



**ΕΛΙΔΕΚ.**  
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

**Περιγραφή Χρηματοδοτούμενου Ερευνητικού Έργου**  
**1η Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την**  
**ενίσχυση των Μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την**  
**προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας**

**Τίτλος Ερευνητικού Έργου:** Μελέτη αλληλεπιδράσεων ακόρεστων λιπαρών οξέων με την αλβουμίνη ορού και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 με έμφαση στη χρήση μεθοδολογιών NMR κυτταρικού επιπέδου (in-cell NMR)

**Επιστημονικός/ή Υπεύθυνος/η:** Ιωάννης Π. Γεροθανάσης

**Φιλικός προς τον αναγνώστη τίτλος:** Lipid in-cell NMR

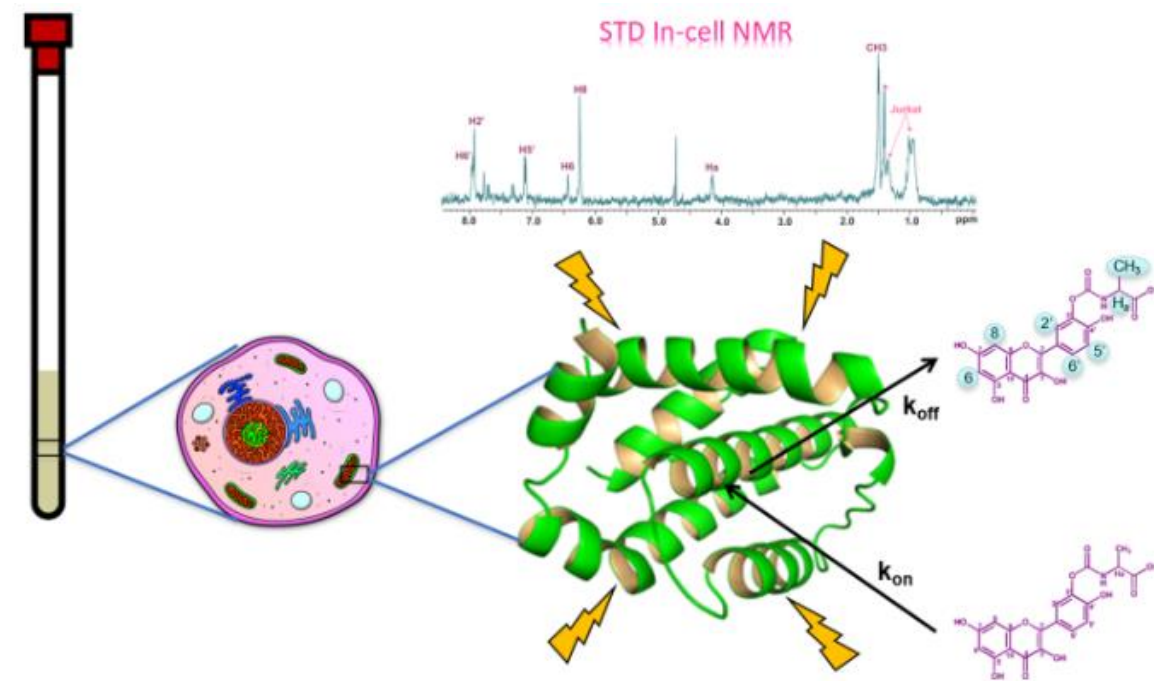
**Επιστημονική Περιοχή:** Φυσικές Επιστήμες

**Φορέας Προέλευσης και Χώρα:** Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ελλάδα

**Φορέας Υποδοχής:** Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Συνεργαζόμενος Φορέας:**

**Ιστοσελίδα προβολής του Έργου (αν υφίσταται):**



**Ποσό Χρηματοδότησης:** 180.000 €

**Διάρκεια Χρηματοδότησης:** 36 μήνες

Τα λιπίδια είναι μια ευρεία και ποικίλη ομάδα βιολογικών μορίων με ποικίλες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες και σημαντικούς ρόλους στη διατροφή και την υγεία. Τα λιπίδια είναι τα κύρια δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, του νευρικού ιστού και δρουν ως σημαντικές πηγές ενέργειας σε μεταβολικές διαδικασίες. Ένας σημαντικός αριθμός ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs), τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία των λιπιδίων, κυκλοφορούν στο πλάσμα των θηλαστικών και έχουν σημαντικούς ρόλους σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-λιπιδίων, σε διαδικασίες σηματοδότησης κυττάρων, μεταβολισμούς ενέργειας και φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Η αντικαρκινική δράση των FFAs έχει αποδοθεί στην ικανότητά τους να προάγουν την απόπτωση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι αντικαρκινικές ιδιότητες των λιπιδίων πρέπει να αποδοθούν στη δομική τους ομοιότητα με ανταγωνιστές της αντι-αποπτωτικής οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που βρίσκουν εφαρμογή προς το παρόν σε κλινικές δοκιμές. Αν και υπάρχει ισχυρή ένδειξη της προ-αποπτωτικής δράσης των FFAs κατά του καρκίνου επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης του Bcl-2, ο ακριβής μηχανισμός αυτής της δραστηριότητας καθώς και της αλληλεπίδρασής τους με την πρωτεΐνη Bcl-2, σε μοριακό επίπεδο, παραμένουν άγνωστες. Οι κύριοι στόχοι και προκλήσεις αυτής της ερευνητικής πρότασης είναι οι εξής:

(Α) Εφαρμογή μεθοδολογιών NMR ταχείας αποσαφήνισης αλληλεπιδράσεων και διαμορφωτικών αλλαγών βιοδραστικών FFAs σε διάλυμα με:

- (i) αλβουμίνη ορού (BSA), η οποία είναι η κύρια πρωτεΐνη για τη μεταφορά των FFAs μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας και
- (ii) με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2.

(Β) Μελέτη δομικών και διαμορφωτικών ιδιοτήτων αλληλεπιδράσεων FFAs με την πρωτεΐνη Bcl-2 στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον ζωντανών ανθρώπινων λευχαιμικών T καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη-στόχο χρησιμοποιώντας σύγχρονες μεθοδολογίες NMR σε κύτταρα. Η μεθοδολογία αυτή πρόσφατα αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας.

(Γ) Διερεύνηση της *in vitro* κυτταροτοξικής δράσης των FFAs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές λευχαιμίας.

Ο χαρακτηρισμός αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-υποκαταστάτη στο φυσικό κυτταρικό περιβάλλον τους θα αποτελούσε σημαντική συμβολή στη βιοργανική χημεία, φαρμακευτική και βιολογική χημεία. Οι τεχνικές STD και TR-NOE NMR βασίζονται στην ταχεία και αποτελεσματική μεταφορά φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης κατάστασης ενός υποκαταστάτη (εύρους συγγένειας mM-μM). Δεδομένου ότι αυτές οι τεχνικές απαιτούν μόνο μικρές ποσότητες υποδοχέα (συγκεντρώσεων  $\mu\text{M}$ -nM), χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-υποκαταστατών. Παρ' όλα αυτά, λόγω του πολύπλοκου δικτύου μακρομοριακών αλληλεπιδράσεων σε κυτταρικό επίπεδο, βιοφυσικές μελέτες με τη χρήση αμιγών πρωτεϊνών σε διάλυμα, συχνά δεν αντανakλούν την πραγματική φύση του κυτταρικού περιβάλλοντος. Τα σημαντικά αυτά μειονεκτήματα μπορούν να παρακαμφθούν με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR σε κυτταρικό επίπεδο, η οποία έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και εστιάζει σε δομικές μελέτες μεταβολιτών μέσα σε ζωντανά κύτταρα. Μία από τις πρόσφατες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR σε κυτταρικό επίπεδο, η οποία έχει εγείρει σημαντικό ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα και στη φαρμακευτική έρευνα διεθνώς, είναι η χρήση της σε μελέτες ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς τα προκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένο εύρος βιολογικών δράσεων και πολλές κυτταρικές διεργασίες που καθορίζουν σημαντικές πτυχές της σύγχρονης βιολογικής έρευνας απουσιάζουν στα βακτήρια. Αυτή η μεθοδολογία θα εφαρμοστεί στην παρούσα ερευνητική πρόταση για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης επιλεγμένων ακόρεστων FFAs είτε απομονωμένων είτε σε μίγματα με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο. Αυτή η πρωτεΐνη έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, κυρίως στη λευχαιμία.



**A. Ταχεία μελέτη βιοδραστικών ακόρεστων λιπιδίων με την πρωτεΐνη ορού (SA) και την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 in vitro.**

Θα διεξαχθεί μελέτη αλληλεπίδρασης βιοενεργών ακόρεστων FFAs με τις μεμονωμένες πρωτεΐνες SA και Bcl-2 σε διάλυμα με στόχο:

(i) Τη διερεύνηση του επίτοπου και της σταθεράς σύζευξης των FFAs με τις ως άνω πρωτεΐνες και

(ii) τον προσδιορισμό της προτιμητέας διαμόρφωσης σε κατάσταση σύμπλεξης.

**B. Μελέτη δομικών ιδιοτήτων αλληλεπιδράσεων FFAs με την πρωτεΐνη στόχο Bcl-2 σε κυτταρικό επίπεδο με τη χρήση μεθοδολογίας NMR κυτταρικού επιπέδου.**

Το θεμελιώδες ερευνητικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί, είναι η διερεύνηση των προτιμητέων διαμορφώσεων ακόρεστων FFAs σε κατάσταση αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη στόχο Bcl-2. Θα εφαρμοστεί μία νέα μεθοδολογία με τη χρήση επιλεκτικών αναστολέων της πρωτεΐνης-στόχου μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού. Εάν αυτή η περιοχή δέσμευσης του επιλεκτικού αναστολέα συμπίπτει με τη θέση σύνδεσης του βιοδραστικού μορίου, ο εκλεκτικός αναστολέας θα αντικαταστήσει αυτό το μόριο λόγω της υψηλότερης συγγένειας δέσμευσης. Κατά συνέπεια, τα σήματα του επιτόπου δέσμευσης των FFAs θα μειωθούν κατά την προσθήκη του επιλεκτικού αναστολέα, υποδεικνύοντας ότι έχουν κοινή θέση πρόσδεσης. Επιπλέον, πρόσφατα αποδείξαμε ότι πειράματα TR-NOESY NMR σε κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενός υποκαταστάτη (παράγωγο αμινοξέος ενός φλαβονοειδούς) με την πρωτεΐνη Bcl-2 σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα. Οι επαγόμενες αλλαγές στη φάση των κορυφών NOE μπορούν, επομένως, να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση της βιολογικής διαμόρφωσης ελεύθερων λιπαρών οξέων σε ζωντανά κύτταρα.

**Γ. Διερεύνηση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας in vitro σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.**

Σε αυτό το τμήμα της ερευνητικής πρότασης, θα αξιολογηθεί η κυτταροτοξική δραστηριότητα των FFAs τα οποία έχουν δείξει σημαντική αλληλεπίδραση σε πειράματα NMR κυτταρικού επιπέδου.

Η ερευνητική πρόταση αναμένεται:

- (i) να ενισχύσει την ερευνητική μου ομάδα και την εμβέλεια της έρευνάς μας σε έναν τομέα αιχμής που θεωρείται ανταγωνιστικός σε διεθνές επίπεδο,
- (ii) να δώσει την ευκαιρία απασχόλησης σε έναν υψηλής ποιότητας μεταδιδακτορικό επιστήμονα με εμπειρία σε μεθοδολογίες NMR κυτταρικού επιπέδου και σε δύο υποψήφιους διδακτορικούς φοιτητές,
- (iii) να ενισχύσει οικονομικά, σε σημαντικό επίπεδο, την ερευνητική μας ομάδα σε αναλώσιμα, πρόσβαση σε κόστος για εξοπλισμό ή άλλους πόρους, και δυνατότητα διεθνούς διάδοσης και ανακοίνωσης των ερευνητικών μας αποτελεσμάτων.



**ΕΛΙΔΕΚ.**  
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

## ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Λ. Συγγρού 185 & Σάρδεων 2  
ΤΚ. 17121, Νέα Σμύρνη, Ελλάδα  
210 64 12 410, 420  
communication@elidek.gr  
[www.elidek.gr](http://www.elidek.gr)