



CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ODDZIAŁ W GLIWICACH

Wojciech Piętowski

**Zbadanie ekspresji i wewnątrzkomórkowej
lokalizacji wysoce swoistego dla spermatogenezy
białka HSPA2 w komórkach nowotworowych**

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Zdzisław Krawczyk

Gliwice, 2015

Streszczenie

Białko HSPA2 należy do rodziny białek szoku cieplnego HSPA (HSP70). Białka te pełnią funkcje opiekuńcze w stosunku do innych białek, uczestnicząc w procesie ich poprawnego fałdowania. Dobrze poznaną właściwością biologiczną HSPA jest ochrona komórki przed stresem proteotoksycznym indukowanym czynnikami wpływającymi uszkadzająco na stabilność i prawidłową konformację białek istotnych dla przeżycia. Geny *HSPA* różnią się wzorem ekspresji, a kodowane przez nie białka lokalizują się w różnych kompartmentach komórki. Zmiany aktywności *HSPA* mają wpływ na przebieg szlaków sygnałowych sprzyjając proliferacji i przeżyciu, ale także modulują proces apoptozy, autofagii i śmierci mitotycznej komórek. Liczne dane wskazują, że zmiany poziomu białek HSPA mogą istotnie wpływać na fenotyp komórek nowotworowych.

Gen *HSPA2* sklonowano stosunkowo dawno (Bonnycastle i wsp., 1994), jednak nadal pozostaje on jednym z najsłabiej scharakteryzowanych genów *HSPA*. Początkowo ludzkie białko HSPA2 wiązano, podobnie jak białka HSPA2 myszy i szczura, wyłącznie z procesem spermatogenezy. Bodźcem do rozpoczęcia badań skierowanych na poznanie potencjalnego udziału HSPA2 w innych procesach było wykazanie, że gen *HSPA2* jest aktywny w komórkach nowotworowych. Obecnie wiadomo, że białko HSPA2 jest syntetyzowane w prawidłowych komórkach somatycznych, a także w nowotworach pierwotnych u ludzi. W momencie podejmowania badań, których wyniki przedstawione są w pracy doktorskiej, wzór ekspresji *HSPA2* oraz funkcje kodowanego białka w komórkach nowotworowych i somatycznych były nieznane.

Istotnym etapem funkcjonalnego charakteryzowania białek HSP jest ustalenie ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i pod wpływem molekularnych stresorów. Podstawowym celem pracy doktorskiej było ustalenie lokalizacji HSPA2 w komórkach nowotworowych, a następnie zbadanie wpływu szoku termicznego na jego dystrybucję wewnątrzkomórkową. W badaniach wstępnych, posługując się metodą *5'RLM-RACE PCR* ustaliłem strukturę regionu *5'UTR* genu *HSPA2* oraz wykazałem, że w komórkach męskiej linii germinacyjnej i komórkach nowotworowych syntetyzowany jest transkrypt *HSPA2* o takiej samej strukturze. Następnie oznaczyłem poziom transkryptów *HSPA2* w modelowych liniach komórkowych metodą *qRealTimePCR*. Najwyższą aktywność transkrypcyjną gen *HSPA2* wykazywał w linii A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc). Istotny etap realizacji pracy obejmował otrzymanie swoistego przeciwciała anti-HSPA2 przydatnego do wykrywania ludzkiego białka HSPA2, zarówno metodą *Western blot*, jak i metodami immunohistochemicznymi. Ze względu na wysoką homologię sekwencji aminokwasowej białek należących do rodziny HSPA (HSPA2 - HSPA1 83,6%, HSPA2 - HSPA8 86,2% wspólnych aminokwasów), warunkiem koniecznym było uzyskanie przeciwciała niereagującego krzyżowo z innymi białkami rodziny HSPA. Wybór odpowiedniej

sekwencji aminokwasowej peptydu do immunizacji królików oraz optymalizacja metody oczyszczania króliczej poliklonalnej surowicy pozwoliły na uzyskanie unikalnego immunoreagentu anty-HSPA2. Z użyciem oczyszczonej monoswoistej króliczej surowicy anty-HSPA2, w modelowych liniach komórkowych oznaczyłem poziom białka HSPA2. Najwyższy poziom HSPA2 obserwowałem w linii A549, natomiast w komórkach HepG2 i U-2 OS nie stwierdziłem obecności badanego białka.

Kolejnym etapem badań było skonstruowanie wektorów ekspresyjnych, kodujących białko HSPA2, lub białka fuzyjne HSPA2-GFP i RFP-HSPA2, których wprowadzenie do modelowych linii komórkowych umożliwiło realizację głównego celu pracy, jakim było ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji HSPA2 w komórkach nowotworowych. Zastosowanie wektorów, jak również techniki immunofluorescencji z użyciem swoistego immunoreagentu anty-HSPA2 pozwoliło na ustalenie wewnątrzkomórkowej dystrybucji białka HSPA2, zarówno w temperaturze fizjologicznej, jak i w warunkach szoku termicznego. Na podstawie przeprowadzonych badań ustaliłem, że białko HSPA2 w standardowych warunkach hodowlanych wykazuje lokalizację cytoplazmatyczno-jądrową. W komórkach poddanych działaniu szoku termicznego obserwowałem translokację białka HSPA2 do jądra i jąderek komórek nowotworowych, ponadto zaobserwowałem akumulację badanego białka w centrosomach komórek interfazowych, jak również mitotycznych.

Aby wyjaśnić, czy białko HSPA2, podobnie jak HSPA1, wykazuje uniwersalne właściwości cytoprotekcyjne, a mianowicie chroni komórki przed skutkami szoku cieplnego oraz stresu proteotoksycznego, badałem w teście klonogennym potencjał proliferacyjny komórek poddanych działaniu stresorów. Do badań wybrałem linię komórkową V79 (chemiczne fibroblasty) nie syntetyzującą endogennych białek HSPA1 i HSPA2 w standardowych warunkach hodowlanych. Komórki V79 zmodyfikowałem wprowadzając do nich (metodą transdukcji retrowirusowej) sekwencję kodującą ludzkie białko HSPA2. Wykazałem, że białko HSPA2 chroni komórki V79 przed negatywnymi skutkami działania szoku termicznego i inhibitora proteasomu MG132.

W prezentowanej pracy doktorskiej wykazałem, że białko HSPA2 kodowane przez gen, którego aktywność początkowo wiązano ze spermatogenezą, jest aktywny w niektórych rodzajach prawidłowych komórek somatycznych oraz komórkach nowotworowych, ma cechy wspólne z białkiem kodowanym przez główny gen szoku cieplnego *HSPA1*. Konieczne są dalsze badania, aby wyjaśnić jak dalece funkcje białek HSPA2 i HSPA1 są podobne i czy HSPA2 pełni istotną rolę w komórkach nowotworowych. Wiadomo obecnie, że geny *HSPA1* i *HSPA2* mogą w nowotworach ulegać ekspresji równocześnie bądź rozłącznie. Dlatego też badania mające na celu poszukiwanie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji *HSPA1* / *HSPA2* i cechami klinicznymi nowotworów powinny uwzględniać ekspresję obu tych genów.