بسم الله الرحمن الرحیم

انستیتو پاستور ایران

پایان نامه:

برای دریافت درجه دکترای تخصصی (Ph.D) بیوتکنولوژی دارویی

عنوان:

بررسی عملکرد FHIT و بخشهای پروتئینی (protein domains) حاصل از آن در بقا و تکثیر سلولهای فیبروسارکوما HT1080

اساتید راهنما:

دکتر سروش سرداری

دکتر محمد حسین قهرمانی

استاد مشاور:

دکتر سید ناصر استاد

نگارش:

دکتر آمنه اسلام پرست

تیر ماه ۱۳۹۳

خلاصه فارسی:

FHIT، به عنوان یک مهارکننده توموری بالقوه نقش اساسی در فرایند مرگ سلولی به واسطه p53 و MDM2 دارد. مطالعات در مجموع بیانگر برهمکنش FHIT با p53 یا MDM2 می باشد، ولیکن هیچ مطالعه ای به طور دقیق محل میانکنش پروتیئنی را گزارش نکرده است. علیرغم اینکه مطالعات متعدد نشان داده اند که بیان پروتئین FHIT موجب القاء مرگ سلولی و جلوگیری از پیشرفت تومور می شود، بخش محافظت شده عملکردی این پروتئین گزارش نشده است. در این تحقیق با استفاده از روشهای مدلسازی مولکولی و داکینگ، دومینهای تداخل کننده با p53 و MDM2 مورد مطالعه واقع شد و ساختارهای پیشنهادی به منظور بررسی عملکرد دومینها در بقا و چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. فرمهای کوتاه شده FHIT در تداخل با MDM2 و MDM2 بهینه سطوح انرژی پایینتری نسبت به برهمکنش با p53 از خود نشان می دهند. با توجه به این نتایج، فرمهای کوتاه شده $FHIT^{17-102}$ و $FHIT^{34-102}$ در وکتور بیانی pcDNA3 ساب کلون شدند. این ساختارها با استفاده از لیپوفکتامین به دو رده سلولی فیبروسارکومای انسانی و کارسینومای ریه انسانی انتقال داده شدند. بیان FHIT کامل با وسترن بلاتینگ و بیان دو فرم کوتاه شده FHIT با RT-PCR تأیید گردید. اثرات سایتوتوکسیک فرمهای کوتاه شده FHIT در مقایسه با FHIT کامل با روش MTT ارزیابی گردید. نتایج نشان می دهد که در سلولهای HT1080، فرم کوتاه شده N-terminal (اسید آمینه های 17-102) باعث ۶۰ درصد مهار بقا می گردد که در این سلولها FHIT کامل اثری نداشته است. اثر سایتوتوکسیک فرمهای کوتاه شده در سلولهای A549 کمتر بود و FHIT کامل نسبت به دو فرم کوتاه شده منجر به مهار بیشتر بقا شد. علاوه بر این، ترکیب این فرمهای کوتاه شده با دوکسوروبیسین سمیت سلولی القا شده با دوکسوروبیسین را بطور معنی دار در HT1080 افزایش می دهد. آنالیز عملکردی نشان داد که این فرمهای کوتاه شده به تنهایی و در ترکیب با دوکسوروبیسین همانطور که نتایج فلوسیتومتری نشان می دهد باعث توقف سلولها در فاز G2 از سیکل سلولی می شوند. یافته های ما از دومین عملکردی بهینه شده FHIT، منجر به کشف روش طراحی داروی پپتیدومیمتیک در آینده و انتقال ژن جهت درمان سرطان خواهد شد.

کلمات کلیدی: FHIT، MDM2، p53، دومین عملکردی، HT1080، A549، مهار کننده توموری

Abstract:

Fragile histidine triad is considered as a putative tumor suppressor executing crucial role in inhibiting p53 degradation by MDM2. A large number of studies indicate FHIT interaction with p53 or MDM2; however, there is no concrete evidence deciphering functional domains of FHIT involving in the interaction with MDM2 and/or p53 and in tumor inhibition. In this regard, such interaction can spring in mind determining important domains of FHIT binding to MDM2 with regard to p53 and to induce cell death. Since there was not previous study appraising complete three-dimensional structure of target molecules, molecular modeling was carried out to construct three-dimensional models of them. HEX application was used in order to study the interaction of target structures. FHIT truncates interacting with MDM2 presented lower energy levels than FHIT truncates interacting with p53. We intended to search for the FHIT domain possessing the functional cytotoxic properties of the full length protein. Based on our *in silico* screening, we made truncated forms of FHIT. In the present study, full FHIT, $FHIT^{17-102}$ and $FHIT^{34-102}$ were subcloned into pcDNA3 vector and transfected into HT1080 (human fibrosarcoma), with detectable FHIT protein and in A549 (human lung carcinoma) with low levels of endogenous FHIT protein using lipofectamin transfection reagent. Full FHIT expression was confirmed by western blotting and expression of two FHIT truncates were confirmed by RT-PCR. We assessed FHIT truncates cytotoxic effects with regard to full length FHIT in HT1080 human fibrosarcoma and A549 cell lines by MTT assay.

Transfection of these truncated forms into HT1080 cells showed that the N-terminal truncated form (amino acids 17-102) was able to inhibit proliferation stronger than full FHIT. Cytotoxic effect was less in A549 cells and full FHIT inhibit cell proliferation more than its two truncated forms. Furthermore, combination of these truncated forms augmented doxorubicin induced cytotoxicity in HT1080 cell line, significantly. The functional analysis showed that these fragments can arrest cells in G2 phase of the cell cycle as indicated by flowcytometry. Our findings on FHIT optimized functional domain can lead to design of future chemotherapy strategies including peptidomimetic drug design and gene transfer for cancer therapy.

Key words: FHIT, MDM2, p53, Functional domain, HT1080, A549, tumor suppressor

INSTITUT PASTEUR D´ IRAN

Presented for partial fulfillment of the degree

of Philosophy Doctorate (Ph.D) of Pharmaeutical Biotechnology

(Thesis Title)

Evaluation of FHIT and its Functional domains on viability and proliferation of HT1080 cells

Supervisors:

Dr. Soroush Sardari

Dr. Mohammad Hossein Ghahremani

Co-supervisor:

Dr. Seyed Nasser Ostad

By:

Dr. Ameneh Eslamparast

July, 2014