



ΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΙ Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ C ΒΗΤΑ II (PKC βII) ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ ΜΙΑ ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MERKEL



Κούνουπα Ζουζάνα,¹ Χάντζιου Αδαμαντία,¹ Γιαταγάνα Ειρήνη,¹ Lavigne Matthieu,² Καφετζόπουλος Δημήτρης,²⁺ Καρδάσης Δημήτρης,² Κρασαγάκης Κωνσταντίνος¹

¹Εργαστήριο Δερματολογίας, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, ²Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το καρκίνωμα των κυττάρων Merkel (MCC) είναι μια επιθετική κακοήθεια του δέρματος. Παρά τις θεραπευτικές εξελίξεις, το 50% των ασθενών με μεταστατική νόσο δεν ανταποκρίνεται. Η PKCβII εκφράζεται στο δέρμα από μη κερατινοκυτταρικούς πληθυσμούς με σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση τους. Ωστόσο ο ρόλος της στο MCC είναι άγνωστος. Αναστολείς της PKCβII έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε έκφραση, γονιδιακή ρύθμιση και δράση της PKCβII στο MCC. Απώτερος σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση της σημασίας της PKCβII ως αντικείμενο στοχευμένης θεραπείας στο MCC.

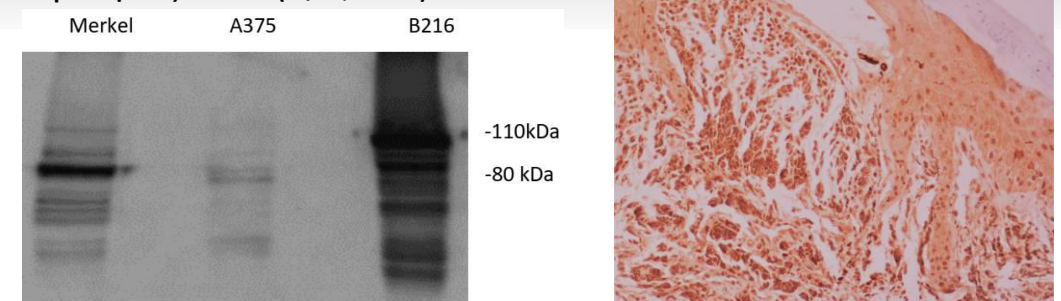
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρικές καλλιέργειες της σειράς MCC-1 χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο. Αναλύθηκαν έκφραση, ενεργοποίηση, ενδοκυττάρια εντόπιση, και ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση κατάλληλων μικρών

μορίων που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν την PKCβII. Η τεχνική του global RNA sequencing με gene expression profiling χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων και εμπλουτισμένων γονιδιακών οντολογικών συμπλεγμάτων που επάγονται από την PKCβII. Η PKCβII εξετάστηκε ανοσοϊστοχημικά σε βιοψίες ασθενών με όγκους MCC.

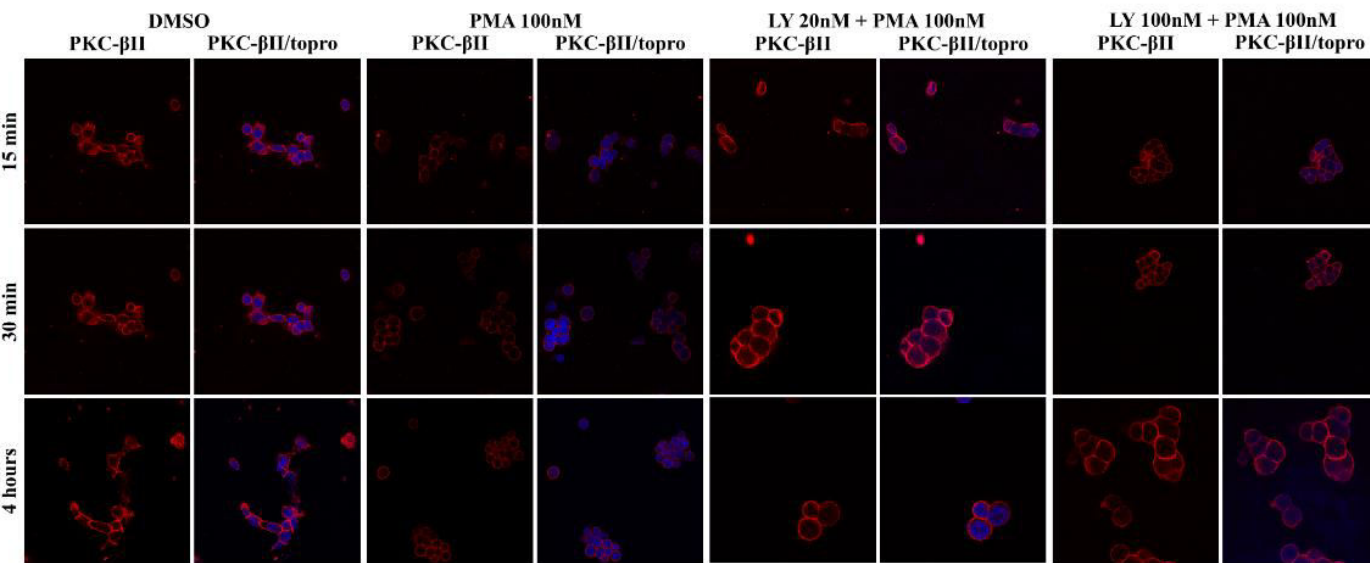
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση της PKCβII παρατηρήθηκε τόσο στα MCC-1 κύτταρα (WB) όσο και σε βιοψίες MCC (3/5; IHC).

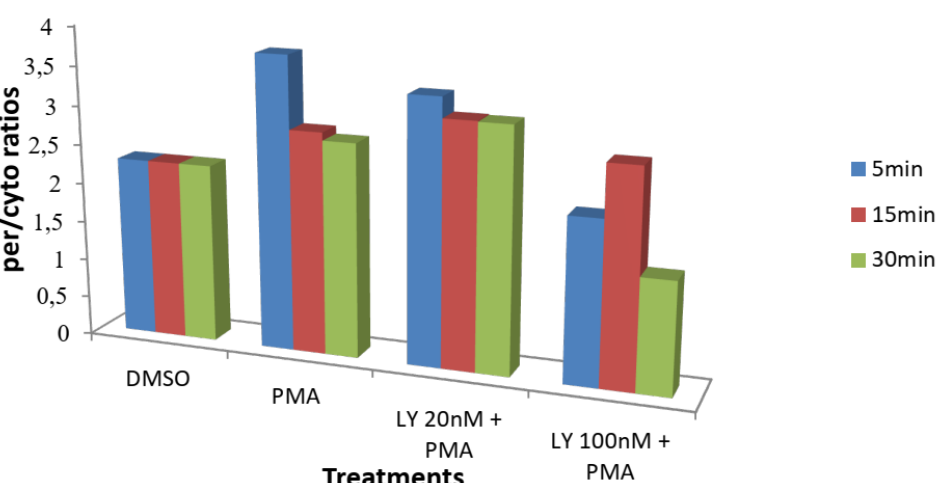


Εικόνα 1. Έκφραση της PKCβII (80 kDa) στην κυτταρική σειρά MCC-1 με Western blot. Ως control χρησίμευσε η κυτταρική σειρά μελανώματος A375.B216 που μέσω πλασμιδιακής διαμόλυνσης εκφράζει την PKCβII-GFP πρωτεΐνη (110 KDa) (αριστερά). Έκφραση της PKCβII σε βιοψίες καρκινώματος MCC (δεξιά).

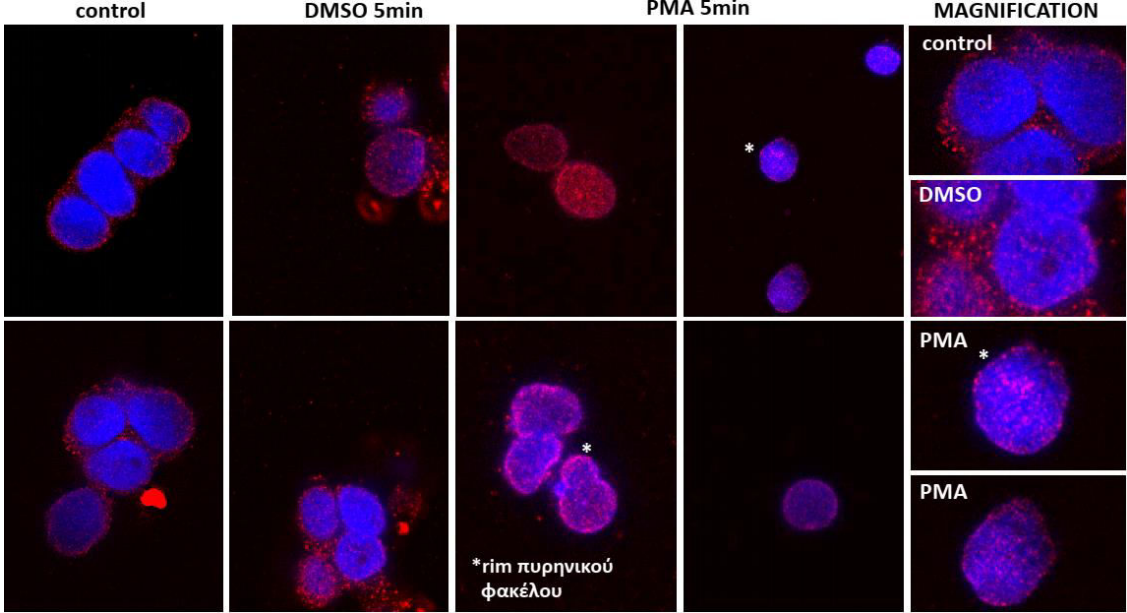
Σε πειράματα ανοσοφθορισμού στα MCC-1 κύτταρα παρατηρήσαμε στο συνεστιακό μικροσκόπιο ότι η ενεργοποίηση της PKCβII με PMA επέφερε ταχεία μετατόπιση της στην κυτταρική περιφέρεια. Το φαινόμενο μπορούσε να ανασταλεί με τη χρήση του ειδικού της PKCβII αναστολέα LY333531 (Εικόνες 2 & 3). Η φωσφορυλιωμένη μορφή της μετά από διέγερση με PMA μετατοπίστηκε στον πυρηνικό φάκελο κυρίως, αλλά και ενδοπυρηνικά (Εικόνα 4).



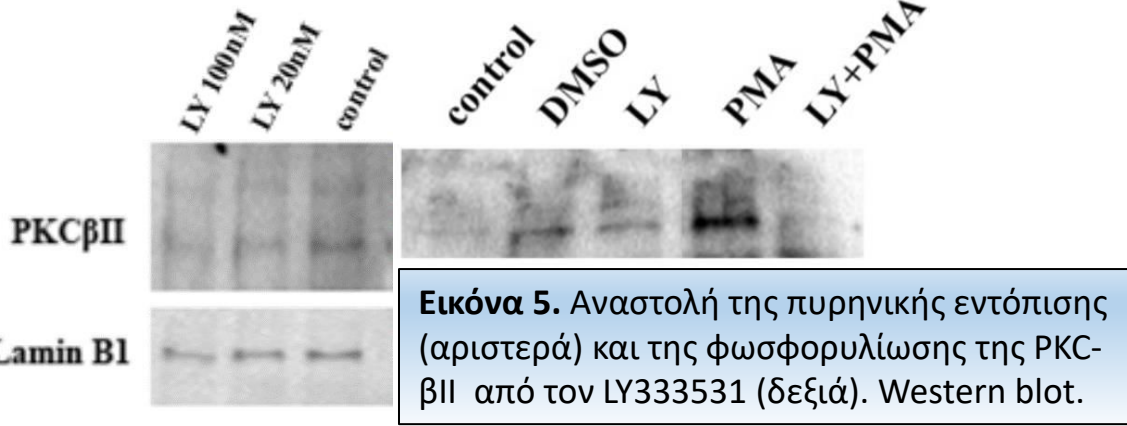
PKCβII per/cyto ratios in Merkel cells



Εικόνα 2. Καταστολή της PMA-επαγόμενης ενεργοποίησης και μετατόπισης της PKCβII από τον αναστολέα LY333531 (άνω).
Εικόνα 3. Ποσοτικοποίηση της αναλογίας PKCβII periphery / cytoplasm (κάτω).



Εικόνα 4. Μετατόπιση της PKCβII κατά την ενεργοποίησης της με PMA από το κυτταρόπλασμα στον πυρηνικό φάκελο. Δεξιά στη μεγέθυνση αναδεικνύεται πέραν της πυρηνικής μεμβράνης και εντός του πυρήνα.



Εικόνα 5. Αναστολή της πυρηνικής εντόπισης (αριστερά) και της φωσφορυλίωσης της PKCβII από τον LY333531 (δεξιά). Western blot.

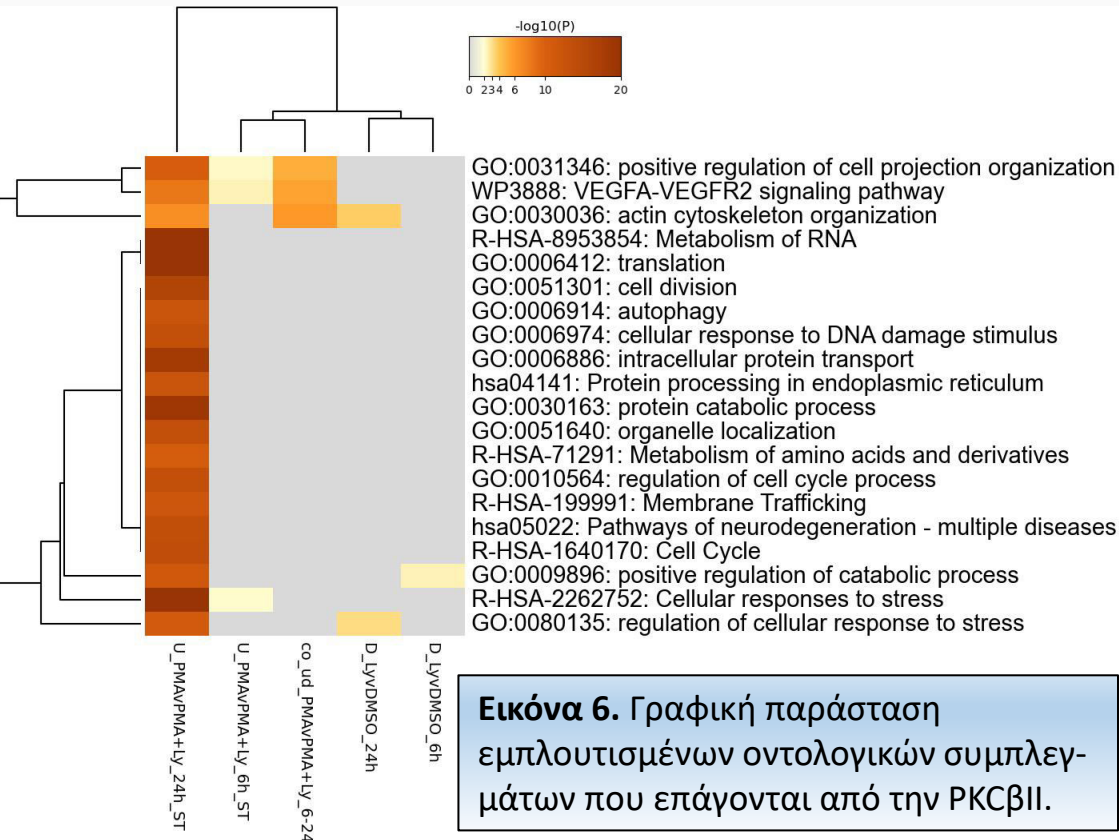
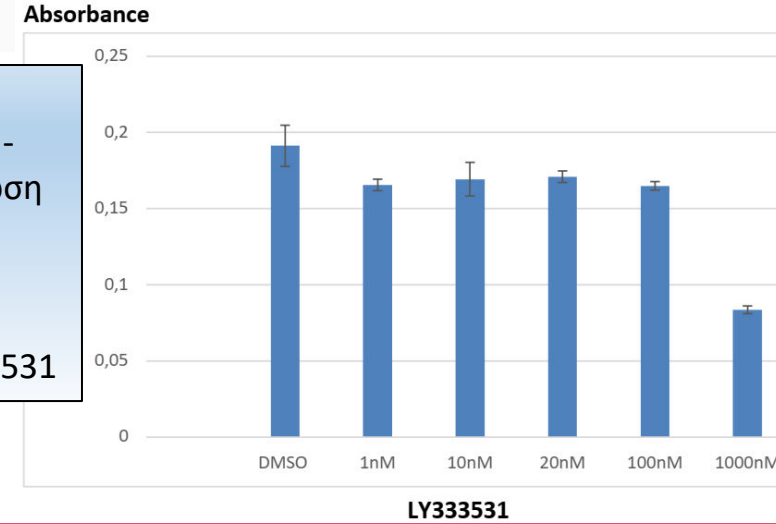
Ως επιβεβαίωση των προηγούμενων ευρημάτων, σε πειράματα με Western blot, αναδείξαμε ότι η πυρηνική εντόπιση και η φωσφορυλίωση της PKCβII αναστέλλονται με επώαση των MCC-1 κυττάρων με τον εξειδικευμένο αναστολέα LY333531 (Εικόνα 5).

Δεδομένης της απουσίας βιβλιογραφικών δεδομένων για τον ρόλο της PKCβII στην βιολογία των κυττάρων του καρκινώματος Merkel, και έχοντας περιγραφεί σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς ότι η PKCβII εμπλέκεται τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, προέβημεν σε ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ που επάγει η PKCβII στα MCC-1 κύτταρα με global RNA sequencing. Περισσότερα από 5.000 διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια ταυτοποιήθηκαν συνεπεία ενεργοποίησης της PKCβII με PMA.

Η ανάλυση και ταξινόμηση αυτών των γονιδίων σε εμπλουτισμένα οντολογικά συμπλέγματα ανέδειξε ποικίλα ρυθμιζόμενα μονοπάτια κεντρικής σημασίας, συμπεριλαμβανόμενων αυτών του κυτταροσκελετού, της απάντησης στο κυτταρικό stress, της απάντησης στη βλάβη του DNA, και της κυτταρικής διαίρεσης (Εικόνα 6).

Λειτουργική μελέτη αναστολής της PKC ανέδειξε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MCC-1 κυττάρων (Εικ. 7).

Εικόνα 7. MTT Assay. Δοσο-εξαρτώμενη μείωση της αύξησης των MCC-1 κυττάρων από τον PKCβII αναστολέα LY333531



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει τη σημαντική ρυθμιστική δράση της PKCβII στο καρκίνωμα των κυττάρων Merkel. Η αντιαιζητική δράση αναστολέων της PKCβII, προτάσσει την PKCβII ως στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης στο καρκίνωμα των κυττάρων Merkel, δεδομένης και της κλινικής δοκιμής των PKCβII αναστολέων σε άλλες παθήσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Parker PJ. 2004. PKC at a glance. Journal of Cell Science. 117(2):131-132.
2. Isakov N. 2018. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. Semin Cancer Biol 48:36-52.

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η μελέτη χρηματοδοτείται εν μέρει από ανταγωνιστικό πρόγραμμα Μεγάλου Μεγέθους του Επιτροπής Ερευνών του Πανεπιστημίου Κρήτης (KA10385).