

Αποκρυπτογραφώντας το Ανθρώπινο Λειτουργικό Κίνωμα: μία Καινοτομία του ΕΚΠΑ στον Ευρωπαϊκό Ακαδημαϊκό Ιστό

ΕΚΠΑ: Ενεργότητες Κινασών Πρωτεϊνών του Ανθρώπου

**Αθανάσιος Δ. Βελέντζας¹ BSc, PhD – Σταματία Α. Καταραχιά¹ BSc, MSc –
Savithri Rangarajan² BSc, PhD, MBA – Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης¹ BSc, MSc, PhD**

¹Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Πανεπιστημιόπολη, Ζωγράφου 15772, Αττική, Ελλάδα

(tveletz@biol.uoa.gr, skatarachia@biol.uoa.gr, dstravop@biol.uoa.gr)

²PamGene International B.V., Wolvenhoek 10, 5211 HH 's-Hertogenbosch, The Netherlands
(srangarajan@pamgene.com)

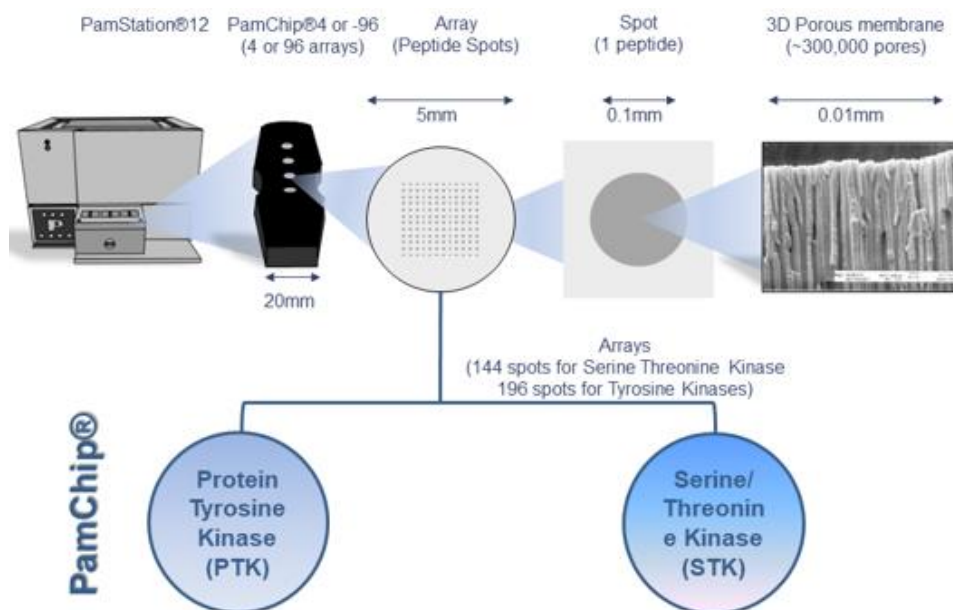
Στο πλαίσιο αναβάθμισης των ερευνητικών και εκπαιδευτικών υποδομών του ΕΚΠΑ και μέσω του Προγράμματος Δημοσίων Επενδύσεων (ΠΔΕ) – 2021, υπό των επίβλεψη και διαχειριστική εποπτεία των κ.κ. Καθηγητών Μελέτιου-Αθανάσιου Κ. Δημόπουλου, Πρύτανη ΕΚΠΑ, και Νικόλαου Θωμαΐδη, προκηρύχθηκε, διενεργήθηκε και ολοκληρώθηκε εύρυθμα και επιτυχώς Διεθνής διαγωνισμός, με Α.Μ.: «11296» και τίτλο: «Προμήθεια Επιστημονικού Εξοπλισμού για το ΕΚΠΑ», αποτέλεσμα του οποίου ήταν η εκ μέρους του ΕΚΠΑ αγορά, προμήθεια και δέση σε πλήρη λειτουργία του «Τμήματος 22» σχετικού εξοπλισμού, ο οποίος περιγράφεται στο εν λόγω έργο ως «Ολοκληρωμένη Διάταξη Ανίχνευσης, Απεικόνισης και Επεξεργασίας Ενεργότητας Κινασών μέσω Μικρο-συστοιχίας Ομοειδών Υποστρωμάτων-Στόχων (Kinase-Activity Micro-Array Device: KAMAD)» [χρηματική αξία (συμπεριλαμβανομένου ΦΠΑ): 248.868,00 €]. Δεδομένης της ελεύθερης πρόσβασης της στο παρόν αναλυόμενης καινοτόμου τεχνολογίας από όλα τα ενδιαφερόμενα μέλη και στελέχη του, το ΕΚΠΑ φιλοδοξεί να λειτουργήσει ως ένας εστιακός πόλος και κεντρικός κόμβος προσέλκυσης και ανάπτυξης τεχνολογικών συνεργασιών και θεματικών δικτύων τόσο σε Ελληνικό όσο και σε Διεθνές επίπεδο

Η **φωσφορυλίωση** συνιστά μία θεμελιώδους σημασίας μετα-μεταφραστική τροποποίηση (κυρίως) πρωτεϊνών ενός τυπικού ευκαρυωτικού κυττάρου. Ο ελεγχόμενος σχηματισμός φωσφο-εστερικού δεσμού με κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης (Y) ή/και σερίνης/θρεονίνης (S/T) έχει ως αποτέλεσμα, επί της πρωτεΐνης-στόχου, την εν δυνάμει αλλαγή: (α) στερεο-διαμόρφωσης, (β) ενεργότητας, (γ) ενδοκυτταρικής διαμερισματοποίησης, (δ) συμπλοκοποίησης – δια-μοριακής αλληλεπίδρασης, (ε) δομικής σταθερότητας – χρόνου (ημι-)ζωής και (στ) επιπέδου στοχαστικότητας – σηματοδοτικού θορύβου. Τα ένζυμα που αναγνωρίζουν και φωσφορυλιώνουν, με κατανάλωση ATP, υποστρώματα-στόχους ονομάζονται **κινάσες**, ενώ τα αντίστοιχα που απο-φωσφορυλιώνουν καλούνται **φωσφατάσες**. Η ειδικότητα

(απο-)φωσφορυλίωσης, η συγγένεια σύνδεσης με το υπόστρωμα, η εξάρτηση από την τοπική συγκέντρωση **ATP**, η ταχύτητα (απο-)φωσφορυλίωσης στόχου, ο βαθμός ανθεκτικότητας σε συνθήκες αναστολής λειτουργίας και ο θετικός/αρνητικός βρόχος ανατροφοδότησης σήματος συνιστούν καθοριστικές παραμέτρους διαμόρφωσης του σηματοδοτικού φορτίου μοριακών δικτύων ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης, μετακίνησης, αύξησης, μεταβολισμού, (νεοπλασματικού) μετασχηματισμού, γήρανσης και (προγραμματισμένου) θανάτου.

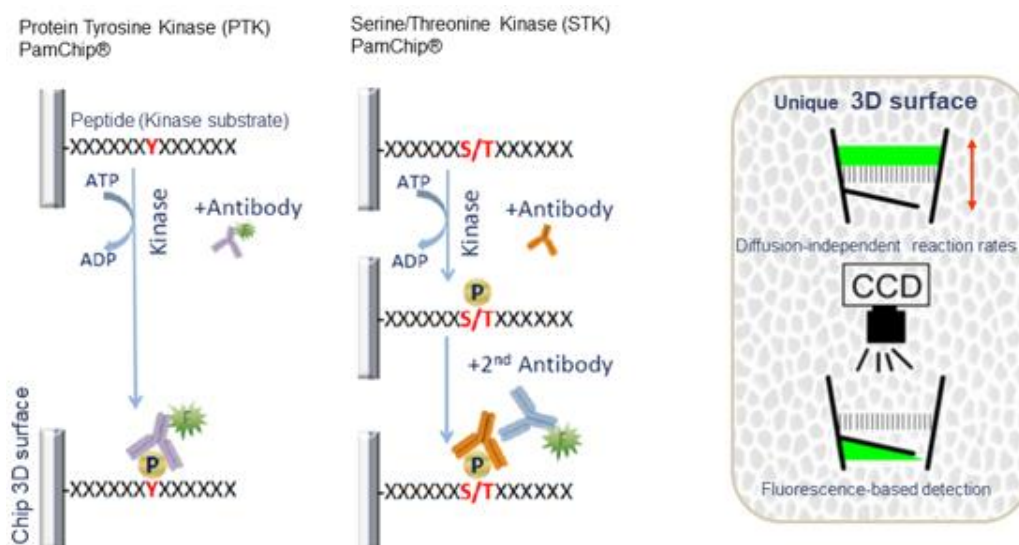
Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον ανάμεσα σε ακαδημαϊκούς, ερευνητές και κλινικούς για την αξία της μελέτης της κυτταρικής φυσιολογίας και παθολογίας σε επίπεδο ενεργότητας κινασών, το σύνολο των οποίων συγκροτεί το **λειτουργικό κίνωμα (functional kinome)**, και όχι μόνο της έκφρασης ή/και χαρτογράφησης μεταλλαγών επιλεγμένων μελών αυτών, σηματοδοτεί την απαρχή μίας νέας εποχής, κατά την οποία η αποκρυπτογράφηση του λειτουργικού κινώματος θα οδηγήσει στην ταυτοποίηση μίας νέας γενεάς βιοδεικτών με υψηλή προγνωστική, διαγνωστική και θεραπευτική αξία στην ανθρώπινη παθολογία, ενώ συγχρόνως θα αποκαλύψει νέους κρίσιμους μοριακούς στόχους για την επιτυχή κλινική διαχείριση ασθενειών μέσω της χρήσης καινοτόμων και στοχευμένων κοκτέιλ επιλεγμένων αναστολέων κινασών (Y ή/και S/T).

Στην κατεύθυνση αυτή, η Ολλανδική εταιρεία PamGene International B.V. ανέπτυξε το μοναδικό παγκοσμίως σύστημα **PamChip**, το οποίο βασίζεται στην τοποειδικά ελεγχόμενη ακινητοποίηση πεπτιδίων-στόχων πλήθους διαφορετικών πρωτεϊνικών κινασών (Y ή S/T) σε επιφάνειες ενεργοποιημένου οξειδίου του αλουμινίου, δημιουργώντας Y- και S/T-ειδικές τρισδιάστατες μικρο-συστοιχίες (**microarrays**). Η τροφοδότηση του κυτταρικού εκχυλίσματος προς το PamChip microarray επιτρέπει στην εκάστοτε κινάση να φωσφορυλιώνει ειδικά το/α ομοειδές/ή της πεπτίδιο/α-στόχο/ους (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PamChip τεχνολογίας.

Οι πολλαπλοί κύκλοι τροφοδότησης του δείγματος διασφαλίζουν την ισχυρή, αλλά και εκλεκτική, φωσφορυλίωση των ομοειδών για την εκάστοτε κινάση ακινητοποιημένων **πεπτιδίων-στόχων** της, γεγονός που μπορεί να παρακολουθηθεί και να ποσοτικοποιηθεί σε πραγματικό χρόνο, δια μέσου της χρήσης συζευγμένων με φθοριζοφόρα μόρια (**FITC**) ειδικών αντισωμάτων που συνδέονται εκλεκτικά σε αμινοξικά κατάλοιπα φωσφορυλιωμένης τυροσίνης (**p-Y**) ή φωσφορυλιωμένης σερίνης/θρεονίνης (**p-S/T**), με τα γεγονότα φωσφορυλίωσης ανά υπόστρωμα κινάσης (πεπτίδιο) να αποτυπώνονται ηλεκτρονικά από CCD κάμερα πολύ υψηλής ανάλυσης και να επεξεργάζονται βιοπληροφορικά από εξαιρετικά πολύπλοκους και προηγμένους αλγόριθμους του **BioNavigator** λογισμικού πακέτου (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Σχεδιαγραμματική περιγραφή του μηχανισμού φωσφορυλίωσης ακινητοποιημένου επί PamChip πεπτιδίου-στόχου από πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης (PTK) ή σερίνης/θρεονίνης (STK), και οπτικοποίηση του λαμβανόμενου σήματος εκπέμποντος φθορισμού.

Ανερχόμενου ενδιαφέροντος περιοχές εφαρμογής της σύγχρονης και επαναστατικής τεχνολογίας **PamGene** είναι η μοριακή ογκολογία, αιματολογία, νευροβιολογία, καρδιαγγειακή βιολογία, μυοσκελετική βιολογία, ανοσοβιολογία, αναπτυξιακή βιολογία και βιολογία βλαστικών κυττάρων. Η δυνατότητα φωσφορυλίωσης **196** πεπτιδίων από πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης και **144** πεπτιδίων από πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης επιτρέπουν τη(ν): •Μηχανιστική ανάλυση (πολύπλοκων) σηματοδοτικών δικτύων κυτταρικής παθοφυσιολογίας, •Ανίχνευση νέων μοριακών στόχων ρύθμισης της **λειτουργίας** του **κινώματος**, •Αποκάλυψη του τρόπου δράσης ενώσεων με θεραπευτική αξία, •Κατανόηση της διασταυρούμενης επικοινωνίας (cross-talk) σηματοδοτικών μονοπατιών του δικτύου ανθρώπινων ασθενειών, •Ταυτοποίηση βιοδεικτών με προεξέχουσα προγνωστική, διαγνωστική και θεραπευτική δυναμική, •Ανάπτυξη νέων και υποσχόμενων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων

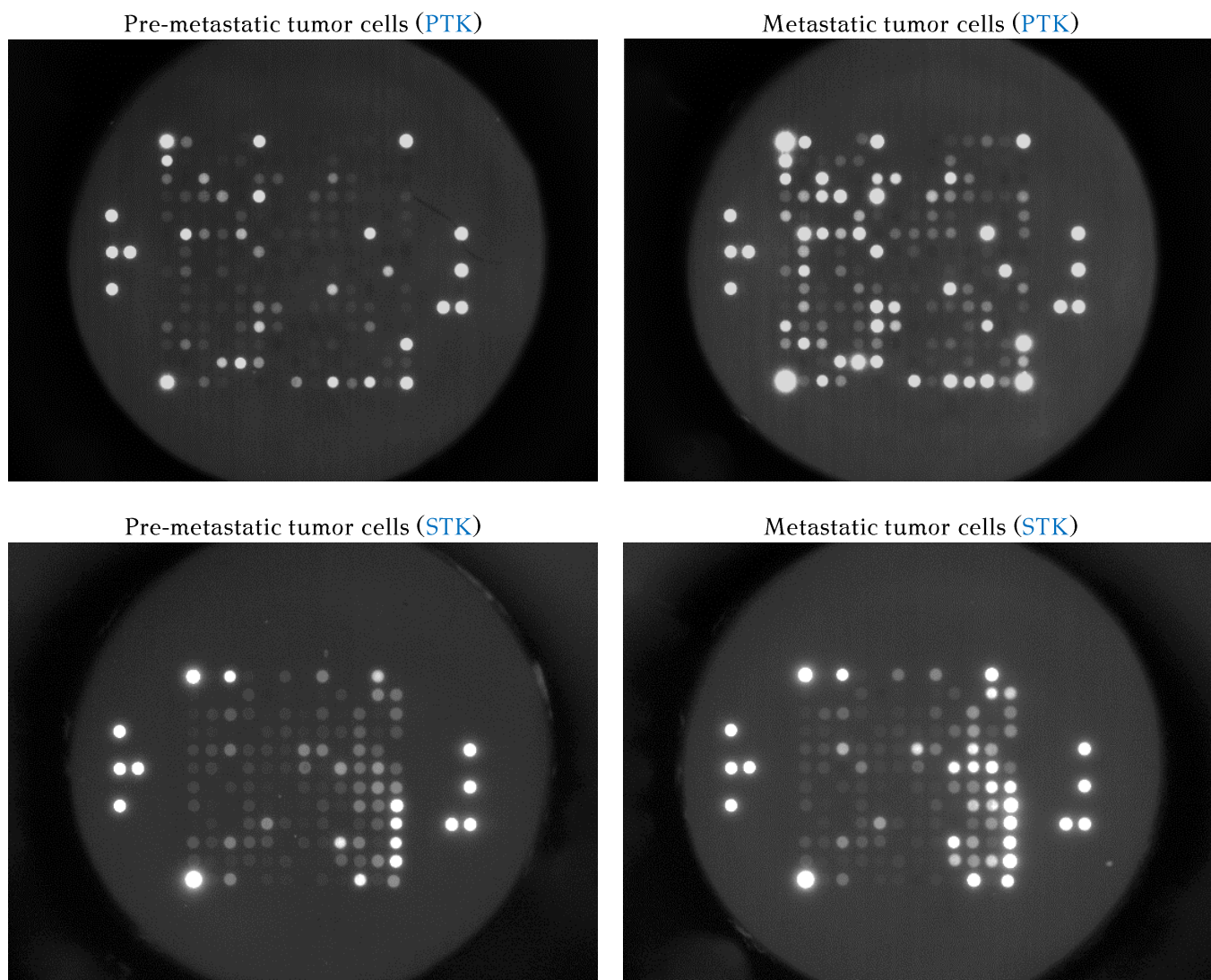
([kinase-inhibitor cocktails](#)) για τον ανθρώπινο καρκίνο (και άλλες νόσους),
•Εφαρμογή της ιατρικής ακριβείας (precision medicine) βασισμένη στη λειτουργική κιν(ασ)ωμική ([functional kinomics](#)).

Ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων ανέρχεται σε **10.000 - 50.000** ανά συστοιχία, ενώ η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης από **0,5 - 5,0 μg**, με την πηγή προέλευσης του προς εξέταση βιολογικού υλικού να κατηγοριοποιείται ως ακολούθως:
•Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες, •Καρκινικά κύτταρα – καρκινικές κυτταρικές σειρές (προσκόλλησης ή εναιώρησης) (**Εικόνες 4-6**), •Κύτταρα αίματος, μυελού των οστών και αιμοπετάλια, •Πρωτογενείς βιοψίες/τομές, •Ιστοί [υγιείς/παθολογικοί (καρκινικοί)], •Ανασυνδυασμένες (καθαρισμένες) πρωτεΐνες (**Εικόνα Παραρτήματος**), •Οργανισμοί μοντέλα (Mouse – *Xenopus* – Zebrafish – *Drosophila* – *Caenorhabditis* – *Arabidopsis* – *Saccharomyces* – *Aspergillus*).

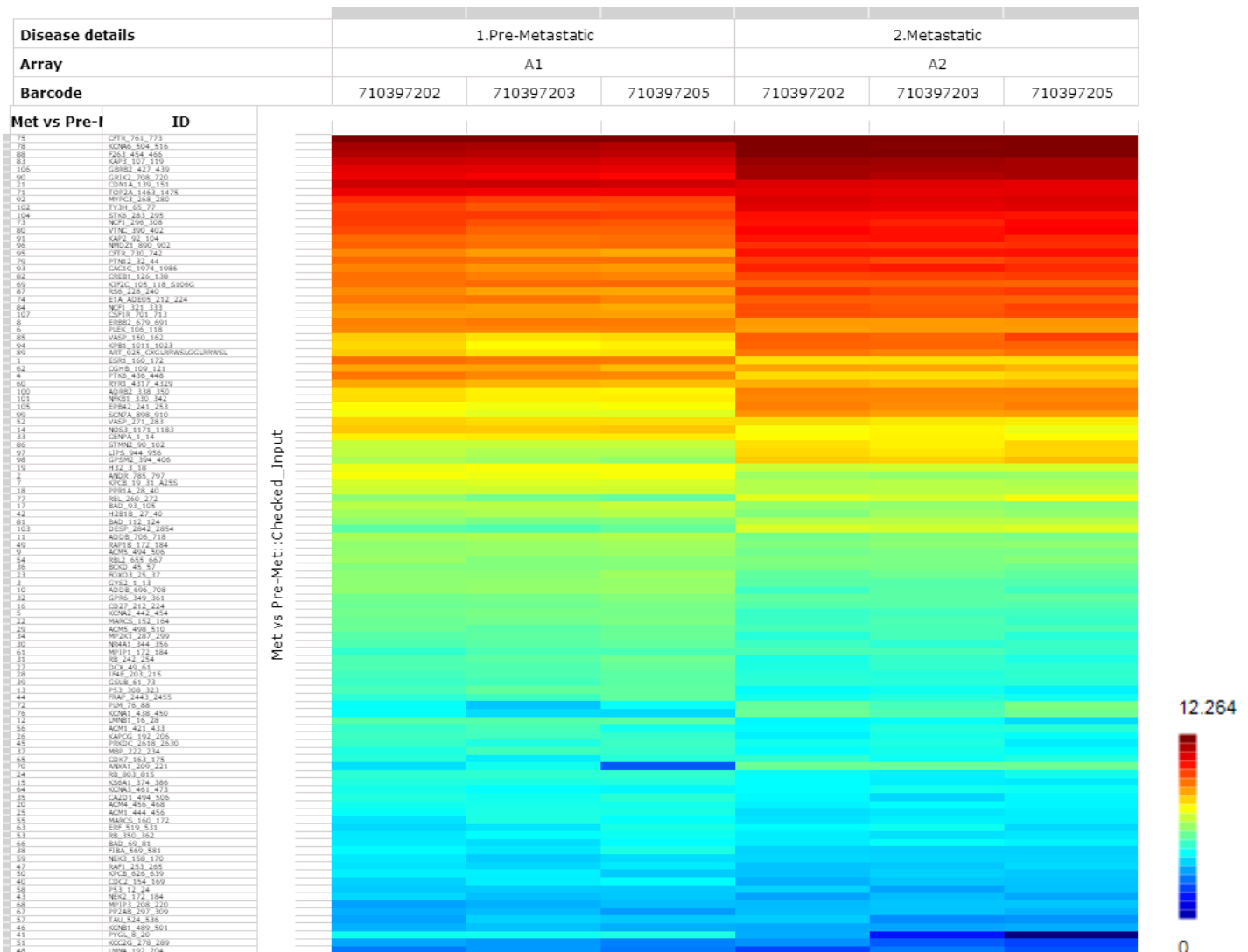
Τα παγκοσμίως μοναδικά τεχνικά χαρακτηριστικά της PamGene τεχνολογίας επιτρέπουν, σε σχέση με την ενεργότητα κινάσης τη(ν)/το: •Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών μελών της οικογένειας κινασών, τόσο τυροσίνης όσο και σερίνης/θρεονίνης (Y και S/T) ([pharmacology on chip](#)) (**Εικόνες 3-5**), •Ελλειψη ανάγκης για γνώση δράσης και συμμετοχής στην παθολογία της εκάστοτε κινάσης, •Υψηλή ευαισθησία, •Μεγάλη ταχύτητα, •Απεικόνιση ενζυμικής κινητικής σε πραγματικό χρόνο, •Βιοπληροφορική επεξεργασία δεδομένων από προηγμένα λογισμικά της μητρικής εταιρείας (BioNavigator) (**Εικόνες 4-6**), •Χαμηλό κόστος, •Ευκολία χρήσης, •Παροχή (συνεχούς) τεχνικής υποστήριξης από τη μητρική εταιρεία.

Η καθολική υιοθέτηση και ομαλή εισαγωγή της PamGene καινοτόμου και πρωτοποριακής τεχνολογίας από τον ερευνητικό ιστό των μελών του ΕΚΠΑ, όπως αυτές διασφαλίζονται από την πρόσφατη αγορά και προμήθεια της [PamStation®-12 – BioNavigator](#) πλατφόρμας, μέσω της επιτυχούς υλοποίησης του Προγράμματος Δημοσίων Επενδύσεων ([ΠΔΕ](#)) – 2021, αναμένεται να αναβαθμίσουν καθοριστικά την επιστημονική αξία των παραγόμενων δημοσιεύσεων σε Διεθνή περιοδικά, αλλά και το εκπαιδευτικό επίπεδο μετάδοσης γνώσης σε τεχνολογίες αιχμής, για όλους(ες) τους(ις) φοιτητές(τριες) και των τριών ακαδημαϊκών βαθμίδων (προπτυχιακό, μεταπτυχιακό και διδακτορικό), αλλά και μετα-διδάκτορες, καθώς και μέλη ΔΕΠ/ΕΔΙΠ.

Ως ένα ισχυρό και πολυδιάστατο εργαλείο ελεύθερης πρόσβασης από όλα τα μέλη και στελέχη του ΕΚΠΑ, εξαιρετικά σχεδιασμένο για τη συστημική χαρτογράφηση και αποκωδικοποίηση του λειτουργικού κινώματος στη βιολογική ανάπτυξη, αύξηση, φυσιολογία και παθολογία, η [PamGene/PamStation®-12/PamChip/BioNavigator](#) ολοκληρωμένη πλατφόρμα θα καταστήσει τις ομάδες που την χρησιμοποιούν ιδιαίτερα ανταγωνιστικές στην επιτυχή διεκδίκηση Εθνικών και Ευρωπαϊκών προγραμμάτων, ενώ θα τους προσδώσει, ενδεχομένως, και ανταποδοτικά οφέλη, αν και εφόσον αυτό επιτραπεί από το θεσμικό πλαίσιο διαχείρισης που θα εφαρμόσει σχετικά το ΕΚΠΑ (ίδρυση τεχνοβλαστών – [spin offs](#)).



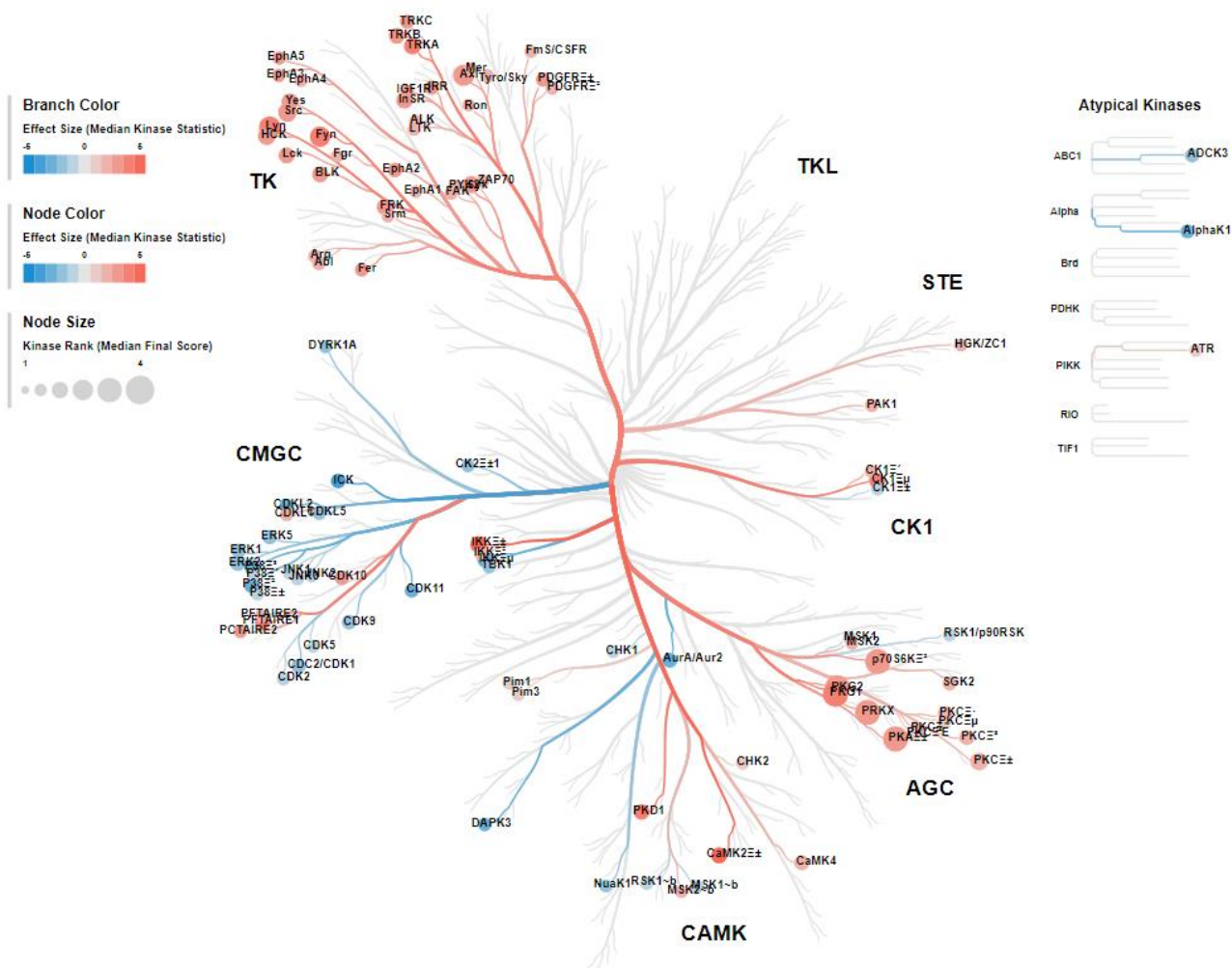
Εικόνα 3. Ανίχνευση γεγονότων φωσφορυλίωσης πεπτιδίων-στόχων (ακινητοποιημένων επί PamChip συστοιχίας), από μέλη των PTK ή των STK πρωτεϊνικών υποοικογενειών, τόσο σε προ-μεταστατικά όσο και σε μεταστατικά κύτταρα συμπαγών όγκων του ίδιου ασθενούς (ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων μέσω τεχνολογίας NanoDrop)
(Velentzas *et al.*, 2022, unpublished data).



Εικόνα 4. Θερμογραφικοί χάρτες (heat-maps) του διαφορικού προφίλ φωσφορυλίωσης πεπτιδίου-στόχου από μέλη της STK πρωτεϊνικής υπο-οικογένειας, τόσο σε προ-μεταστατικά όσο και σε μεταστατικά κύτταρα συμπαγών όγκων του ίδιου ασθενούς (Velentzas *et al.*, 2022, unpublished data).

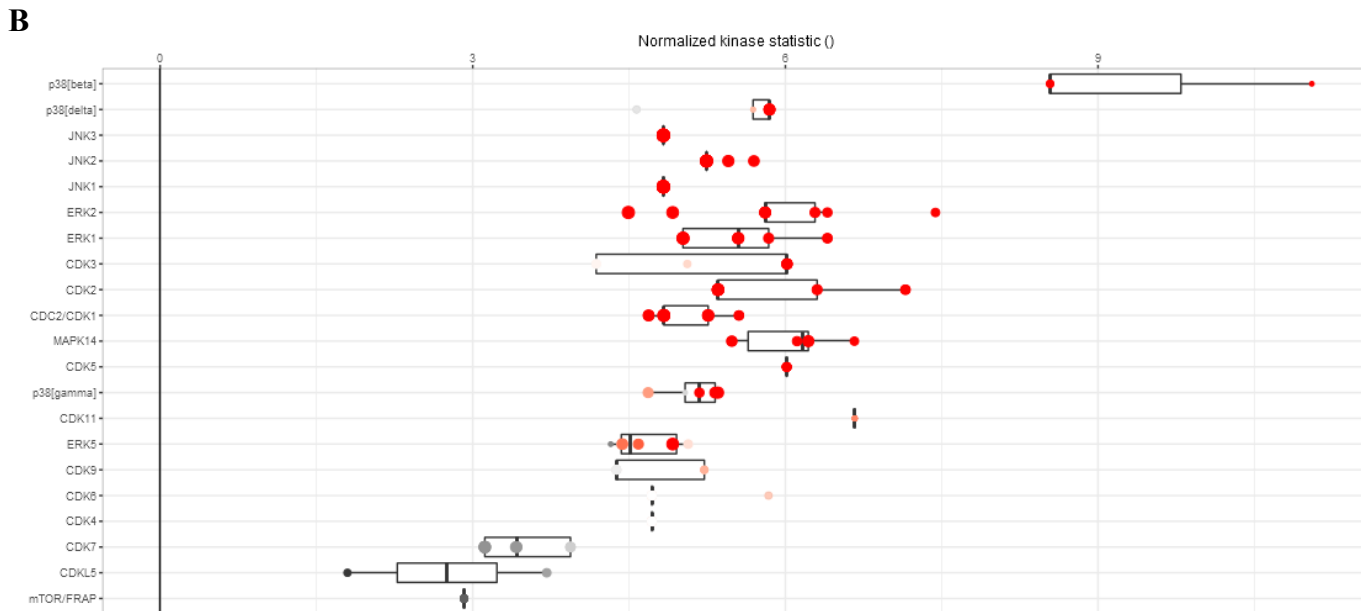
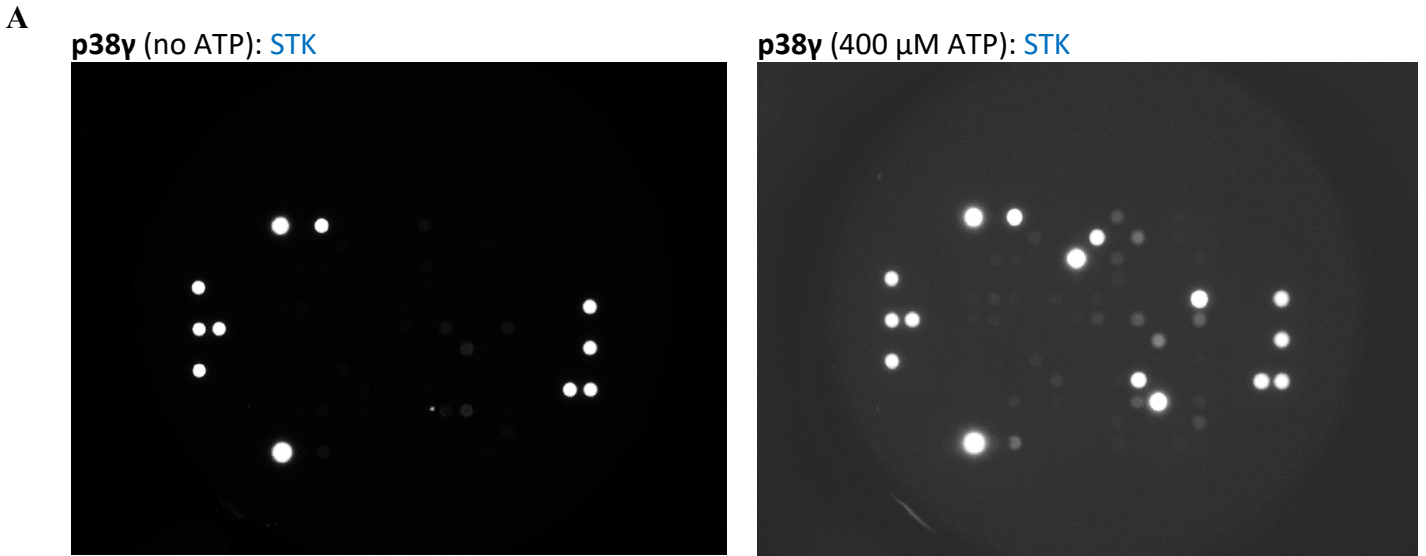


Εικόνα 5. Κανονικοποιημένη (normalized) στατιστική ανάλυση μελών της STK πρωτεϊνικής υπο-οικογένειας, με αυξορυθμιζόμενες ή μειορυθμιζόμενες ενζυμικές ενεργότητες φωσφορυλίωσης πεπτιδίου-στόχου, σε δέση σερίνης/θρεονίνης (p-S/T), τόσο σε προ-μεταστατικά όσο και σε μεταστατικά κύτταρα συμπαγών όγκων του ίδιου ασθενούς, χρησιμοποιώντας τα προ-μεταστατικά κύτταρα ως συνθήκη αναφοράς (reference - control) (Velentzas *et al.*, 2022, unpublished data).



Εικόνα 6. Δενδρόγραμμα (PTK και STK) κινασών (kinase tree) με (ισχυρά) αυξορυθμιζόμενες (κόκκινο) ή μειορυθμιζόμενες (μπλε) ενεργότητες φωσφορυλίωσης πεπτιδίου-στόχου, τόσο σε προ-μεταστατικά όσο και σε μεταστατικά κύτταρα συμπαγών όγκων του ίδιου ασθενούς, χρησιμοποιώντας τα προ-μεταστατικά κύτταρα ως συνθήκη αναφοράς (reference - control) (Velentzas *et al.*, 2022, unpublished data).

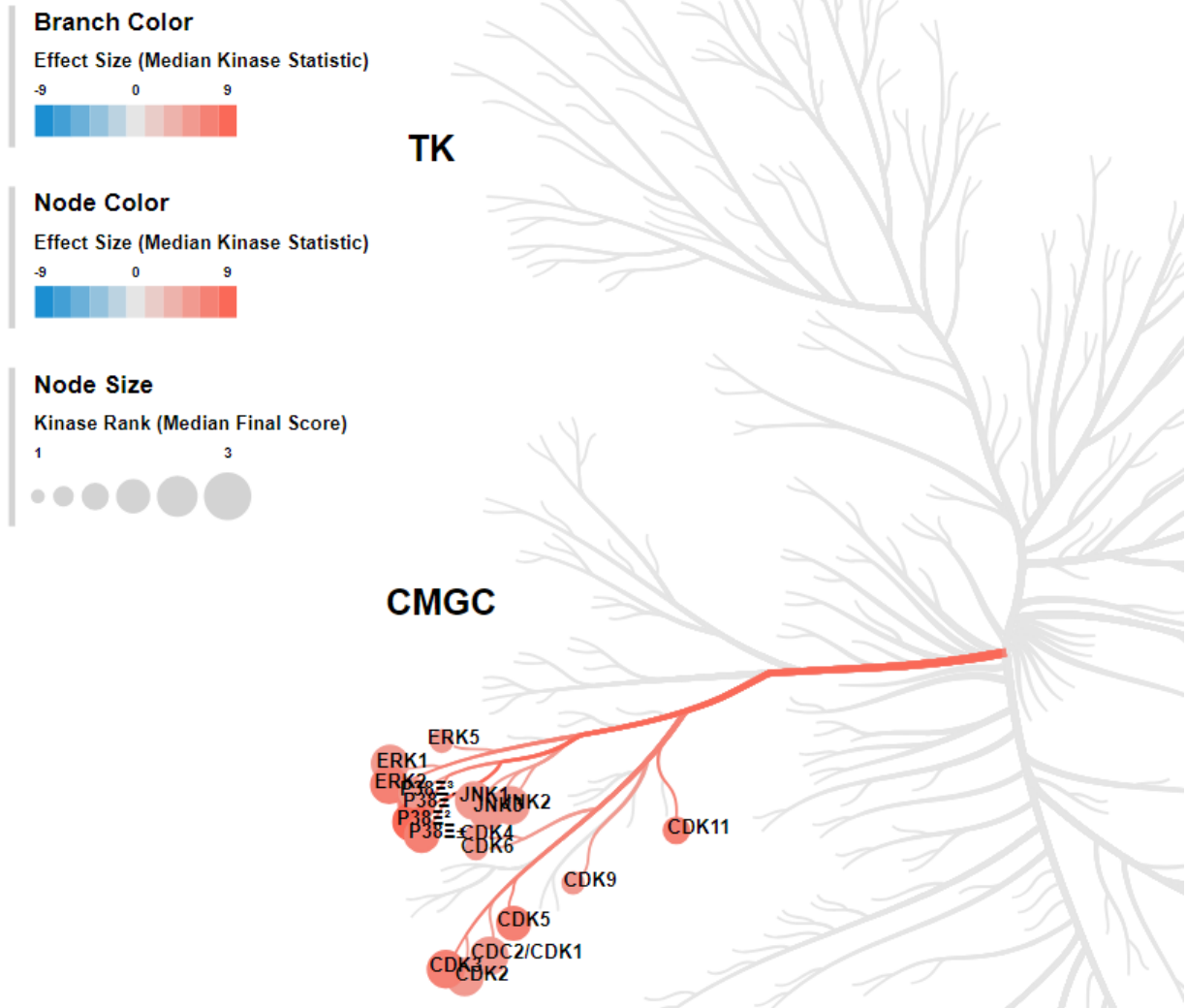
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Γ

S100ord	Uniprot Accession	ID	mean	stdev	
1	P20700	LMNB1_16_28	20598.867	1337.777222	100.0
2	P03255	E1A_ADE05_212_224	18187.887	864.5090942	88.3
3	Q01406	SRC8_CHICK_423_435	9328.7051	572.7516479	45.3
4	Q04725	TLE2_246_258	5747.8628	263.6461182	27.9
5	P01106	MYC_51_63	5175.4814	293.6777954	25.1
6	P38936	CDN1A_139_151	1955.9491	376.4611511	9.5
7	Q08999	RBL2_655_667	723.44647	67.85836029	3.5
8	P03372	ESR1_160_172	425.01886	34.05516815	2.1
9	Q13522	PPR1A_28_40	268.05032	78.46713257	1.3
10	P50552	VASP_271_283	231.05659	47.71951294	1.1
11	P11388	TOP2A_1463_1475	170.16353	22.63027763	0.8
12	P17658	KCNA6_504_516	158.55348	21.65597916	0.8
13	P29474	NOS3_1171_1183	158.55345	25.09639168	0.8
14	P08567	PLEK_106_118	146.76729	12.37138939	0.7
15	Q99661	KIF2C_105_118_S106G	126.75472	13.34159565	0.6
16	P06400	RB_774_786	100.54089	14.8513155	0.5
17	Q92934	BAD_93_105	88.817612	10.97317219	0.4
18	P06400	RB_803_815	87.522018	9.521509171	0.4
19	P16389	KCNA2_442_454	86.930817	6.102527142	0.4
20	O14874	BCKD_45_57	82.389938	4.69084549	0.4

Δ



Εικόνα Παραρτήματος.

Οπτικοποίηση ενζυμικής λειτουργίας (A), κανονικοποιημένη στατιστική επεξεργασία ενεργότητας κινάσης (B), φωσφορυλιωμένα πεπτίδια-στόχοι (Γ) και δενδρόγραμμα (STK) κινασών (Δ) της ανασυνδυασμένης (recombinant) και καθαρισμένης (STK) κινάσης p38γ (p38 gamma), απουσία και παρουσία (400 μM) ATP (A) (Velentzas *et al.*, 2022, unpublished data).