sequence was analyzed using the National Center for Biotechnology Information IgBLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) and sequence was aligned using ClustalW software.

#### Construction of mouse-human ch-4C5

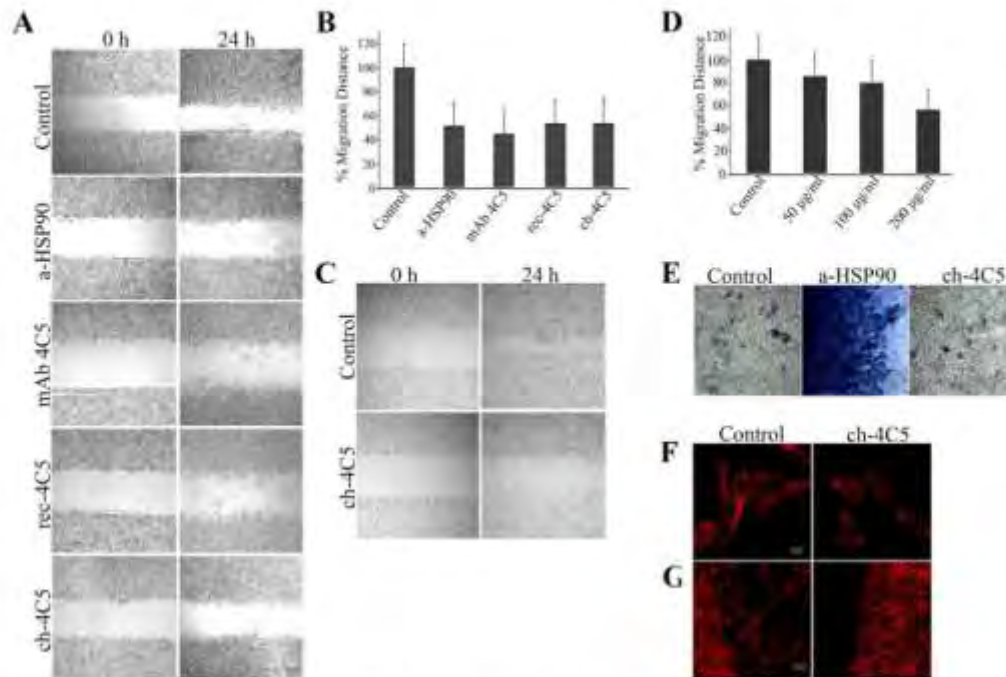
The mouse-human chimeric antibody was constructed by fusing the mAb 4C5 V<sub>L</sub> cDNA to a human C<sub>k</sub> gene segment. Briefly, the kappa light chain of mAb 4C5 was subcloned into pBluescript SK- $\lambda$  plasmid, and then the BglI/XbaI fragment containing the mouse C<sub>k</sub> region was replaced by the BglI/XbaI restriction fragment

containing the human C<sub>k</sub>. Finally, the chimeric kappa L-chain gene was inserted into the SacI/XbaI sites of pComb3H. All DNA manipulations were performed according to Sambrook [42].

#### Expression, purification and electrophoretic analysis of recombinant L-chains

Soluble recombinant antibody L-chains were produced from individual bacterial colonies as described previously [25] and the periplasmic fractions were extracted according to Charlton [43] and purified by affinity chromatography using a KappaSelect column (GE Healthcare) on an FPLC AKTA system (Amersham





**Figure 5. ch-4C5 inhibits cancer cell invasion in vitro.** **A.** Wound healing assay. Photographs represent phase-contrast images obtained at zero time (left panel) and at 24 h (right panel) after scratch formation, showing MDA-MB-453 cell migration either in control cultures or cultures including anti-HSP90s, mAb 4C5, rec-4C5 or ch-4C5. Scale bar: 200  $\mu$ m. **B.** Quantitative effect of antibodies on the closure of the wound. Addition of 200  $\mu$ g/ml of anti-HSP90s and mAb 4C5 in the culture medium resulted in a 48% and 55% reduction of wound closure, respectively when compared to control cultures that were considered as resulting in 100% wound closure. Addition of 200  $\mu$ g/ml rec-4C5 and ch-4C5 in the culture medium resulted in a 46% and 46% inhibition of wound closure, respectively. Statistical significance of differences was assessed by Student's t test. The presence of anti-HSP90s, mAb 4C5, rec-4C5 or ch-4C5 had a statistically significant effect on the wound closure ( $p < 0.01$  in each case). **C.** Phase-contrast images obtained at zero time (left panel) and at 24 h after scratch formation (right panel), showing B16 F10 melanoma cell invasion in a wound healing assay in the presence of 200  $\mu$ g/ml of ch-4C5. Scale bar: 200  $\mu$ m. **D.** Quantitative effect of increasing concentrations of ch-4C5 on the invasion level of B16 F10 melanoma cells. Presence of 50  $\mu$ g/ml ch-4C5 resulted in 15% inhibition of invasion, while addition of 100  $\mu$ g/ml and 200  $\mu$ g/ml ch-4C5 resulted in 21% and 43% inhibition of migration, respectively when compared to control cultures that were considered as resulting in 100% wound closure. **E.** Visualization of dead cells using trypan blue dye. In ch-4C5 treated cultures, the cell death incidence is similar to that observed in the control cultures. In contrast, in the cultures treated with the anti-HSP90s antibody, a much greater number of cells are stained with Trypan blue, indicating an increased incidence of cell death. Scale bar, 30  $\mu$ m. **F.** Control and ch-4C5 treated cells were fixed permeabilized and stained with fluorescently labelled phalloidin. Scale bar 40  $\mu$ m. **G.** Higher magnification showing phalloidin staining (F-actin). Ch-4C5 effectively blocks spreading of lamellipodia. Scale bar: 16  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0023906.g005

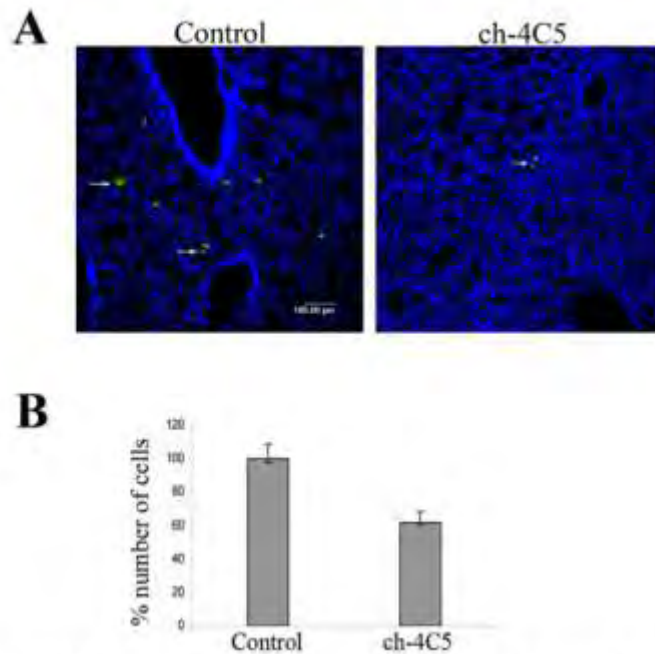
Biosciences; Piscataway, NJ), according to the manufacturer's instructions. The electrophoretic mobilities of antibodies were analyzed under reducing and non-reducing conditions and visualized either with Coomassie Brilliant Blue-R stain or by immunoblot using specific secondary HRP-conjugated antibodies.

#### Preparation of cell lysates, immunoprecipitation and western blot analysis

MDA-MB-453 cell lysates were obtained, quantified and processed for immunoprecipitation as previously described [21]. Bound proteins were analyzed by gel electrophoresis followed by western blot and antibody complexes were detected using DAB (Sigma) or/and an ECL chemiluminescence reagent (Amersham), as described by the manufacturers. For all immunoprecipitation experiments, negative controls were performed using irrelevant IgGs.

#### Cell cultures and immunofluorescence

MDA-MB-453 breast cancer (ATCC Cell Biology Collection) and B16 F10 melanoma (ATCC Cell Biology Collection) cell lines were maintained in RPMI and DMEM, respectively supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). For immunofluorescence studies, MDA-MB-453 cells were plated on poly-L-lysine coated coverslips at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in 48-well plates, fixed and processed as previously described [17]. Live MDA-MB-453 cells were labelled by indirect immunofluorescence as previously reported [8]. Alexa546-labelled phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) was used to visualize F-actin. For all experiments, controls were performed by omitting the primary antibodies or by using an IgG2a mAb against the unrelated neuronal protein BM22 [44]. Immunofluorescence was analyzed by confocal microscopy using a Leica TSC confocal microscope.



**Figure 6. ch-4C5 inhibits the metastatic deposition of MDA-MB-453 cancer cells into the lungs of SCID mice.** Control or ch-4C5 treated MDA-MB-453 cells were labeled with the fluorescent dye DIO and injected into SCID mice as described in Materials and Methods. Evaluation of metastatic deposits was performed several hours later. **A**, Representative cryosections of the lungs of control and ch-4C5 treated mice. The arrows show MDA-MB-453 cells stained with DIO present in the lung tissue. A significant decrease in the deposition of cancer cells was observed in the lungs of ch-4C5 treated mice. Scale bar: 100  $\mu$ m. **B**, Quantitative effect of ch-4C5 on the metastatic deposition of MDA-MB-453 cells into the lungs, showed a 38% inhibition when compared to control animals. The bars represent the average of two independent experiments  $\pm$ SEM. Statistical significance of differences was tested by Student's t test ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pone.0023906.g006

For the antibody internalization assay, MDA-MB-453 cells were incubated with the antibodies while in culture for various time intervals. The cells were then washed and fixed. For detection of possible internalization of the antibody, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and subsequently incubated with Alexa488-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR). For all experiments, controls were performed as described above.

#### Wound healing assay

The assay was performed as previously described [21]. Briefly, MDA-MB-453 and B16 F10 cells were plated in 48-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  and  $2.5 \times 10^5$  cells/well, respectively. After 24 h the medium was changed to serum free and 16 h later a cell free area was generated by scratching the cell monolayer with a sterile yellow pipette tip, thus resulting in the formation of an approximately 1 mm-wide cell-free area. Immediately after scratching, the medium was replaced with fresh, containing anti-HSP90 $\alpha$ , mAb 4C5, rec-4C5 or ch-4C5. All agents were maintained in the culture for the duration of the assay. Control cultures were grown either in culture medium alone or in culture medium containing the BM88 antibody. Migration of cancer cells within the gap was monitored microscopically at given time intervals, using a Leica DM IL inverted microscope, equipped

with a LEICA DM300 video camera. Migration distance was estimated by acquiring and analyzing digital images, using Image Pro Plus analysis software. Wound closure in the control cultures was considered as 100% and wound closure in the antibody treated cultures was estimated proportionally compared to the control cultures. Statistical analysis was performed using Student's t-test.

#### Trypan blue staining

At the end point of the wound-healing assay, MDA-MB-453 cells were incubated for 5 min with 0.4% trypan blue in PBS, washed and visualized using a Leica microscope.

#### MDA-MB-453 cell metastatic deposit formation in the lung

The *in vivo* metastatic deposit formation assay was performed as previously described [14,45]. Briefly, MDA-MB-453 cells were pre-incubated with either 200  $\mu$ g/ml ch-4C5 or the unrelated BM88 antibody for 2 hours, washed and incubated with DIO for an additional 1 hour. Cells were then washed again, trypsinized and counted. Twenty 8 10-week-old female SCID mice were divided into two equal groups: the control group injected with non-treated cells or BM88-treated cells and the ch-4C5 treated group. The animals were euthanized 12 hours later and their lungs

were completely washed from the remaining blood, by pumping 200 ml of saline buffer with the use of a peristaltic pump connected to the left ventricle of the heart. This procedure ensures that all cancer cells which are not attached, either on the inner surface of the blood vessels or on the lung tissue, are removed. Finally the lungs were perfused with 4% formalin solution and then embedded in OCT solution and processed for sectioning. Each cryosection was counter stained with TOPRO-3 and visualised using a confocal microscope. The same experiment

was performed twice with similar results. Statistical analysis was performed using the Student's t-test.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KS AM EP. Performed the experiments: KS AEH. Analyzed the data: KS AEH AM EP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AM EP. Wrote the paper: KS EP.

### References

1. Bagstall B, Whitesell L (2008) Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Mol Cancer Ther* 7: 1021–1030.
2. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciccosi DR (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31: 164–172.
3. Neckers L (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8: 552–61.
4. Whitesell L, Lindquist SL (2002) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 761–772.
5. Cheng GF, Guan S, Fedosenko M, Fan J, Li Y, et al. (2008) TGF( $\alpha$ )-stimulated secretion of HSP90( $\alpha$ ): Using LRP-1/CD91 Receptor To Promote Human Skin Cell Migration Against TGF( $\beta$ )-Rich Environment In Wound Healing. *Mol Cell Biol*.
6. Eastace SK, Sakurai T, Stewart JK, Yamahara D, Unger C, et al. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90  $\alpha$  in cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 6: 307–314.
7. Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng GF, et al. (2007) Extracellular heat shock protein-90( $\alpha$ ): linking hepatic to skin cell motility and wound healing. *Embo J* 26: 1221–1233.
8. Sidra K, Santotoki M, Yikori E, Panayotou G, Panavouli E (2004) Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 279: 45379–45388.
9. Sidra K, Panavouli E (2006) Extracellular HSP90: connecting the cell surface. *Cell Cycle* 5: 1564–1568.
10. Tazumi S, Neckers L (2007) Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* 98: 1536–1539.
11. Stellas D, Kanonieri A, Panavouli E (2007) Monoclonal antibody 4C5 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 13: 1831–1838.
12. McCready J, Sims JD, Chao D, Jay DG (2010) Secretion of extracellular hsp90 $\alpha$  by an oncogene increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10: 294.
13. Song X, Wang X, Zhou W, Shi H, Feng D, et al. (2010) The regulatory mechanism of extracellular Hsp90( $\alpha$ ) on matrix metalloproteinase-2 processing and tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 285: 40039–40049.
14. Stellas D, El Hamidieh A, Panavouli E (2010) Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biol* 11: 51.
15. Tazumi S, Scroggins B, Koga Y, Lee MJ, Trempel J, et al. (2006) A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 25: 2478–2487.
16. Wang X, Song X, Zhou W, Fu Y, Shi H, et al. (2009) The regulatory mechanism of Hsp90 $\alpha$  secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21238–21242.
17. Thomaidou D, Panavouli E (1993) Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C5. *Neuroscience* 53: 813–827.
18. Thomaidou D, Dori I, Panavouli E (1995) Developmental expression and functional characterization of the 4C5 antigen in the postnatal cerebellar cortex. *J Neurochem* 64: 1937–1944.
19. Yikori E, Nagata I, Panavouli E (1996) Migration behavior of rodent granule neurons in the presence of antibody to the 4C5 antigen. *J Neurochem* 71: 1781–1789.
20. Yikori E, Sidra K, Margaritis LH, Panavouli E (2004) The 4C5 antigen is associated with Schwann cell migration during development and regeneration of the rat peripheral nervous system. *Glia* 45: 39–53.
21. Sidra K, Gaitanou M, Stellas D, Matsas B, Panavouli E (2008) A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interactions with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem* 283: 2031–2041.
22. Boulikas GL, Hozumi N, Shulman MJ (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 312: 643–646.
23. Morrison SL, Wren LA, Oi VT (1988) Genetically engineered antibody molecules: new tools for cancer therapy. *Cancer Invest* 6: 183–192.
24. Sahagan BG, Durai H, Salgaber-Müller J, Totiguzo F, Guindon CA, et al. (1986) A genetically engineered murine/human chimeric antibody retains specificity for human tumor-associated antigens. *J Immunol* 137: 1066–1074.
25. Bachus GP, Sed, Burton DR. Monoclonal antibodies from combinatorial libraries.
26. Kabat EA, Wu TT (1994) Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, migration, and complementarity determining regions to binding of antibody-containing sites. *J Immunol* 147: 1709–1719.
27. Sastry L, Ahing-Mera M, Hsieh WD, Short JM, Sorge JA, et al. (1999) Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5728–5732.
28. Novotny J, Braccatori SE, Saul FA (1998) On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPC 605, D4.3, and HyHEL-5. *Biochemistry* 37: 4735–4749.
29. Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341: 544–546.
30. Hamers-Gastman G, Atchouh T, Muisydemans S, Robinson G, Hatters G, et al. (1995) Naturally occurring antibodies devoid of light chain. *Nature* 375: 446–448.
31. Muisydemans S, Gambillan C, Wyns L (2004) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous history of paired domains. *Trends Biochem Sci* 29: 220–225.
32. Winter G, Milstein C (1991) Mice-made antibodies. *Nature* 349: 293–298.
33. Bradbell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT (2003) Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 361: 469–471.
34. Stevens JI, Solomon A, Schiffer M (1991) Bence Jones proteins: a powerful tool for the fundamental study of protein chemistry and pathophysiology. *Biochemistry* 30: 6803–6806.
35. Leibster JA, Fei HP, Grosmaire LS, Norris NA, Tsu TT (1987) An immunoglobulin light chain dimer with GD4 antigen specificity. *Mol Immunol* 24: 1255–1261.
36. Sun M, Li L, Gao QS, Paul S (1994) Antigen recognition by an antibody light chain. *J Biol Chem* 269: 734–738.
37. Nishimura E, Mochizuki K, Kato M, Hashizume S, Hamada H, et al. (1998) Recombinant light chain of human monoclonal antibody HB4C5 as a potentially useful lung cancer-targeting vehicle. *Hum Antibodies* 9: 111–124.
38. Mann L, Wahi M, Johnson JP (1994) A simpler sort of antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 891–896.
39. Peretz B, Benedict GR, Le A, Shapiro SS, Thaparajan F (1998) Cardiolipin binding a light chain from lupus-prone mice. *Biochemistry* 37: 1439–1447.
40. Dubonovitch AP, Kraschuk ZI, Chumakov AA, Gots A, Aronov F, et al. (2000) Expression, refolding, and ferritin-binding activity of the isolated VL-domain of monoclonal antibody F11. *Biochemistry (Mosc)* 65: 1041–1048.
41. Gaitanou M, Buzanac F, Pappa C, Georgopoulos N, Maralaki A, et al. (2000) Cloning, expression and localization of human BM98 shows that it maps to chromosome 11p15.5, a region implicated in Beckwith-Wiedemann syndrome and tumorigenesis. *Biochem J* 325: 715–724.
42. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
43. Chaitum KA (2006) Expression and isolation of recombinant antibody fragments in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 248: 245–254.
44. Panavouli E, Harel G, Matsas B (1991) Purification and characterization of neuron-specific surface antigen defined by monoclonal antibody BM98. *J Neurochem* 56: 782–790.
45. Heinburg J, Yao J, Morey S, Gliaski OV, Huxley VH, et al. (2006) Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen-Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia* 8: 939–948.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits

Dimitris Stellas<sup>1</sup>, Avraam El Hamidieh<sup>1</sup>, Evangelia Patsavoudi<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Heat shock protein 90 (HSP90) is a molecular chaperone that is considered a new target for the treatment of cancer. Increasing data reveal an extracellular chaperoning activity for HSP90. Here we investigate the interaction of the secreted isoforms of HSP90 with matrix metalloproteinases (MMP) MMP2 and MMP9. Moreover we examine the role of a monoclonal antibody (mAb) against HSP90, mAb 4C5, regarding these interactions and its value as a potential inhibitor of human breast cancer cell invasion and metastasis.

**Results:** Our results showed that both HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  are secreted by MDAMB453 human breast cancer cells and interact with MMP2 and MMP9. MAb 4C5, while not affecting the secretion of inactive MMPs, inhibits their activation by disrupting their interaction extracellularly with both isoforms of HSP90. The *in vivo* studies revealed that mAb 4C5 significantly inhibits the metastatic deposit formation of MDAMB453 cells into the lungs of SCID mice.

**Conclusion:** Both isoforms of HSP90 are secreted by MDAMB453 cells and interact with MMP2 and MMP9. MAb 4C5 prevents MMP2 and MMP9 activation, by disrupting their interaction with HSP90. Finally mAb 4C5 significantly inhibits the metastatic deposit formation of MDAMB453 cells, by preventing their extravasation and infiltration in the lung tissue and therefore it could be used as a potential therapeutic agent for cancer metastasis.

## Background

The dissemination of tumor cells from their primary site of growth to distant organs is the major cause of morbidity and death among cancer patients [1,2]. Thus, inhibition of invasion and metastasis of cancer cells is of great importance in the treatment of cancer. Cancer cell invasion and metastasis is considered to be a complex, multi-step process, during which malignant cells detach from their point of origin, migrate and invade surrounding tissues, enter the vasculature, circulate and reach secondary sites, extravasate and establish metastatic foci [3,4].

One well-characterized property of invasive tumors is their ability to accelerate the degradation of the

extracellular matrix, by matrix metalloproteinases (MMPs) [5]. This degradation provides access to the vasculature and lymphatic system, allowing tumor dissemination. MMPs have increased expression and activation in almost all human cancers [6]. More specifically, MMP2 and MMP9 are of particular interest because in addition to gelatin they degrade type IV collagen, the basic component of the basement membrane, which is the main barrier separating *in situ* and invasive carcinoma [7,8].

The heat shock protein 90 (HSP90) is a molecular chaperone which exists in mammalian cells in two isoforms that share 86% amino acid conservation (HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ ). It is one of the most abundant cytoplasmic proteins in unstressed cells, where it performs housekeeping functions, controlling the activity, intracellular disposition and proteolytic turnover of a variety of proteins. Over the past years there has been increasing

\* Correspondence: epatsavoudi@pasteur.gr  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vasilissis Sofias Ave, 11521 Athens, Greece



evidence that HSP90 interacts with a great number of molecules intracellularly, that are involved in the development and/or survival of cancer cells [9-11], allowing mutant proteins to retain or gain function, while permitting cancer cells to tolerate the imbalanced signaling that such oncoproteins create. Recently, we and others have identified a pool of HSP90 at the cell surface, where it was shown to be involved in cancer cell invasion [12]. Additionally, we have reported results showing that a monoclonal antibody (mAb) recognizing both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90, mAb 4C5, inhibits melanoma cell invasion and metastasis by binding selectively to the surface pool of HSP90 [13]. Finally, we have presented data indicating that surface HSP90 interacts specifically with the extracellular domain of HER-2 and that this interaction which is necessary for the receptor's activation leading to breast cancer cell invasion, is disrupted by mAb 4C5 [14].

Taking all the above into consideration together with previous data showing that HSP90 $\alpha$  is secreted from fibrosarcoma cells and promotes their invasive capacity through association with MMP2 [15], in the present work we sought to investigate the secretion of both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 in the conditioned medium of MDAMB453 human breast cancer cells and their possible interaction with MMP2 and/or MMP9. Furthermore and after taking into account our previously mentioned recent data showing that mAb 4C5 inhibits MDAMB453 human breast cancer cell invasion *in vitro* by disrupting the association of cell surface HSP90 with HER-2, [14] in this work we examined: a) the effect of mAb 4C5 on MMP2 and MMP9 secretion and activation b) the ability of this antibody to disrupt the interaction of extracellular HSP90 with MMP2 and/or MMP9 and c) the capacity of mAb 4C5 to inhibit *in vivo*, the formation of metastatic deposits of MDAMB453 cells in the lungs of SCID mice.

## Results

### Both the $\alpha$ and $\beta$ isoforms of HSP90 are secreted by MDAMB453 breast cancer cells and interact with MMP2 and MMP9

In order to investigate the secretion of the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of HSP90 by MDAMB453 cells, cell lysates and concentrated supernatants derived from the culture of these cells were analyzed by Western blotting using mAb 4C5 which recognizes both isoforms of HSP90 [16], and the commercially available anti-HSP90  $\alpha$  and anti-HSP90  $\beta$  antibodies. As shown in Figure 1A, both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 are secreted by MDAMB453 cells. The absence of beta actin in the supernatant fraction (Figure.1A) demonstrates that there is no contamination of the culture supernatants with the intracellular components of cells during the

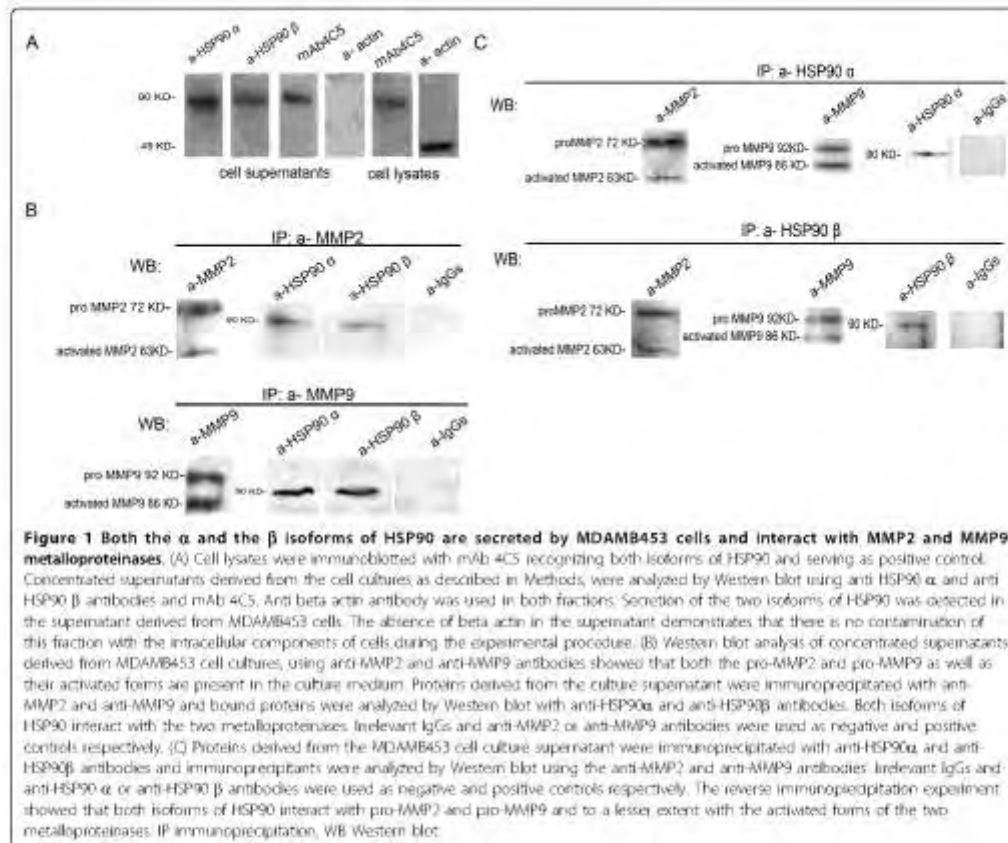
experimental procedure. At this point it is important to note that beta actin was never detected in any of the concentrated supernatants used in the experiments described hereafter (data not shown).

An important characteristic of invasive tumors is their capacity to accelerate the degradation of extracellular matrix by MMPs [5]. MMPs are secreted as inactive pro-enzymes and are activated extracellularly by proteolysis [17]. We thus next examined the possible interaction of the secreted pool of HSP90 with MMP2 and MMP9. After confirming the presence of both pro-MMP2 and pro-MMP9 as well as their activated forms in the culture medium of MDAMB453 cells (Figure.1B), we showed by immunoprecipitation experiments in the culture supernatant using anti-MMP2 and anti-MMP9 antibodies followed by Western blot analysis with antibodies against the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of HSP90, that indeed both isoforms of HSP90 interact with the metalloproteinases examined (Figure.1B). In order to further clarify the interaction of extracellular HSP90 with the MMPs studied, reverse co-immunoprecipitation experiments were performed. Our results showed that both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 interact with the inactive pro-MMP2 and pro-MMP9 (Figure.1C). Interaction with the mature forms of the corresponding metalloproteinases was also detected (Figure.1C).

### MAb4C5 prevents MMP2 and MMP9 activation and disrupts their interaction with both the $\alpha$ and the $\beta$ isoform of extracellular HSP90

Based on our observation that presence of both the inactive and mature forms of MMP2 and MMP9 were detected in the concentrated supernatants derived from MDAMB453 cell cultures, we next examined the effect of mAb 4C5, the function blocking anti-HSP90 antibody, on the secretion and activation of MMP2 and MMP9. Analysis of concentrated supernatants derived from MDAMB453 cells, with zymography, showed that when 200  $\mu$ g/ml of mAb 4C5 were included in the culture medium, presence of the inactive pro-enzymes was not affected, while detection of the activated forms of both MMPs was not obtained (Figure.2A). These results were confirmed using antibodies against the metalloproteinases, and western blot analysis (Figure.2B). At this point it is important to note that addition of mAb 4C5 in the culture medium did not affect secretion of HSP90 $\alpha$  or HSP90 $\beta$  (data not shown).

Consequently and taking into account the previously demonstrated interactions of both isoforms of HSP90 with MMP2 and MMP9, we explored the role of mAb 4C5 in relation to these interactions, using co-immunoprecipitation experiments. To this purpose, concentrated conditioned media derived either from control or mAb 4C5 treated cultures were immunoprecipitated with

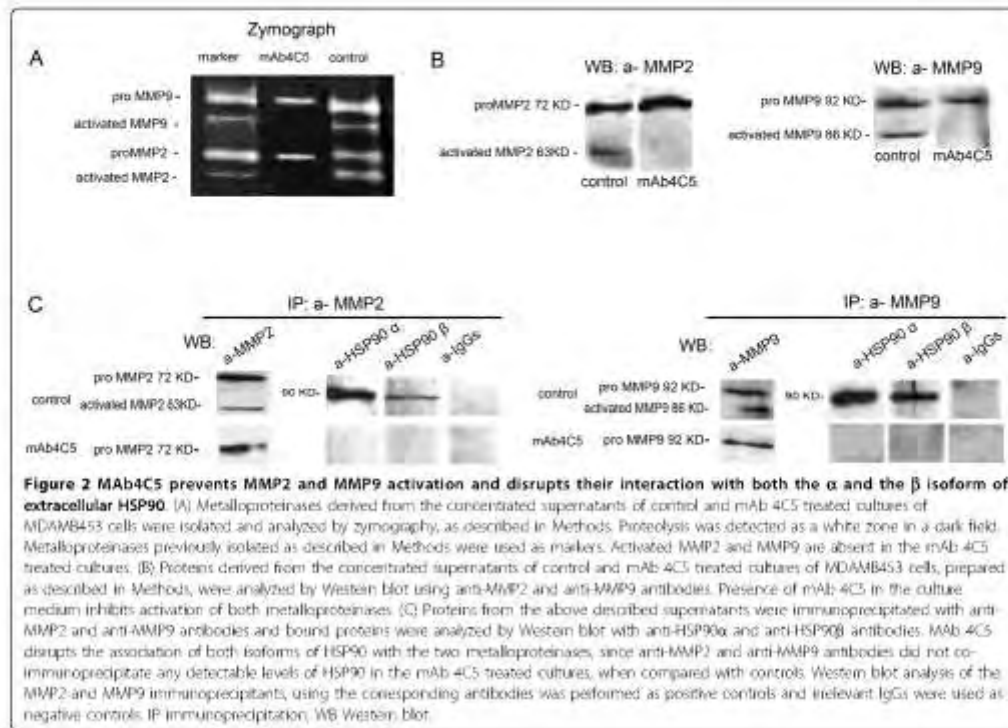


antibodies against MMP2 and MMP9 followed by Western blot analysis with antibodies against the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90. As shown in Figure 2C, co-immunoprecipitation of both isoforms of HSP90 with the inactive forms of MMP2 and MMP9 was inhibited in the media derived from the cells cultured in the presence of mAb 4C5, when compared with control cultures. This result indicates that mAb 4C5 disrupts extracellularly the interaction of both pro-MMP2 and pro-MMP9 with the two isoforms of HSP90.

#### MAb4C5 inhibits the metastatic deposition of MDAMB453 breast cancer cells into the lungs of SCID mice

On the basis of previously reported studies using the MDAMB453 cell line [14] and showing that mAb 4C5 inhibits the invasion of these cells *in vitro*, we next sought to investigate the *in vivo* effect of mAb 4C5 on the metastatic behavior of this breast cancer cell line. Thus, we injected MDAMB453 cells labeled with the

fluorescent dye Dil intravenously in SCID mice, either in the presence or in the absence of 100  $\mu$ g/ml of mAb 4C5. Twenty four hours after the injection, mice were euthanized and the metastatic deposits of MDAMB453 cells were traced and evaluated in the lungs of both the control and the mAb 4C5 treated groups. At the macroscopic level an important number of metastatic cell deposits (arrow in Figure.3A) was observed in control animals as compared to mAb 4C5 treated mice. This was confirmed microscopically where a very important decrease in the deposition of cancer cells was detected in the mAb 4C5 treated mice (arrows in Figure.3B). Quantification of the metastatic deposit formation revealed a 86.67% inhibition in the mAb 4C5 treated mice when compared with control mice (Figure.3C). In order to further visualize the deposition of MDAMB453 cells in the lung tissue, we performed a 3D reconstruction of a cryosection derived from a control animal where the infiltration of metastatic deposits of



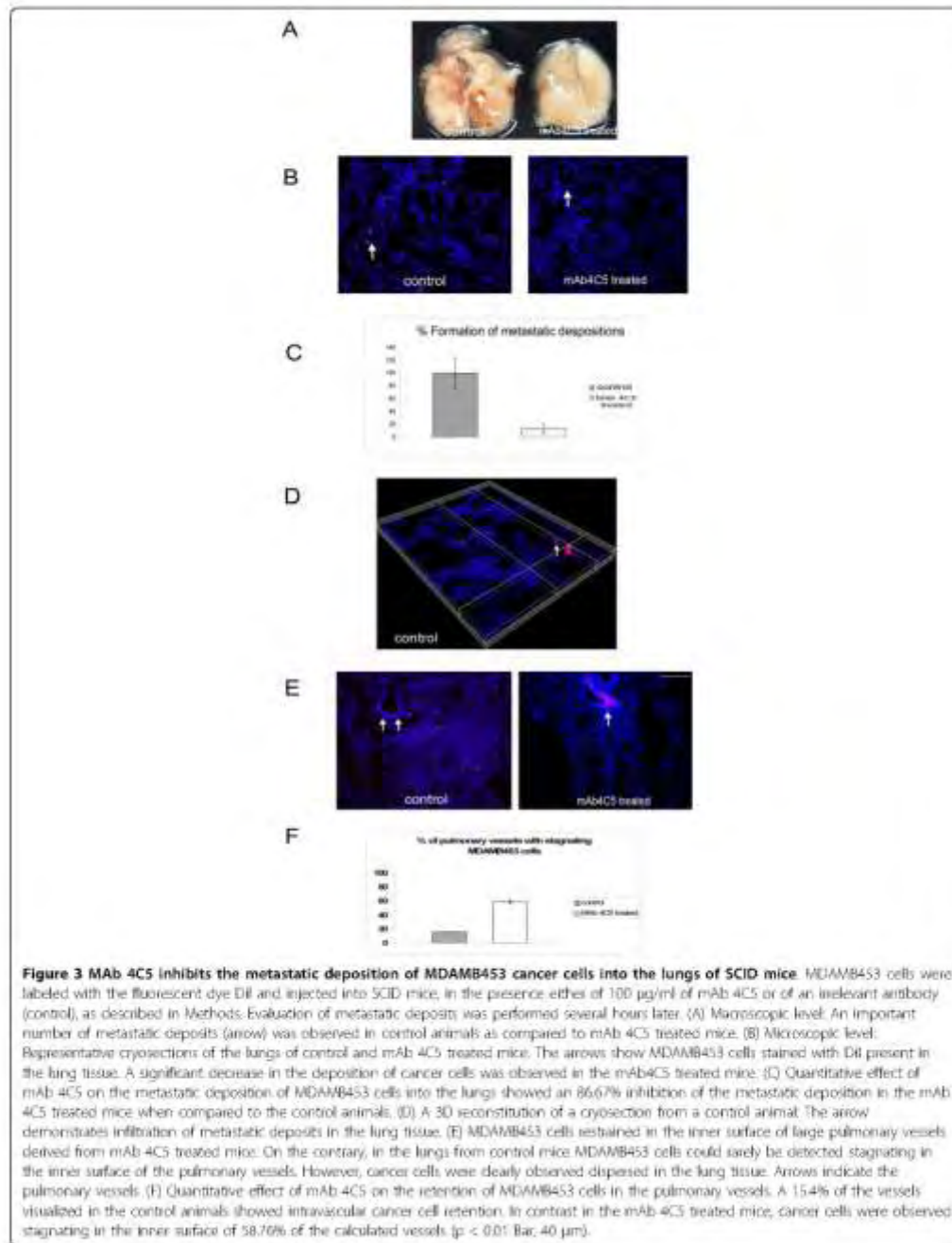
MDAMB453 cells in the lung tissue is clearly demonstrated (arrow in Figure.3D). It is of interest to note that in the mAb 4C5 treated mice, MDAMB453 cells were often observed stagnating on the inner surface of large pulmonary blood vessels whereas no such images could be detected in the control animals (arrows in Figure.3E). Quantification of this occurrence revealed that in 58.76% of the pulmonary vessels visualized in the, mAb4C5 treated animals, MDAMB453 cells were observed stagnating on the inner surface of the vessels. In contrast, only 15.4% of the vessels observed in the control animals showed intravascular retention of the cancer cells. (Figure 3F).

#### Discussion

Our present findings demonstrate that both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 are secreted by cultured MDAMB453 human breast cancer cells and interact with matrix metalloproteinases, MMP2 and MMP9. Additionally, we show that a monoclonal antibody against HSP90, mAb 4C5, prevents maturation of the two metalloproteinases *in vitro* and inhibits metastatic deposition of breast cancer cells *in vivo*.

We have previously reported the presence of HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  on the cell surface of MDAMB453 breast cancer cells [14]. Here we further examined the extracellular localization of HSP90. More specifically, we demonstrated the secretion of both HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$  in the culture medium of MDAMB453 cells using antibodies specific for the two isoforms. At this point it is important to note that specificity of the anti-HSP90 $\beta$  antibody was further confirmed since, Western blot analysis of human recombinant HSP90 $\alpha$  using this antibody gave negative results (see additional files 1 and 2). Our findings, for the first time to our knowledge, reveal secretion of HSP90 $\beta$  by breast cancer cells and are only partly in agreement with existing knowledge. Indeed, previous studies have reported secretion only of HSP90 $\alpha$  from various cell types including HT 1080 fibrosarcoma cells [15], human dermal fibroblasts under hypoxia conditions [18] and transforming growth factor alpha stimulated human keratinocytes [19].

Controlled degradation of the extracellular matrix is essential for the invasion and metastasis of malignant tumors. In this context matrix metalloproteinases and in particular MMP2 and MMP9 are of crucial significance





for tumor development and progression [20]. Indeed increasing experimental evidence indicates involvement of both enzymes at multiple steps of the metastatic process[21] It is important to note that these metalloproteinases are secreted as inactive pro-enzymes and acquire their active form extracellularly [3,22]. Taking these into account together with accumulating data demonstrating extracellular activity of HSP90 [12], we next examined the possible interaction of this molecule with the two metalloproteinases using co-immunoprecipitation experiments. Our results showed that both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 interact with the secreted, inactive forms of MMP2 and MMP9. Interestingly, reverse co-immunoprecipitation experiments revealed that HSP90 also interacts with the extracellularly activated forms of the two MMPs. The above observations indicate that HSP90 participates in the activation of MMP2 and MMP9. Moreover, they suggest a second level of chaperoning for this molecule associated with the mature forms of the metalloproteinases examined. Our findings are in accordance with previously reported data showing association of the secreted pool of HSP90 $\alpha$  with MMP2 [15,23]. Moreover they provide new evidence for a further increase in the number of clients of this chaperone molecule by adding MMP9 to the list of its extracellular substrates.

We have previously demonstrated that mAb 4C5 inhibits the invasive capacity of MDAMB453 breast cancer cells by disrupting the interaction of cell surface HSP90 with the extracellular domain of HER-2, a member of the ErbB family of epidermal growth factor receptors [14]. Taking this into account together with the above mentioned findings we next investigated whether mAb 4C5 independently of its effect on HER2 has also an effect on the secretion and activation of MMP2 and MMP9. Our results showed that when the cell-impermeable mAb 4C5 [14] is added to the culture medium of MDAMB453 cells, secretion of pro-MMP2 and pro-MMP9 is not affected; however and as shown by zymography and western blot analysis, the activation of these metalloproteinases is dramatically inhibited as compared to controls where mAb 4C5 is not included in the culture medium. Moreover, co-immunoprecipitation experiments performed as described in Methods, revealed that mAb 4C5 effectively disrupts the interaction of HSP90 with MMP2 and MMP9 respectively. Our present data indicate that mAb 4C5 while not affecting secretion of the inactive forms of MMP2 and MMP9, prevents their maturation most probably by disrupting their interaction with the extracellular pool of HSP90. Similar to our results have been previously reported by Eustace et al [15] who have shown that inhibition of extracellular HSP90 $\alpha$  decreases activation of MMP2. At this point it should be noted that preliminary

experiments performed using the MDAMB231 breast cancer cells which lack the HER2 receptor, indicate not only that these cells too secrete both isoforms of HSP90 but also that MMP2 and MMP9 activation by extracellular HSP90 may be independent of the HER2/HSP90 interaction previously reported [14], since in this system as well mAb 4C5 prevented activation of these metalloproteinases (unpublished data). Nevertheless our overall observations do not exclude the possibility that in combination with HSP90 additional molecules, such as other HSPs, HSP90 co-chaperones etc may be necessary for the activation of the MMPs studied in this work. This however, needs further investigation.

We have previously demonstrated that mAb 4C5 significantly inhibits melanoma metastasis in C57BL/6 mice inoculated with B16 F10 melanoma cells, [13], supporting accumulating data showing that antibodies or other small molecules that inhibit HSP90 can be used as anti-cancer agents [24] This prompted us to explore the anti-metastatic activity of mAb 4C5 with respect to MDAMB453 breast cancer cells. In line with the recently reported *in vitro* results [14], in this work we showed that mAb 4C5 strongly inhibits the metastatic depositions of MDAMB453 cells into the lungs of SCID mice. More specifically an 86.67% inhibition of metastatic depositions of MDAMB453 cells was observed in the mAb 4C5 treated mice as compared with control animals. It is interesting to note that in the experimental group of mice that received mAb 4C5, MDAMB453 cells were often observed stagnating on the inner surface of large pulmonary vessels, whereas such a phenomenon was very rarely detected in the control mice. Quantification of this occurrence confirmed a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) between the two experimental groups. This remarkable observation together with the above mentioned data, tempts us to reason that mAb 4C5 exerts its activity by disrupting the interaction of extracellular HSP90 with MMP2 and MMP9 and thus preventing activation of these matrix metalloproteinases which, as is well documented [7,8], is necessary for the degradation of type IV collagen, a major constituent of the basement membrane associated with the pulmonary blood vessel. As a consequence, tumor cells remain limited to the inner surface of the vessel and their infiltration into the lung tissue is impaired. Regulation of MMP activation has been previously correlated with cancer cell extravasation. In particular Cruz-Munoz et al have reported that TIMP-3 decreases MMP2 activation which in turn limits tumor cell extravasation and subsequent colonization of the lung[25].

## Conclusions

Our present findings combined with recently reported data [13,14], reinforce and further extend the idea that

extracellular chaperoning of both the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90, at least in relation to cancer cell invasion and metastasis, is exerted at multiple levels such as activation of growth factor receptor as previously reported [14] and MMP2 and MMP9 activation. Our results additionally suggest that extracellular HSP90 may also chaperone the activity of the mature metalloproteinases with their corresponding substrates. However, elucidation of the precise molecular mechanisms underlying these interactions needs further investigation. Finally, our present work further demonstrates the antimetastatic capacity of mAb 4C5, showing that it inhibits not only melanoma metastasis [13] but also the formation of metastatic breast cancer cell deposits by preventing extravasation of tumor cells and their invasion in the lung tissue.

## Methods

### Reagents

MAb4C5 was produced and characterized, as previously reported [26]. In the present study, mAb4C5 was used as concentrated serum free supernatant dialyzed in saline buffer in all experiments performed. Polyclonal antibodies specific for the  $\alpha$  and the  $\beta$  isoforms of HSP90 were obtained from Chemicon, International, USA. At this point it should be noted that according to the manufacturer, the anti-HSP90 $\beta$  antibody shows no reactivity with HSP90 $\alpha$  and the anti-HSP90 $\alpha$  antibody reacts weakly with HSP90 $\beta$ . Polyclonal antibody recognizing both the inactivated pro-enzyme and the activated form of human MMP2 was obtained from Chemicon, International, USA. Polyclonal antibody recognizing both the inactivated pro-enzyme and the activated form of human MMP9 was obtained from Santa Cruz Biotechnology INC. Monoclonal antibody against human beta actin was obtained from Santa Cruz Biotechnology INC. Polyclonal biotinylated antibodies against anti-rabbit and anti mouse immunoglobulins were obtained from Dako Cytomation Denmark A/S. Human recombinant HSP90 $\alpha$  was a generous gift from Dr C. Prodromou, Institute of Cancer Research. Gelatin-agarose beads, used for the preclearing of the supernatants, as well as protein G and protein A-sepharose beads, used for the co-immunoprecipitation experiments, were obtained from Sigma. Dulbecco's modified Eagles medium (DME), fetal bovine serum (FBS), RPMI, were obtained from Gibco, INC, USA.

### Cell cultures

The MDAMB453 human breast cancer cell line was kindly provided by Dr A.Mamalaki from the Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece. The cells were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$  on plastic dishes as monolayers in RPMI media containing 10% FBS and

supplemented with the antibiotic garamycin, (10 mg/ml) in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified atmosphere at 37°C. When cells reached confluence, the initial medium was replaced by RPMI without FBS and the cells were left for 24 hours in starvation conditions. Subsequently they were exposed to 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of mAb 4C5 for 24 h. Control cultures were grown for 24 h either in RPMI medium alone or in culture medium containing 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of an irrelevant IgG2a monoclonal antibody named BM88 [27].

### Preparation of cell lysates and concentrated supernatants

At the termination of the cultures, cells were immediately washed twice with ice-cold PBS and lysed in 50  $\mu\text{l}$  lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 %Triton, 10 %Glycerol, 200 mM Na3VO4, 0.5 mM PMSF, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin). Protein lysates were quantified and equal amounts of total protein were subjected to SDS-PAGE and Western blot. Concentrated supernatants derived from MDAMB453 cells, cultured as described above, were prepared as follows: An initial volume of 20 ml of culture supernatant was collected from each experimental case (control and mAb 4C5 treated cultures). At this point it is important to underline that the supernatants were derived from the same number of cultured cells, for all experimental cases. Subsequently 100 fold concentration was performed using ultra centrifugal filter devices (10000 MWCO) obtained from Millipore TM. The concentrated supernatants were used for all the experimental procedures concerning immunoprecipitations and Western blots. Equal volumes of the concentrated supernatants were subjected to SDS-PAGE on 12% acrylamide in order to obtain the best separating conditions for the proteins of interest [28]. The analyzed proteins were transferred to nitrocellulose membranes. For Western blots, membranes were incubated for 40 min at room temperature with non-fat dry milk (5%) in TBS and were then incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C. The membranes were washed with 0.3% BSA in TBS and incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies for 2 h at room temperature. After washing with TBS, the bound antibody complex was detected using an ECL chemiluminescence reagent (Amersham) and XOMAT- AR film (Kodak, Pittsburgh, PA, USA) as described by the manufacturers.

### Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation was performed as previously described [29]. In brief, equal amounts of cellular lysates and equal volumes of the concentrated supernatants from control and mAb 4C5 treated cultures of MDAMB453 cells were incubated with antibodies

overnight at 4°C. The immunocomplexes were then incubated for 2 h at room temperature with protein G-Sepharose or protein A-Sepharose (for the mAb 4C5 treated cultures) and washed 3 times with lysis buffer. At this point it should be noted that mAb 4C5 does not bind to protein A Sepharose (unpublished observations) thus its presence did not interfere with the immunoprecipitation process. Bound proteins were analyzed by gel electrophoresis and Western blot as described above.

#### Isolation of metalloproteinases

Isolation of the MMPs from the other proteins present in the concentrated supernatants was performed as previously described[30]. Briefly gelatin-Agarose beads were used in order to form two columns. The concentrated supernatants of the control and mAb 4C5 treated cultures were loaded on the two columns and washed with an equilibration buffer containing 0.05M Tris-HCl pH:7.5/0.5 M NaCl, and 0.1% Triton X-100. Gelatine bound MMPs were eluted with equilibration buffer containing 1 M NaCl and 5% (v/v) dimethyl sulphoxide.

#### Zymographs

Equal volumes of isolated MMPs derived from control and mAb 4C5 treated cultures of MDAMB453 cells, were denatured and analyzed by gel electrophoresis in a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 0.1% (w/v) gelatin. The gel was incubated at room temperature for 2 h in the presence of 2.5% Triton x-100 and subsequently at 37°C over night in a buffer containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, and 50 mM Tris (pH 7.5). The gel was then stained for protein with 0.5% (w/v) Coomassie and photographed on a light box. Proteolysis was detected as a white zone in a dark field. MMPs (proenzymes and active forms) isolated as previously described [30] from extracts of interface tissue from loose hip arthroplasty endoprostheses were used as markers (kindly provided by Dr Aletras).

#### Assay of MDAMB453 cell metastatic deposit formation in the lung tissue

SCID mice were originally purchased from Jackson Laboratory, bred and maintained under specific pathogen free conditions at the Experimental Animal Unit of the Hellenic Pasteur Institute. All of the experiments with animals were done in accordance with the guidelines approved by the Ethical Committee of the Hellenic Pasteur Institute. The *in vivo* metastatic deposit formation assay, was performed as previously described [31,17]. Briefly, cultured MDAMB453 cells were pre-incubated with Dil for 1 hour, washed twice with PBS, trypsinized and made up to the cell density of 10<sup>6</sup>/300 µL in PBS in the absence or presence of 100 µg/ml of an irrelevant antibody named of mAb BM88[27] or

100 µg/ml of mAb 4C5. Twenty 8- 10-week-old female SCID mice were injected through the tail vein with 0.3 ml of the above cell preparations. The animals were divided into two equal groups: the control group injected with cells dialysed in PBS or the irrelevant antibody, mAb BM88 and the mAb 4C5 treated group. The animals were euthanized 24 hours later and with the use of a peristaltic pump connected to the left ventricle of the heart, their lungs were completely washed from the remaining blood, by pumping 200 ml of saline buffer. This procedure ensures that all cancer cells which are not attached, either on the inner surface of the blood vessels or on the lung tissue, are removed. Finally the lungs were perfused with 4% formalin solution and then embedded in OCT solution in order to perform cryosections. Each lung was sectioned with the cryotome and each section was counter stained with Dapi and visualised with a confocal microscope. In ten randomly chosen slides covering the whole of the lung tissue the MDAMB453 cells were calculated. The same experiment was performed twice with similar results.

#### Evaluation of tumor cell retention in the pulmonary vessels

In the above mentioned lung sections the total number of blood vessels was calculated and MDAMB453 stagnating cells were visualized and compared between the control and the mAb 4C5 treated animals.

#### Statistical analysis

For the experimental groups that were statistically analyzed for differences, Student's t test was used, in which  $p < 0.05$  was defined as statistically significant.

#### Additional material

**Additional file 1: Additional figure showing that the antibody against HSP90β does not recognize the HSP90α isoform.** The western blot analysis of human recombinant HSP90α and total cell lysates (positive control) derived from MDAMB453 cell cultures using anti-HSP90α (positive control) and anti-HSP90β antibodies.

**Additional file 2: Additional figure legend.** A file containing the legend of the additional figure.

#### Acknowledgements

We wish to thank Dr. A. Aletras for precious advice concerning the zymography experiments and for providing the metalloproteinase markers, Dr. A. Makalaki for providing the MDAMB453 cell line, Dr. C. Prodromou for his generous gift of recombinant HSP90α and Dr. K. Sidors for critically reading the manuscript. This project was supported by the European Social Fund and National Resources (EPEAEK-Archimedes).

#### Author details

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vasilissa Sofias Ave, 11521 Athens, Greece. <sup>2</sup>Department of Medical Instrumentation, Technological Educational Institution of Athens, Ag. Spyridonos str, Egaleo, 12210 Athens, Greece.

#### Authors' contributions

DS participated in the design of the study carried out, part of the *in vivo* experiments, the *in vivo* experiments and the statistical analysis. Moreover he participated in the drafting of the manuscript. AH performed part of the *in vivo* experiments and the zymography. EP coordinated the study, oversaw the experimental design and wrote the final draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 7 September 2009 Accepted: 5 July 2010  
Published: 5 July 2010

#### References

1. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:563-72.
2. Friedl P, Wolf K: Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp* 2002, **277**:85.
3. Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999, **189**:300-8.
4. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, **100**:57-70.
5. Liotta LA, Tryggvason K, Stetler-Stevenson G, Stetler-Stevenson M, Stetler-Stevenson M, Stetler-Stevenson M: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980, **284**:67-8.
6. Lopez-Otin C, Ovejero C: Protease degradation: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:509-19.
7. Itoh Y, Takamura A, Ito H, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Sakai M: Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001, **20**:4782-93.
8. Hamano Y, Zetserberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Suckhali A, Kalluri R: Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003, **3**:589-601.
9. Izzaci JS, Xu W, Nechemy L: Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2003, **3**:213-7.
10. Workman P: Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Detect Prev* 2002, **26**:405-10.
11. McCarthy MM, Pick E, Kluger Y, Gouk-Hortberg B, Lazova R, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM: HSP90 as a marker of progression in melanoma. *Ann Oncol* 2008, **19**:590-4.
12. Sidera K, Patsavoudi E: Extracellular HSP90: conquering the cell surface. *Cell Cycle* 2008, **7**:1564-8.
13. Stellas D, Karameis A, Patsavoudi E: Monoclonal antibody 4C3 immunostains human melanomas and inhibits melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 2007, **13**:1801-8.
14. Sidera K, Galanou M, Shellas D, Matsas R, Patsavoudi E: A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem* 2008, **283**:2031-41.
15. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yamamoto D, Unger C, Zehrmeyer C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beate G, et al: Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 2004, **6**:507-14.
16. Sidera K, Samiotaki M, Ylami E, Panyaytzou G, Patsavoudi E: Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 2004, **279**:45379-88.
17. Glimski OV, Huxley VH, Glimski GV, Perito KJ, Raz A, Glimski VV: Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia* 2005, **7**:522-7.
18. Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM, Chinn C, Chen M, Woodley DT: Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007, **26**:1221-33.
19. Cheng CF, Fan J, Fedesco M, Guan S, Li Y, Bandhyopadhyay B, Bright AM, Yershalmi D, Liang M, Chen M, et al: Transforming growth factor alpha (TGFalpha) stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor URP1 (CD91) to promote human skin cell migration against a TGFbeta rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* 2008, **28**:3344-58.
20. Johansson N, Ahonen M, Kahari VM: Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000, **573**:1-15.
21. Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:161-74.
22. Iremich MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, **17**:463-516.
23. Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Piskun W, Nechman J, Acedjo E, Khalil K: Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer Res* 2008, **68**:4833-42.
24. Banerji U, O'Donnell A, Scum M, Pacey S, Stapleton S, Asad Y, Simmons L, Maloney A, Raymond F, Campbell M, et al: Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005, **23**:4152-61.
25. Cruz-Munoz W, Sanchez DH, Grappa DM, English JL, Hill RP, Kholia R: Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in  *timp-3<sup>-/-</sup> mice. Oncogene* 2006, **25**:6489-96.
26. Thomaidou D, Patsavoudi E: Identification of a novel neuron specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4CS. *Neuroscience* 1993, **53**:13-27.
27. Patsavoudi E, Hurel C, Matsas R: Purification and characterization of neuron-specific surface antigen defined by monoclonal antibody B088. *J Neurochem* 1991, **56**:282-8.
28. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Labs, 2, 1989.
29. Mohajeri SB, Pal KS, Liu A, Cunningham DC: Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:12062-7.
30. Sygkios SA, Eleftheriou SC, Gannopoulou E, Panagiotopoulou E, Akentis AJ: Gelatinolytic and collagenolytic activity in periprosthetic tissues from loose hip endoprostheses. *J Biomed Mater Res* 2001, **28**:1310-20.
31. Heimburg J, Yan J, Morey S, Glimski OV, Huxley VH, Wild L, Krick R, Roy R, Glimski W, Rittmhouse-Gron R: Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen-Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia* 2006, **8**:939-48.

doi:10.1186/1471-2121-11-51

**Cite this article as:** Stellas et al: Monoclonal antibody 4C3 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biology* 2010, **11**:51.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

