



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ
ΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ Ρ13 ΚΙΝΑΣΗΣ ΣΕ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ
ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΕΥΡΕΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΕΤΙΚΟΓΛΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ ΣΑΒΒΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής

**Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών (Ιωάννινα) &
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χριστοφορίδη Σάββα, επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου τη συγκεκριμένη εργασία, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια του καθόλη την διάρκεια εκπόνησης της.

Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Χριστοφορίδη για την προθυμία τους στο να επιλύουν τους προβληματισμούς μου, αλλά και για την ευχάριστη συνεργασία μας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Παπαφωτίκα Αλεξάνδρα και Καραμάνη Βασιλική για την τεχνική εκπαίδευση που μου προσέφεραν, αλλά και για την συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια αυτής της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εξεταστική επιτροπή:

Τον κ. Φριλίγγο Ευστάθιο (Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Τον κ. Τζαβάρα Θεόδωρο (Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Τον κ. Κωλέττα Ευάγγελο (Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

Τον κ. Κούκλη Παναγιώτη (Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Οι πολλαπλές ισομορφές των PI3 κινασών και ο φυσιολογικός τους ρόλος.....	7
1.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K και ο ρόλος του στον καρκίνο	10
1.3 Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>PIK3CA</i>	13
1.3.1 Η δομή και λειτουργία του ετεροδιμερούς p85α-p110α	14
1.3.2 Η μεταλλαγή E545K στην ελικοειδή περιοχή της PI3K	16
1.3.3 Η μεταλλαγή H1047R στην περιοχή της κινάσης.....	17
1.4 Ανάπτυξη αναστολέων για τη δράση της PI3K	19
1.5 Ο βακουλοϊός ως σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών.....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	22
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
3.1 Φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης στα συστήματα έκφρασης	23
3.1.1 Φορείς που χρησιμοποιούνται στο σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac®	23
3.1.2 Φορείς που χρησιμοποιούνται στο σύστημα έκφρασης στην κυτταρική σειρά HEK293	25
3.2 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων	26
3.3 Το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac®	27
3.3.1 Καλλιέργεια των Sf9 κυττάρων του εντόμου <i>Spodoptera frugiperda</i>	27
3.3.2 Διαμόλυνση των Sf9 κυττάρων για την παραγωγή ανασυνδυασμένων ιών.....	28
3.3.3 Επιμόλυνση των Sf9 κυττάρων με τον ιό για την παραγωγή υψηλότερου τίτλου ιού και παραγωγή της πρωτεΐνης.....	29
3.4 Σύστημα έκφρασης σε ευκαρωτικά κύτταρα HEK293	30
3.4.1 Καλλιέργεια HEK293 κυττάρων	30
3.4.2 Διαμόλυνση HEK293 κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-C1.....	30
3.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting) και αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)	31
3.6 Δοκιμασία της δράσης της PI3 κινάσης <i>in vitro</i>	32
3.6.1 Βασικές αρχές της μεθόδου	32
3.6.2 Μέθοδος της <i>in vitro</i> δοκιμασία της δράσης του ενζύμου	33
3.6.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	36
3.6.4 Προσδιορισμός της τιμής IC ₅₀ των αναστολέων	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38

4.1 Υπερέκφραση των υπομονάδων της PI3 κινάσης με το σύστημα έκφρασης βακουλίου Bac-to-Bac®.....	38
4.2 Υπερέκφραση του γονιδίου της μεταλλαγής E545K της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης σε κύτταρα HEK293.....	45
4.2.1 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pEGFP-C1 με το γονίδιο της <i>PIK3CA</i> E545K.....	46
4.2.2 Υπερέκφραση της συντηγμένης με την EGFP πρωτεΐνης PI3K στην κυτταρική σειρά HEK293.....	49
4.3 Έλεγχος της αναστολής της δράσης της κινάσης σε <i>in vitro</i> πειράματα, απουσία κυττάρων.....	50
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5.1 Παραγωγή της πρωτεΐνης με το σύστημα του βακουλίου.....	54
5.2 Εύρεση αναστολέων ειδικών για τη μεταλλαγμένη μορφή της κινάσης.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ένζυμο PI3 κινάση είναι ένα ετεροδιμερές μόριο που αποτελείται από μια ρυθμιστική (p85α) και μια καταλυτική (p110α) υπομονάδα. Η καταλυτική υπομονάδα p110α (*PIK3CA*) βρίσκεται συχνά μεταλλαγμένη σε πολλούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου. Οι μεταλλαγές σε αυτό το γονίδιο εντοπίζονται συνήθως σε συγκεκριμένα σημεία που ονομάζονται 'θερμά σημεία'. Δύο από τις συχνότερες μεταλλαγές είναι η E545K και H1047R, στην ελικοειδή και στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου, αντίστοιχα. Μεγάλο ενδιαφέρον στη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζει η εύρεση αναστολέων που στοχεύουν ειδικά ενάντια στη μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, ενώ αφήνουν ανέπαφο το φυσιολογικό, με σκοπό τη μειωμένη τοξικότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή λειτουργικής PI3K σε ανασυνδυασμένη μορφή, τόσο της φυσιολογικής όσο και των μεταλλαγμένων μορφών της, και η εύρεση ειδικών αναστολέων έναντι των μεταλλαγμένων μορφών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac (Invitrogen), που επιτρέπει την ταχεία παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες, ακόμα και πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως η p110α.

Αν και η απόδοση της έκφρασης δεν ήταν υψηλή, πραγματοποιήθηκε η έκφραση τόσο της φυσιολογικής (wt) όσο και της μεταλλαγμένης (E545K, H1047R) καταλυτικής υπομονάδας (p110α). Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αντισώματος αντι-p110α. Καλύτερη έκφραση φάνηκε να έχει το γονίδιο της ρυθμιστικής υπομονάδας (*PIK3RI*). Για να διερευνηθεί εάν τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας οφείλονται σε χαμηλή ανιχνευτική ικανότητα του αντισώματος, το cDNA της καταλυτικής υπομονάδας εκφράστηκε συντηγμένο με την EGFP στα κύτταρα HEK293. Η σύγκριση της εικόνας της έκφρασης της πρωτεΐνης, με τη χρήση των αντισωμάτων αντι-GFP και αντι-PIK3CA, έδειξε ότι το αντίσωμα της p110α υπολείπεται σε ευαισθησία έναντι του αντι-GFP αντισώματος, γεγονός που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την εκτίμηση της έκφρασης της p110α.

Παράλληλα, μελετήθηκαν μόρια που σχεδιάστηκαν ως υποψήφιοι αναστολείς της μεταλλαγμένης μορφής E545K, σε *in vitro* πειράματα μέτρησης ενεργότητας της κινάσης. Το μόριο BRF-037 φαίνεται να αποτελεί έναν ικανοποιητικό αναστολέα, ειδικό για την μεταλλαγμένη μορφή.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία μπήκαν οι βάσεις ώστε, μετά από μια μελλοντική βελτίωση των συνθηκών έκφρασης και καθαρισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου p85α/p110α, να παραχθεί η PI3K σε ανασυνδυασμένη μορφή. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε ένας νέος, εξειδικευμένος, αναστολέας της p110α E545K, ο οποίος πιθανά να αποδειχθεί ένα νέο φάρμακο έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της PI3K.

ABSTRACT

PI3K is a heterodimer consisted by a regulatory (p85 α) and a catalytic (p110 α) subunit. The catalytic subunit p110 α (encoded by *PIK3CA* gene) is frequently mutated in many types of human cancer. Mutations on the gene are mainly found on specific regions named 'hotspots'. H1047R and E545K are two 'hot spot' mutations on the catalytic and on the helical domain of the enzyme, respectively. Recent studies are focusing on discovering inhibitors that will specifically target the mutated form of the enzyme, leaving intact the normal one, thus eliminating toxicity.

The aim of this study was the production of functional normal and mutated PI3K in the lab and the discovery of potent inhibitors that will specifically target the mutated forms. In order to do that, the baculovirus expression system Bac-to-Bac (Invitrogen) was used, which allows the rapid production of recombinant proteins in large amounts, even for those with high molecular weight, like p110 α .

The production of the normal (wt) and mutated (E545K, H1047R) catalytic subunit was achieved, although the expression levels weren't high. For the detection of the levels of protein expression an anti-p110 α antibody was used. The gene of the regulatory subunit (*PIK3R1*) seemed to be expressed better than the other subunits. To examine if the low expression levels of the catalytic subunit were due to the low detection efficiency of the p110 α antibody, the cDNA of the catalytic subunit was expressed in HEK293 cells, in fusion with the EGFP protein. The comparison of the expression levels detected by the two antibodies, anti-GFP and anti-PIK3CA, showed that the sensitivity of the antibody for the p110 α subunit was inferior to that of the anti-GFP antibody, a fact that should be considered when evaluating the expression of p110 α .

In parallel, compounds designed as candidate inhibitors of the mutated form E545K, were tested in an *in vitro* assay for the PI3 kinase activity. BRF-037 compound was found to be an efficient and specific inhibitor of the mutated protein.

In conclusion, the foundations were laid in this dissertation, so that the production of recombinant PI3K will be achieved, after future optimization of the parameters of expression and purification of the p85 α /p110 α protein complex. Furthermore, a new specific inhibitor of the p110 α -E545K was identified, which can possibly be proved to be a new drug against the mutated PI3K.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι πολλαπλές ισομορφές των PI3 κινασών και ο φυσιολογικός τους ρόλος

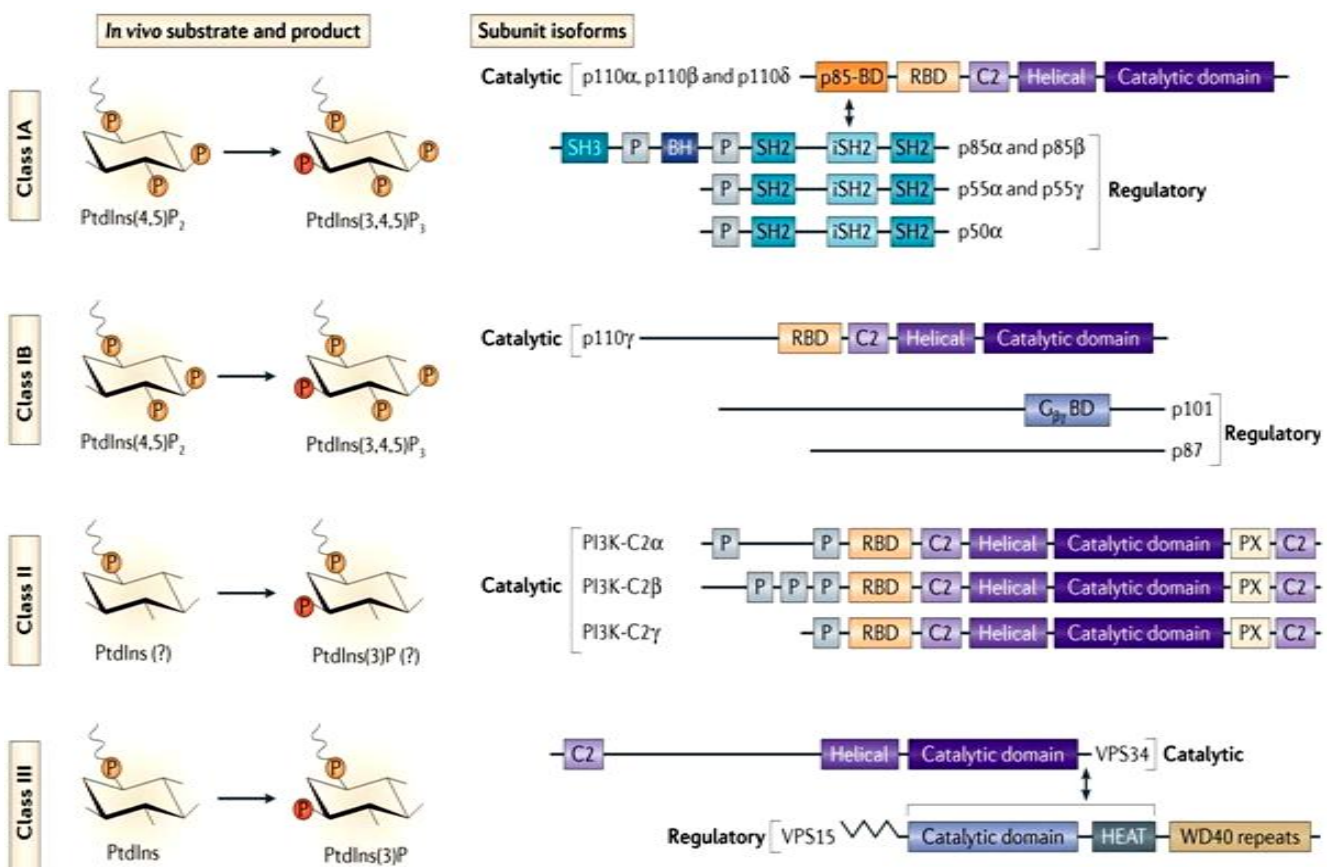
Οι κινάσες της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3 (PI3K) είναι μια οικογένεια κινασών λιπιδίων που ενσωματώνουν σήματα από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, και άλλα περιβαλλοντικά σήματα, μετατρέποντάς τα σε ενδοκυτταρικά σήματα τα οποία ρυθμίζουν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτά τα μονοπάτια ελέγχουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες και κυτταρικές διαδικασίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την επιβίωση, την κινητικότητα και τον μεταβολισμό των κυττάρων (Engelman et al., 2006; Liu et al., 2009; Vanhaesebroeck et al., 2010; Thorpe et al., 2015).

Οι πρωτεΐνες PI3K φωσφορυλιώνουν την 3'-υδροξυλομάδα της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI, PtdIns). Αυτές χωρίζονται σε τρεις τάξεις με βάση τη δομή τους και την εξειδίκευση του υποστρώματος (**Εικόνα 1.1**). Τα μέλη της πρώτης τάξης (I) ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς RTK (receptor tyrosine kinases) και τους φωσφορυλιωμένους προσαρμογείς τους, τους υποδοχείς GPCR (G protein coupled receptors) και μέλη της οικογένειας Ras (Burke and Williams, 2015).

Στα θηλαστικά, η τάξη I των PI3K υποδιαιρείται στις υποτάξεις IA και IB, ανάλογα με το μηχανισμό ρύθμισής τους. Η τάξη IA αποτελείται από ετεροδιμερή μόρια, μιας καταλυτικής υπομονάδας (p110) και μιας ρυθμιστικής υπομονάδας (p85). Η καταλυτική υπομονάδα εμφανίζεται σε τρεις ισομορφές με υψηλή ομολογία, τις p110α, p110β και p110δ, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PIK3CA*, *PIK3CB* και *PIK3CD*, αντίστοιχα. Αυτές οι ισομορφές συνδέονται με οποιαδήποτε από τις πέντε ρυθμιστικές ισομορφές: τις p85α, p55α και p50α που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *PIK3R1* (με τις p55α και p50α να παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου του γονιδίου), την p85β που προέρχεται από το γονίδιο *PIK3R2*, και την p55γ (γονίδιο *PIK3R3*). Αυτές συλλογικά ονομάζονται p85 ρυθμιστικές υπομονάδες. Η τάξη IB αποτελείται από ετεροδιμερή μόρια που προκύπτουν από το συνδυασμό της p110γ καταλυτικής υπομονάδας, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3CG*, με μία από τις ρυθμιστικές υπομονάδες p101 και p87 (P84 ή p87^{PIKAP}), που κωδικοποιούνται από το *PIK3R5* και το *PIK3R6* γονίδιο αντίστοιχα. Η p110 καταλυτική υπομονάδα και των δυο υποτάξεων φωσφορυλιώνει το λιπίδιο PIP2 (4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) παράγοντας το PIP3 (3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη) (Engelman et al., 2006; Mellor et al., 2012; Thorpe et al., 2015).

Η δεύτερη τάξη (II) PI3K αποτελείται από μονομερείς ισομορφές που κωδικοποιούνται από τρία γονίδια, τα *PIK3C2A*, *PIK3C2B* και *PIK3C2G*. Αυτά κωδικοποιούν τις καταλυτικές υπομονάδες PI3K-C2α, PI3K-C2β, και PI3K-C2γ αντίστοιχα, ενώ ρυθμιστική υπομονάδα δεν υπάρχει. Το υπόστρωμα και το προϊόν της δράσης αυτής της τάξης δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένο και πιθανώς να διαφέρει από *in vitro* σε *in vivo*. Το κύριο υπόστρωμα *in vivo* φαίνεται να είναι η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns), ενώ το κύριο προϊόν η 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη PtdIns(3)P (Maffucci and Falasca, 2014).

Τελευταία τάξη των PI3K κινασών αποτελεί η τρίτη τάξη (III), η οποία αποτελείται από μία καταλυτική υπομονάδα, την VPS34 που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3C3*, και από μία ρυθμιστική υπομονάδα, την VPS15 που κωδικοποιείται από το *PIK3R4* γονίδιο. Μαζί σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές το οποίο φωσφορυλιώνει την PtdIns προς PtdIns(3)P (Thorpe et al., 2015).



Εικόνα 1.1: Οι τάξεις των PI3K πρωτεϊνών με βάση την δομή τους και την εξειδίκευση του υποστρώματος (Thorpe et al., 2015).

Οι συλλογικές λειτουργίες για την οικογένεια PI3K εκτείνονται σε όλα τα μέρη των κυττάρων, των κυτταρικών τύπων και στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Κάθε τάξη PI3K έχει πολλαπλούς κυτταρικούς ρόλους μέσω της ρύθμισης των διακριτών ομάδων φωσφοϊνοσιτιδίων. Οι άμεσοι ρόλοι των PI3K μπορούν να κατηγοριοποιηθούν κυρίως στην κυτταρική σηματοδότηση (τάξη I, II) ή στην ενδοκυτταρική μεταφορά (τάξη II, III). Τα μέλη των διαφόρων τάξεων PI3K φαίνεται ότι μπορούν να δράσουν σε διαδοχικά βήματα σε κοινά μονοπάτια και διαδικασίες (Dou et al., 2010; Lu et al., 2012; Jean and Kiger, 2014).

Οι τέσσερις καταλυτικές ισομορφές της πρώτης τάξης έχουν επικαλυπτόμενες αλλά και διακριτές λειτουργίες. Οι λειτουργίες των ισομορφών p110γ και p110δ περιορίζονται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπου εκφράζονται. Οι ισομορφές p110α και p110β εκφράζονται ευρέως, αλλά επίσης μπορούν να επιδεικνύουν εξειδίκευση εντός ορισμένων πλαισίων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Jean and Kiger, 2014). Στον ποντικό, knockout μεταλλάξεις των γονιδίων των p110α και p110β οδηγούν σε εμβρυϊκή θνησιμότητα, γεγονός που καταδεικνύει τον απαραίτητο χαρακτήρα αυτών των ισομορφών στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Φαίνεται ότι η p110α μπορεί να παίζει ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων, ενώ η p110β μπορεί να είναι πιο σημαντική για την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Benistant et al., 2000). Επιπρόσθετα, η α ισομορφή φαίνεται να έχει κυρίαρχο ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης και τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ενώ σημαντική είναι η συμμετοχή και της β ισομορφής (Foukas et al., 2006; Ciruolo et al., 2008). Οι ισομορφές p110γ και p110δ φαίνεται πως παίζουν ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, με την δ ισομορφή να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων (Jou et al., 2002), και τη γ ισομορφή να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (Sasaki et al., 2000), στην επιβίωση των ουδετερόφιλων (Juss et al., 2012) και στη μετανάστευση των μακροφάγων, ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων (Patrucco et al., 2004; Lim et al., 2009; Mothes et al., 2016).

Ενώ τα μέλη της τάξης I βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα μέχρι να συγκεντρωθούν σε ενεργά σύμπλοκα σηματοδότησης στη πλασματική μεμβράνη, οι κινάσες της τάξης II εντοπίζονται κυρίως σε μεμβρανικές δομές, συμπεριλαμβανομένων της πλασματικής μεμβράνης και των ενδοκυτταρικών μεμβρανών, αλλά και στον πυρήνα (Fry, 2001). Λόγω της μη εκτεταμένης έρευνας για την τάξη αυτή, είναι δύσκολο να γενικευθούν οι λειτουργίες τους. Όμως, φαίνεται πως οι λειτουργίες τους εντοπίζονται κυρίως στον κυτταρικό φλοιό, όπως προκύπτει από τους διαφορετικούς ρόλους τους όσον αφορά την κυτταρική μετανάστευση, την αναδιαμόρφωση φλοιού, την μεταφορά γλυκόζης, τη σηματοδότηση της ινσουλίνης, τη ρύθμιση διάυλων ιόντων, την ενδοκυττάρωση και την εξωκυττάρωση (Mazza

and Maffucci, 2011; Falasca and Maffucci, 2012; Jean and Kiger, 2014). Αν και ακόμη δεν θεωρούνται υπαίτιες για ανθρώπινες νόσους, κάποιες ισομορφές είναι πιθανό να συμμετέχουν στον διαβήτη (PI3K α και γ) και στον καρκίνο (PI3K α και β) (Falasca and Maffucci, 2012). Πρόσφατη έρευνα στα ποντίκια προτείνει ένα πιθανό ρόλο για την ανθρώπινη PI3K-C2 α στην αγγειογένεση (Yoshioka et al., 2012), ενώ μελέτη του ρόλου της PI3K-C2 β στον καρκίνο του μαστού υποδεικνύει ότι συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου και στην μετάσταση (Chikh et al., 2016).

Η τάξη III των PI3K είναι η μόνη τάξη που εντοπίζεται συντηρημένη από την ζύμη ως και τον άνθρωπο. Η Vps34 ρυθμίζει κυρίως την ενδοκυτταρική μεταφορά, έχοντας κεντρικό ρόλο στην διαλογή πρωτεϊνών στα ενδοσώματα, στην ωρίμανση ενδοσώματος-λυσosώματος, στον σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων, στην αυτοφαγία και την κυτταροκίνηση (Backer, 2008; Simonsen and Tooze, 2009; Nezis et al., 2010; Raiborg et al., 2013). Η Vps34 εντοπίζεται σε διάφορα ρυθμιστικά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που προάγουν τη σύνθεση της PtdIns(3)P σε διακριτές ενδοκυττάρειες μεμβράνες (Backer, 2008). Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν ανθρώπινες ασθένειες που να σχετίζονται με μεταλλάξεις στην Vps34 (Jean and Kiger, 2014).

1.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K και ο ρόλος του στον καρκίνο

Η οδός της PI3K είναι εξελικτικά συντηρημένη από τη ζύμη ως τα θηλαστικά. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η οδός PI3K ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της μετανάστευσης των κυττάρων (Engelman et al., 2006; Chalhoub and Baker, 2009). Ως σημαντικοί τελεστές καθοδικά των υποδοχέων RTK και GPCR, οι πρωτεΐνες PI3K μετάγουν σήματα από διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες, τα οποία μετατρέπουν σε ενδοκυτταρικά μηνύματα μέσω της παραγωγής φωσφολιπιδίων, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την κίνηση σερίνης/θρεονίνης AKT και άλλα καθοδικά μονοπάτια (Liu et al., 2009).

Οι PI3K της IA τάξης ενεργοποιούνται καθοδικά των πολυάριθμων υποδοχέων RTK, άμεσα ή μέσω των προσαρμογέων τους. Έτσι, η δράση της PI3K ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις αυξητικού παράγοντα-υποδοχέα. Στην πραγματικότητα, στην συντριπτική τους πλειοψηφία, οι PI3K παραμένουν στην ανενεργή τους μορφή στο κυτταρόπλασμα, μακριά από τα υποστρώματα τους που βρίσκονται στη πλασματική μεμβράνη, και μόνο ένα

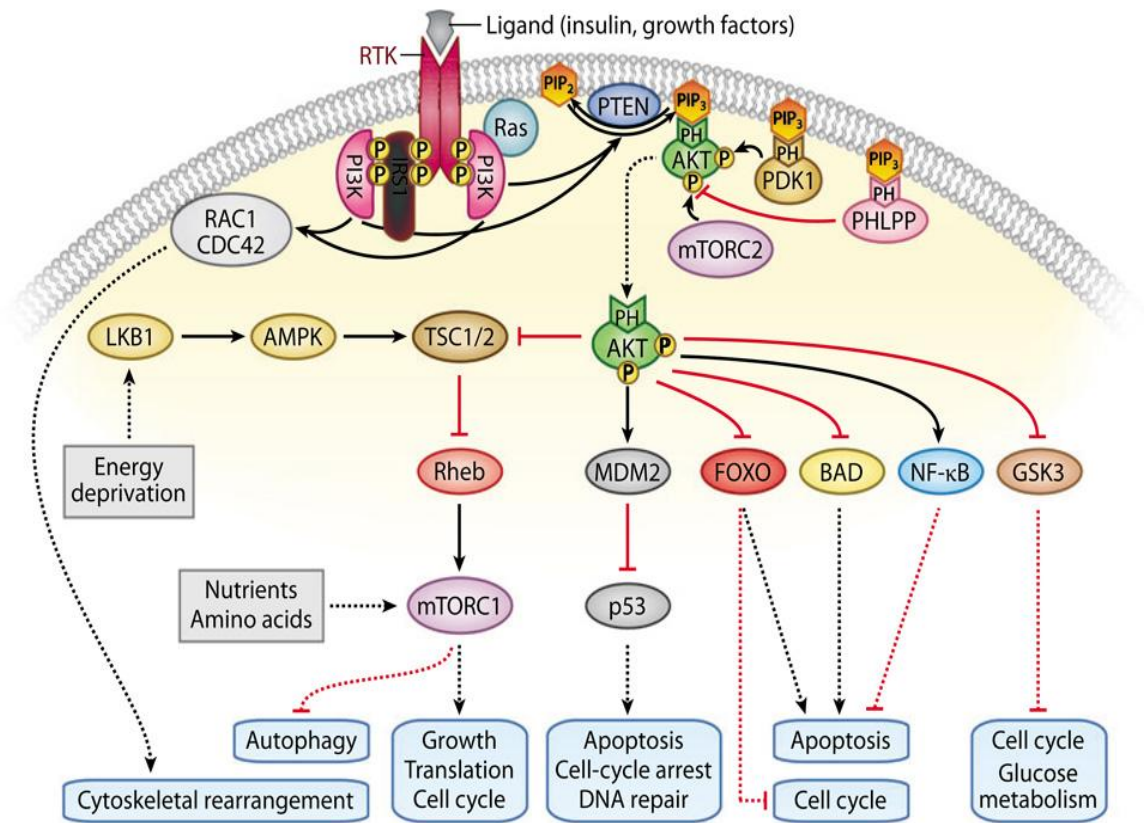
μικρό ποσοστό των PI3K ενεργοποιείται κατόπιν διέγερσης. Ως εκ τούτου, ακόμη και ελαφρές τροποποιήσεις στη δράση των υποδοχέων μπορούν να οδηγήσουν σε πολλαπλάσια αύξηση της δράσης της PI3K (Yuan and Cantley, 2008).

Σε απόκριση προς εξωκυτταρικά ερεθίσματα, η καταλυτική υπομονάδα της PI3K προσελκύεται σε ενεργοποιημένους υποδοχείς της μεμβράνης, μέσω της ρυθμιστικής υπομονάδας της. Η ενεργοποιημένη PI3K καταλύει το σχηματισμό του PIP3 από το PIP2, ενώ η φωσφατάση των λιπιδίων PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) αντιτίθεται άμεσα στη δράση της PI3K αποφωσφορυλιώνοντας το PIP3 σε PIP2, ενεργώντας έτσι ως κεντρικός αρνητικός ρυθμιστής της PI3K. Το PIP3 μετάρει σήματα ενεργοποίησης μέσω της πρόσδεσης του σε πρωτεΐνες που φέρουν το μοτίβο PH (pleckstrin homology), προσελκύνοντάς τες έτσι στη μεμβράνη. Μία από αυτές είναι η κινάση AKT (γνωστή και ως PKB), η οποία αποτελεί ένα κεντρικό καθοδικό τελεστή του PIP3 (**Εικόνα 1.2**). Η AKT προσελκύεται στη μεμβράνη μέσω της σύνδεσης της PH περιοχής της με το PIP3, και ενεργοποιείται πλήρως από την ακόλουθη φωσφορυλίωση της από την PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) στη θρεονίνη 308 και από το σύμπλοκο mTORC2 στη σερίνη 473, ή δυνητικά και από άλλες κινάσες (Engelman et al., 2006; Mora et al., 2004; Sarbassov et al., 2005; Feng et al., 2004; Chalhoub and Baker, 2009).

Η AKT/PKB, από μόνη της, ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Όσον αφορά την επιβίωση των κυττάρων, η AKT μπορεί να απενεργοποιήσει τους προ-αποπτωτικούς παράγοντες BAD και Procaspase-9, καθώς επίσης και την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Forkhead που επάγουν την έκφραση άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως τον προσδέτη Fas (FasL). Η AKT ενεργοποιεί επίσης την κινάση IκB (IKK), έναν θετικό ρυθμιστή του παράγοντα επιβίωσης NF-κB (Pawson and Nash, 2000; Testa and Bellacosa, 2001; Porta et al., 2014).

Όσον αφορά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη των κυττάρων, οι διάφοροι στόχοι της AKT εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση, στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, η δράση της AKT μπορεί να ρυθμίζει τη δράση της πρωτεΐνης mTOR, της κινάσης GSK3, της πρωτεΐνης IRS-1, των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21 και p27, και ενδεχομένως της Raf-1, ένα μέλος της οδού MAPK. Όσον αφορά την GSK3, η AKT ενεργοποιεί ένα δίκτυο που ρυθμίζει θετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στη φάση S, μέσω της αδρανοποίησης του GSK3-β που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της κυκλίνης D1, και της αναστολής των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Forkhead και της

ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης TSC2, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της p27 (Fresno-Vara et al., 2004; Liang and Slingerland, 2003; Porta et al., 2014).



Εικόνα 1.2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/AKT. Με μαύρα βέλη σημειώνονται οι θετικές και με κόκκινα οι αρνητικές επιδράσεις των μορίων (Chalhoub and Baker, 2009).

Το PI3K/Akt μονοπάτι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της επιβίωσης κατά την διάρκεια κυτταρικού στρες. Δεδομένου ότι οι όγκοι αναπτύσσονται σε ένα εγγενώς στρεσογόνο περιβάλλον (που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου, καθώς επίσης και από χαμηλό pH), ο ρόλος αυτής της οδού στον καρκίνο φαίνεται να είναι κρίσιμος (Porta et al., 2014). Η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης. Η PI3K και η AKT μπορούν να ρυθμίζουν την

καρκινική αγγειογένεση μέσω των καθοδικών τους στόχων, όπως είναι η σηματοδότηση της mTOR/p70S6K, η αναστολή των FOXO, η επαγωγή των NOS και η αναστολή της GSK-3β. Οι στόχοι αυτοί αυξάνουν συνήθως την έκφραση του παράγοντα HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1α), ο οποίος με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του VEGF. Ο VEGF είναι ο πιο γνωστός επαγωγέας της αγγειογένεσης καθόλα τα στάδια της. Παράλληλα, το PI3K/Akt μονοπάτι φαίνεται ότι καταστέλλει τον TSP-1, έναν ενδογενή αναστολέα της αγγειογένεσης, τόσο στα καρκινικά όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Jiang and Liu, 2009).

Η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K είναι ένα από τα πιο συχνά γεγονότα σε ανθρώπινους καρκίνους. Ο πιο κοινός μηχανισμός που οδηγεί σε μη φυσιολογική σηματοδότηση της PI3K είναι η σωματική απώλεια της φωσφατάσης PTEN μέσω γενετικών ή επιγενετικών αλλαγών. Το μονοπάτι της PI3K μπορεί επίσης να επάγεται με την ενεργοποίηση των RTK ή με αλλαγές στις ισομορφές της ίδιας της PI3K (Thorpe et al., 2015).

Παρά το γεγονός ότι η σηματοδότηση μέσω όλων των τάξεων PI3K συνδέεται με βασικές διεργασίες της ανάπτυξης, μέχρι σήμερα κεντρικό ρόλο στον καρκίνο φαίνεται πως έχει ειδικά η IA τάξη των PI3K. Η τάξη αυτή συμμετέχει στην επαγωγή σημάτων καθοδικά των ογκογόνων RTK, και το γονίδιο της p110α καταλυτικής υπομονάδας (*PIK3CA*) είναι το μόνο γονίδιο PI3K που ταυτοποιείται με συχνές μεταλλάξεις στον καρκίνο του ανθρώπου (Chalhoub and Baker, 2009).

1.3 Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*

Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K, p110α, έχουν ταυτοποιηθεί ως νέοι μηχανισμοί επαγωγής της ογκογόνου σηματοδότησης της PI3K (Samuels et al., 2004). Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να ενταχθούν μαζί με αυτές της ενίσχυσης του *PIK3CA*, της απώλεια της PTEN, των μεταλλαγών στην AKT και της ενίσχυσης των RTK, σε μια ομάδα συχνών γενωμικών ανωμαλιών που προωθεί την ογκογένεση μέσω της επαγωγής του άξονα σηματοδότησης PI3K/AKT (Yuan and Cantley, 2008).

Το γονίδιο *PIK3CA* βρίσκεται συχνά μεταλλαγμένο σε κοινούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο (πχ. του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα κα.). Σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της p110α συμβαίνουν σε ολόκληρη την αλληλουχία του, με ένα μεγάλο ποσοστό (πάνω από 75%) να παρατηρείται σε δυο περιοχές της καταλυτικής υπομονάδας, την

ελικοειδή και την καταλυτική (περιοχή της κινάσης). Οι δυο συχνότερες μεταλλάξεις ('hotspot') είναι η H1047R και η E545K, στην ελικοειδή και στην καταλυτική περιοχή αντίστοιχα, οι οποίες καθιστούν την κινάση ιδιοσυστατικά ενεργή. Αυτές δρουν συνεργιστικά όταν συνυπάρχουν στο ίδιο μόριο της p110α. Οι μεταλλάξεις αυτές φαίνεται να δρουν μέσω ανεξάρτητων μηχανισμών (Samuels et al., 2004; Zhao and Vogt, 2008).

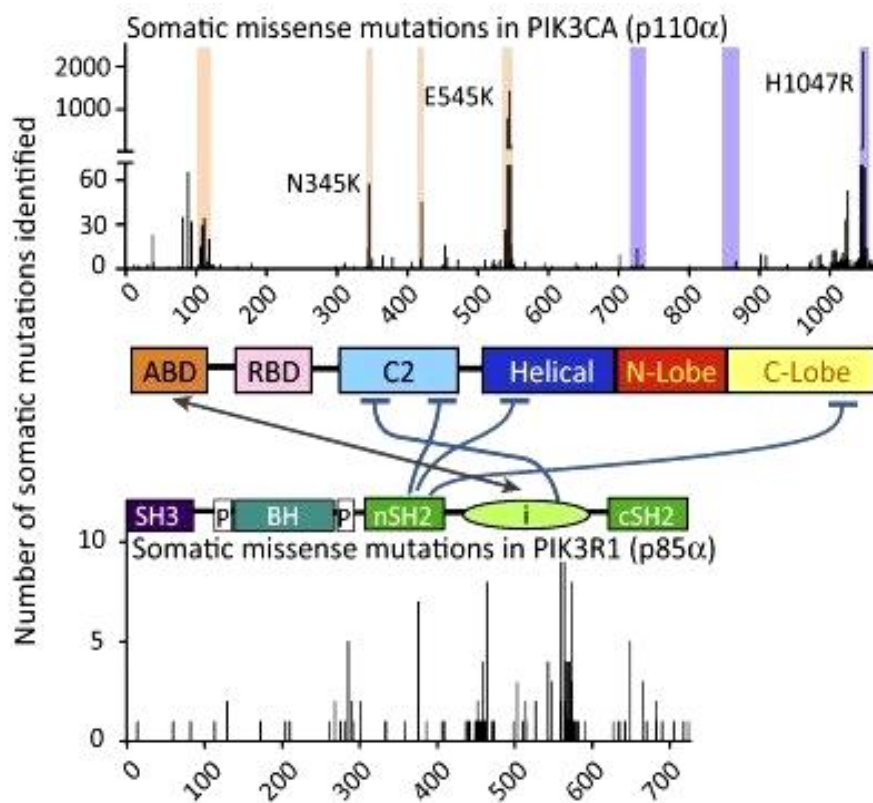
1.3.1 Η δομή και λειτουργία του ετεροδιμερούς p85α-p110α

Η p110α καταλυτική υπομονάδα αποτελείται από πέντε περιοχές-επικράτειες: την αμινοτελική περιοχή που ονομάζεται ABD (adaptor binding domain) που δεσμεύει την p85α, την περιοχή δέσμευσης της πρωτεΐνης Ras (RBD), την C2, η οποία προσδένεται σε κυτταρικές μεμβράνες, μια ελικοειδή περιοχή που φαίνεται να είναι ο πυρήνας του μορίου, και την καταλυτική περιοχή της κινάσης, η οποία είναι μια δίλοβη δομή, με έναν μικρότερο αμινοτελικό N-λοβό και έναν μεγαλύτερο καρβοξυτελικό C-λοβό, δομή τυπική των λιπιδιακών και πρωτεϊνικών κινασών (Huang et al., 2007).

Η ρυθμιστική υπομονάδα p85α επίσης αποτελείται από πέντε επικράτειες: την SH3 (Src homology 3) στο αμινοτελικό άκρο της, την BH (BCR homology) περιοχή και από δυο περιοχές SH2 (Src homology 2), την αμινοτελική nSH2 και την καρβοξυτελική cSH2, οι οποίες δεσμεύουν pTyr-X-X-Met μοτίβα σε ενεργοποιημένους υποδοχείς και τους προσαρμογείς τους, ενώ ανάμεσα τους παρεμβάλλεται η ενδιάμεση περιοχή iSH2, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της καταλυτικής υπομονάδας p110α (Mellor et al., 2012). Πιστεύεται ότι η κύρια λειτουργία της περιοχής iSH2 είναι να ενεργεί ως περιοχή σύνδεσης για την p110α κρατώντας τις υπομονάδες p85α/p110α μαζί και ότι αυτή η αλληλεπίδραση επιτρέπει μία δεύτερη ρυθμιστική επαφή μεταξύ της nSH2 και της p110α που αναστέλλει την ενεργότητα της p110α επάγοντας αλλαγή της διαμόρφωσης (Liu et al., 2014).

Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με καρκίνο ταυτοποιούνται στην ABD, στην C2, στην ελικοειδή και στην περιοχή της κινάσης της p110α. Αρκετές από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν αποδειχθεί ότι οδηγούν σε αυξημένη ενζυμική ενεργότητα *in vitro* και *in vivo* (Huang et al., 2007). Η ρυθμιστική υπομονάδα p85α συναντάται επίσης συχνά σε σωματικές μεταλλάξεις σε καρκίνους του ανθρώπου και οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις επάγουν την ενεργότητα της PI3K. Πολλές σημειακές μεταλλάξεις συσσωρεύονται στις περιοχές iSH2 και nSH2, οι οποίες σχηματίζουν επαφές με την p110 καταλυτική υπομονάδα και είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της ενεργότητας της PI3K. Έχει ταυτοποιηθεί ένας μικρός αριθμός

μεταλλαγών στην p85α που σχετίζονται με τον καρκίνο, οι οποίες δεν συνδέονται με την p110 καταλυτική υπομονάδα και ο μηχανισμός ενεργοποίησης τους έχει προταθεί να είναι ανεξάρτητος από την καταλυτική δράση της PI3K (Burke and Williams, 2015). Στην **Εικόνα 1.3** φαίνονται οι περιοχές της ρυθμιστικής και της καταλυτικής υπομονάδας μαζί με τις συχνότητες των μεταλλαγών τους.



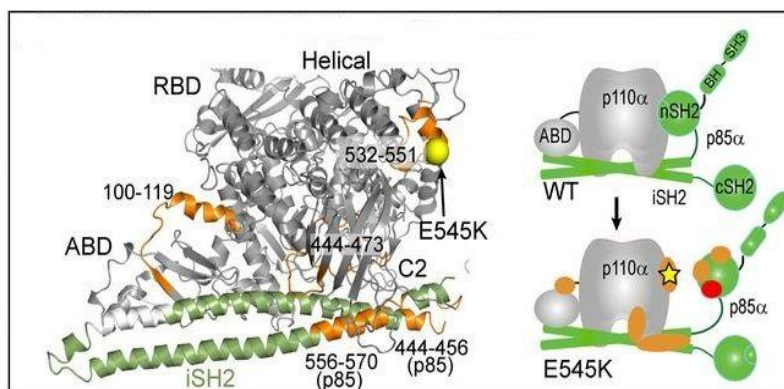
Εικόνα 1.3: Δομή και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων της PI3Kα, καθώς και η συχνότητα μεταλλαγών σε κάθε περιοχή (Burke and Williams, 2015).

Ανάλυση των ογκογόνων μεταλλαγών δείχνει ότι όλες επάγουν το ένζυμο. Σχεδόν όλες οι ογκογόνες μεταλλαγές αυξάνουν την ικανότητα πρόσδεσης στη μεμβράνη και τη βασική ενεργότητα της κινάσης, ακόμη και αν αυτές οι μεταλλαγές δεν εντοπίζονται στις θέσεις που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη (Burke et al., 2012).

1.3.2 Η μεταλλαγή E545K στην ελικοειδή περιοχή της PI3K

Η ελικοειδής περιοχή περιέχει δύο αμινοξικά κατάλοιπα, τα Glu542 και Glu545 (γλουταμινικό οξύ), που συχνά βρίσκονται μεταλλαγμένα σε καρκίνους. Τα κατάλοιπα αυτά, λόγω του όξινου φορτίου τους, αλληλεπιδρούν με την λυσίνη379 και την αργινίνη340 της nSH2 περιοχής της p85α, που έχουν βασικό φορτίο, και η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει την ενεργότητα της καταλυτικής υπομονάδας (Miled et al., 2007). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, αυτά τα δύο όξινα κατάλοιπα έχουν μεταλλαχθεί σε λυσίνη, προκαλώντας μια αντιστροφή φορτίου. Μεταλλαγές στα κατάλοιπα 542 και 545 καταργούν την ανασταλτική δράση της nSH2 της p85α.

Δύο μηχανισμοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις επιπτώσεις των μεταλλαγών αυτών. Πρώτον, οι μεταλλαγές ενδέχεται να τροποποιούν τον προσανατολισμό της nSH2 σε σχέση με την ελικοειδή και την περιοχή της κινάσης. Η πρόσδεση της ελικοειδούς περιοχής της p110α ή των φωσφοπεπτιδίων τυροσίνης στην nSH2 περιοχή της p85α είναι αμοιβαία αποκλειόμενα γεγονότα. Πιστεύεται ότι η μεταλλαγμένη λυσίνη545 της p110α καταλαμβάνει το χώρο που, υπό φυσιολογικές συνθήκες, θα καταλαμβάνόταν μόνο από φωσφοτυροσίνες και ως εκ τούτου θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναίρεση της ανασταλτικής πρόσδεσης της nSH2 στην p110, και άρα σε ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της (Miled et al., 2007; Liu et al., 2014). Έτσι, η μεταλλαγή αυτή (**Εικόνα 1.4**) φαίνεται ότι μιμείται τη φυσιολογική ενεργοποίηση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης από πεπτίδια φωσφοτυροσίνης (Burke et al., 2012). Επιπλέον, είναι πιθανό αλλάζοντας την αλληλεπίδραση της ελικοειδούς περιοχής με την nSH2, να μεταβάλλονται οι σχετικές θέσεις των ελίκων α11K και α12K του C-λοβού της περιοχής της κινάσης (Huang et al., 2007).



Εικόνα 1.4: Η E545K μεταλλαγή καταργεί την ανασταλτική αλληλεπίδραση nSH2-p110α. Με γκρι χρώμα φαίνονται οι περιοχές της καταλυτικής υπομονάδας, ενώ με πράσινο οι περιοχές της ρυθμιστικής. Η θέση της μεταλλαγής φαίνεται με κίτρινη σφαίρα στην κρυσταλλική δομή (αριστερά) και με αστέρι στο σχήμα (δεξιά) (Burke et al., 2012).

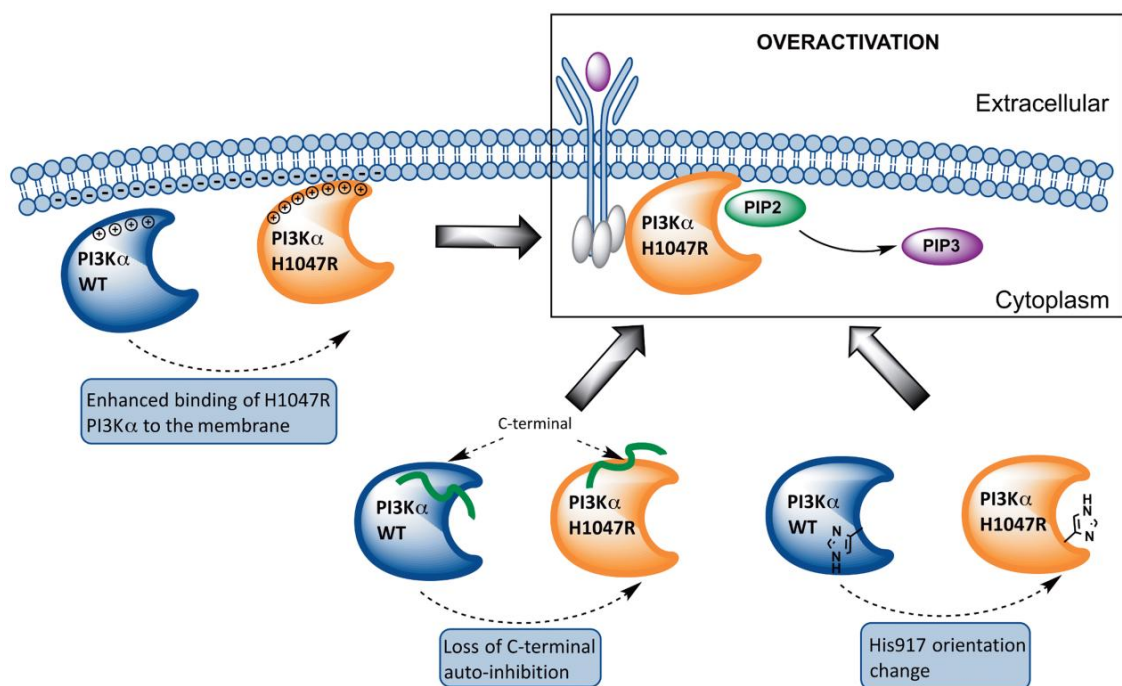
1.3.3 Η μεταλλαγή H1047R στην περιοχή της κινάσης

Η ιστιδίνη1047 στην περιοχή της κινάσης είναι ένα άλλο ‘θερμό σημείο’ για σωματικές μεταλλαγές στον καρκίνο. Είναι ενδιαφέρον ότι η ιστιδίνη1047 μεταλλάσσεται σε αργινίνη στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ενώ η αργινίνη είναι φυσιολογικά παρούσα στην ομόλογη θέση στην ανθρώπινη p110γ. Στη δομή του συμπλόκου p110α/p85, η ιστιδίνη1047 βρίσκεται εντός της έλικας a12K του C-λοβού της περιοχής της κινάσης και είναι κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του βρόχου ενεργοποίησης, πιθανώς σχηματίζοντας ένα δεσμό υδρογόνου με τη λευκίνη956, εντός του βρόχου ενεργοποίησης. Μεταλλαγές στην ιστιδίνη1047 είναι πιθανό να έχουν άμεση επίδραση στη διαμόρφωση του βρόχου ενεργοποίησης, αλλάζοντας την αλληλεπίδρασή του με υποστρώματα της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (Huang et al., 2007).

Η δομή του συχνού μεταλλάγματος H1047R σε σύμπλοκο με την p85α αποκάλυψε ορισμένες κρίσιμες διαφορές σε σύγκριση με τη δομή του αγρίου τύπου συμπλόκου. Σε αντίθεση με το κατάλοιπο ιστιδίνης της άγριου τύπου υπομονάδας, η αργινίνη δεν αλληλεπιδρά με την λευκίνη956 του βρόχου ενεργοποίησης αλλά προσανατολίζει την πλευρική αλυσίδα της μακριά από την καταλυτική περιοχή, διευκολύνοντας την προσέλευση της μεμβράνης. Η μεταλλαγή επάγει δομικές αλλαγές σε μια περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της p110α (κατάλοιπα 1050-1062) και στο βρόχο που εκτείνεται στα κατάλοιπα 864-874, ενώ και οι δύο περιοχές είναι γνωστό ότι είναι σημαντικές για την προσέλευση της κινάσης προς τη πλασματική μεμβράνη (Mandelker et al., 2009; Liu et al., 2014).

Πρόσφατα ένας μηχανισμός υπερενεργοποίησης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης προτάθηκε από τους Gkeka et al. (2014). Σύμφωνα με αυτήν, παρατηρείται μια εκτεταμένη κατανομή θετικού φορτίου στις περιοχές της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση στη μεμβράνη σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεΐνη, η οποία δικαιολογεί την αυξημένη ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να συνδέεται με μεμβράνες πλούσιες σε ανιονικά λιπίδια. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ένας αυτοανασταλτικός ρόλος της καρβοξυτελικής ουράς στην φυσιολογική πρωτεΐνη, η οποία καταργείται στην μεταλλαγμένη

πρωτεΐνη λόγω της απώλειας σημαντικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, γεγονός που μπορεί να συνδράμει στην ενισχυμένη δραστηριότητα του μεταλλάγματος. Επιπλέον, η μεταλλαγή H1047R μεταβάλλει την περιστροφική κίνηση του N-λοβού της καταλυτικής περιοχής σε σχέση με το C-λοβό, δημιουργώντας μεγαλύτερο άνοιγμα της καταλυτικής σχισμής που μπορεί να ευνοεί την πρόσδεση του ATP και μετατοπίζει τη θέση των συντηρημένων καταλοίπων του P-βρόγχου στην περιοχή του ενεργού κέντρου, επηρεάζοντας έτσι τη δράση της κινάσης. Το μοντέλο στην **Εικόνα 1.5** συνοψίζει τα παραπάνω ευρήματα.



Εικόνα 1.5: Μοντέλο του μηχανισμού ενεργοποίησης της PI3K από την μεταλλαγή H1047R. Η υπερενεργοποίηση στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (με πορτοκαλί χρώμα) οφείλεται στην συγκέντρωση θετικού φορτίου στις θέσεις πρόσδεσης στην μεμβράνη, που διευκολύνει την πρόσδεση στην αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη, στην απώλεια της αυτοανασταλτικής δράσης του καρβοξυτελικού τμήματος και στην επακόλουθη αλλαγή της διεύθυνσης της ιστιδίνης917 προς το ενεργό κέντρο του μορίου, που οδηγεί στην υδρόλυση του ATP (Gkeka et al., 2014).

1.4 Ανάπτυξη αναστολέων για τη δράση της PI3K

Επειδή ο άξονας PI3K/AKT/mTOR έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα πιο συχνά ενεργοποιημένα μονοπάτια στον καρκίνο, τα μέλη του αποτελούν στόχο για την ανάπτυξη αντικαρκινικής θεραπείας. Ένας αριθμός μορίων που στοχεύουν τα μέλη της οδού της PI3K έχουν αναπτυχθεί και αξιολογηθεί σε προκλινικές μελέτες, καθώς και σε κλινικές δοκιμές (Martini et al., 2013).

Στην πρώτη γενιά των αναστολέων PI3K περιλαμβάνονται ενώσεις όπως η Wortmannin και η LY294002, οι οποίες δεσμεύουν όλες τις ισομορφές PI3K της τάξης I, γι' αυτό και ονομάζονται καθολικοί αναστολείς. Ωστόσο, λόγω των πολύ φτωχών φαρμακοκινητικών τους ιδιοτήτων, της έλλειψης εξειδίκευσης και της αυξημένης τοξικότητας ποτέ δεν είχαν αναπτυχθεί πλήρως ως αντικαρκινικά φάρμακα για κλινική χρήση. Πιο πρόσφατα, ενώσεις με καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί και αξιολογούνται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές σε διάφορες κακοήθειες. Αυτοί οι αναστολείς δεύτερης γενιάς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη και ειδική δράση έναντι των διάφορων ισομορφών PI3K (πχ. ο GDC-0032 για την PI3Kα). Η τρίτη γενιά αναστολέων περιλαμβάνει τους λεγόμενους 'διπλούς αναστολείς PI3K/mTOR' (πχ. NVP-BEZ235). Το πιθανό πλεονέκτημα αυτών των ενώσεων (ένα πλεονέκτημα που πρέπει ακόμη να επιβεβαιωθεί *in vivo*) είναι ότι αναστέλλουν όχι μόνο όλες τις ισομορφές PI3K της τάξης I, αλλά επιπρόσθετα και το σύμπλοκο mTORC1 και mTORC2. Θεωρητικά, αυτή η συνδυαστική δράση θα οδηγήσει στην ισχυρότερη αναστολή όλης της οδού PI3K/Akt/mTOR (Martini et al., 2013; Martelli et al., 2012; Porta et al., 2014).

Το θεραπευτικό εύρος και η αποτελεσματικότητα των καθολικών αναστολέων περιορίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις από τις παρενέργειες. Από την άλλη, και οι εξειδικευμένοι για μια ισομορφή αναστολείς έχουν αρνητικές επιπτώσεις λόγω της αναστολής των βασικών λειτουργιών της φυσιολογικής PI3K, πχ. η αναστολή της φυσιολογικής α ισομορφής επηρεάζει την ομοιόσταση της γλυκόζης. Ωστόσο, οι καθολικοί αναστολείς έχουν πρόσθετες αρνητικές συνέπειες λόγω της μη ειδικής αναστολής των φυσιολογικών ισομορφών. Συνεπώς, είναι φανερό η ανάγκη για δημιουργία εξειδικευμένων αναστολέων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες τοξικές επιπτώσεις (Thorpe et al., 2015).

Δεδομένου του ουσιαστικού ρόλου της p110α στην κυτταρική φυσιολογία, η ανάπτυξη αναστολέων ειδικών για τη μεταλλαγμένη της μορφή αποτελεί έναν ιδιαίτερο στόχο για θεραπεία. Τέτοιοι αναστολείς θα ελαχιστοποιήσουν πιθανές παρενέργειες, δηλαδή μεταβολή

στη σηματοδότηση της ινσουλίνης, που είναι σχεδόν βέβαιο ότι σχετίζονται με την αναστολή της φυσιολογικής υπομονάδας, ειδικά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης θεραπείας. Οι περισσότεροι μικρομοριακοί αναστολείς που στοχεύουν την PI3K στην τρέχουσα ανάπτυξη, όπως και οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων, λειτουργούν με σύνδεση στην θέση πρόσδεσης του ATP και έτσι ανταγωνίζονται με το ATP. Η δομή της φυσιολογικής p110α υποδεικνύει ότι η μεταλλαγή H1047R στην περιοχή της κινάσης πιθανότατα βελτιώνει τη δέσμευση του υποστρώματος μέσω μιας άμεσης επίδρασης στην διαμόρφωση του βρόχου ενεργοποίησης. Λόγω της εγγύτητας του βρόχου ενεργοποίησης προς τη θέση σύνδεσης του ATP, ένας αναστολέας ειδικός για την μεταλλαγμένη περιοχή της κινάσης μπορεί να είναι εφικτός με τη χρήση υφιστάμενων δομών φαρμάκων. Μπορεί να είναι, όμως, πολύ πιο δύσκολο να στοχευθεί η μεταλλαγμένη ελικοειδής περιοχή της κινάσης (E542K ή E545K), γιατί αυτές οι μεταλλαγές φαίνεται να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, εξαλείφοντας μια αυτοανασταλτική επαφή με την p85 (Miled et al., 2007; Liu et al., 2009).

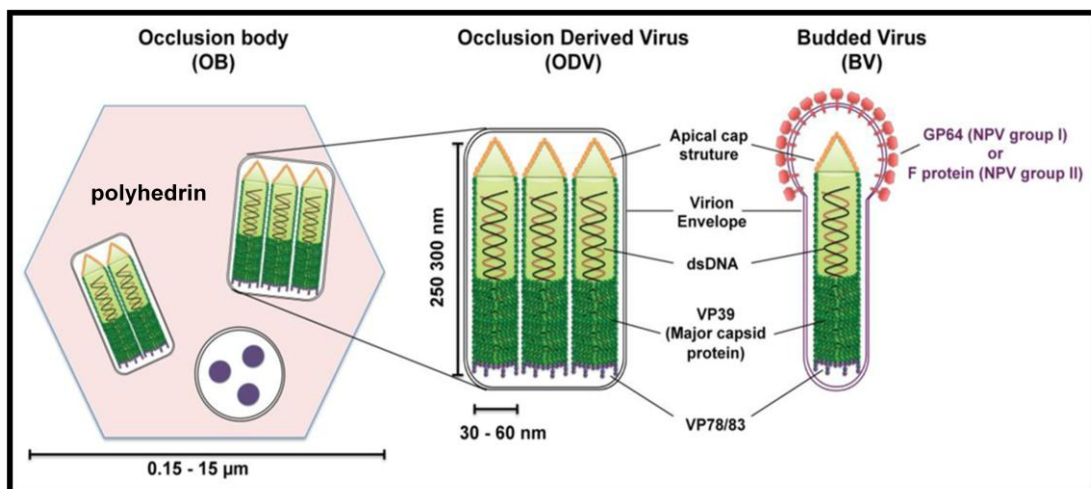
Ο πρώτος ειδικός αναστολέας για την PI3Kα ισομορφή ήταν ο NVP-BYL719, παράγωγο της 2-αμινοθειαζόλης, και δείχνει παρόμοια δραστηριότητα προς μεταλλαγμένες μορφές H1047R και E545K. Ομοίως, ο INK1117 έχει αναφερθεί ως ειδικός αναστολέας της PI3Kα και επί του παρόντος υποβάλλεται σε κλινικές δοκιμές Φάσης I. Πρόσφατα, ένα νέο μόριο, ο GDC-0032, έχει αναφερθεί ότι είναι ένας πολύ ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της PI3Kα και της PI3Kδ, αλλά δείχνει 3 φορές ισχυρότερη δράση προς τις ογκογόνες μεταλλαγές H1047R και E545K. Ο GDC-0032 είναι επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές Φάσης I, από τις οποίες προέκυψαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, οι αναστολείς της PI3K έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα όταν χρησιμοποιούνται ως μεμονωμένοι παράγοντες, εν μέρει λόγω της ενεργοποίησης αντισταθμιστικών μονοπατιών, όπως του RAS/RAF/MEK/ERK. Έτσι, η καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση φαίνεται να είναι η συνδυαστική αναστολή αυτών των μονοπατιών (Furet et al., 2013; Jessen et al., 2009; Juric et al., 2013; Castel et al., 2014).

1.5 Ο βακουλοϊός ως σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών

Κατά την προσπάθεια παραγωγής πρωτεϊνών των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης, ένα σημαντικό εμπόδιο προκύπτει από την έλλειψη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στα κύτταρα αυτά. Η διαφορά τους αυτή, σε σχέση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση μη λειτουργικών

ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετο πρόβλημα που συχνά παρατηρείται στα μικροβιακά συστήματα έκφρασης αποτελεί η μόλυνση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ενδοτοξίνες που παράγονται παράλληλα. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί και προτιμώνται, σε αυτές τις περιπτώσεις, συστήματα έκφρασης ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών.

Ένα από τα πιο κοινά συστήματα έκφρασης ευκαρυωτικών κυττάρων είναι το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού (BEVS), το οποίο έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης ετερόλογων γονιδίων σε σύγκριση με τα άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης, ιδιαίτερα για ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Στα πλεονεκτήματα αυτού του συστήματος είναι η ασφάλεια των ιών, καθώς έχουν ένα περιορισμένο εύρος ξενιστών που περιορίζονται σε συγκεκριμένα ασπόνδυλα, και η ορθή πτύχωση και μετα-μεταφραστική τροποποίηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Με το σύστημα αυτό οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται είναι όμοιες με τις αντίστοιχες ανθρώπινες, όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (N,O-γλυκοζυλίωση και φωσφορυλίωση) και τη βιολογική τους δράση (Yazdani et al., 2016).



Εικόνα 1.6: Οι δυο μορφές του βακουλοϊού, τα εκβλαστώνοντα ιοσωμάτια (BVs) δεξιά και τα έγκλειστα στην πολυεδρίνη ιοσωμάτια (ODVs) αριστερά (Au et al., 2013).

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων BEVS είναι και το σύστημα έκφρασης Bac-to-Bac το οποίο αναπτύχθηκε από τον Luckow et al. (1993) και το οποίο βασίζεται στην ικανότητα παραγωγής ανασυνδυασμένου ιού μέσω μετάθεσης ειδικής θέσης στην *E.coli*. Ένα mini-F ρεπλικόνιο, ένας δείκτης καναμυκίνης, μια θέση-στόχος attTn7 για το βακτηριακό

τρασποζόνιο Tn7, και μια lacZ' (lacZα) κασέτα εισήχθησαν στο DNA του AcMNPV (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, **Εικόνα 1.6**) για να κατασκευαστεί ένας παλινδρομικός φορέας βακουλοϊού (Bacmid) που θα μπορεί να αντιγράφεται στην *E. coli* ως ένα πλασμίδιο και θα μπορεί να μολύνει κύτταρα εντόμων. Το ετερόλογο γονίδιο που κλωνοποιήθηκε στον κατάλληλο φορέα (πλασμίδιο) έφερε εκατέρωθεν του το αριστερό και το δεξιό άκρο του Tn7, και μπορούσε να μετατεθεί στο Bacmid, όταν οι λειτουργίες της μετάθεσης Tn7 παρέχονται από ένα βοηθητικό πλασμίδιο. Το ανασυνδυασμένο Bacmid επιλέγεται με βάση το χρώμα των αποικιών που σχηματίζουν τα βακτήρια που το περιέχουν, επειδή η κασέτα του lacZα καταστρέφεται κατά τη διαδικασία της μετάθεσης. Ο ανασυνδυασμένος βακουλοϊός που φέρει το ξένο γονίδιο θα μπορούσε να κατασκευαστεί σε 7-10 ημέρες με σύστημα Bac-to-Bac (Luckow et al., 1993; Yao et al., 2006).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή των φυσιολογικών υπομονάδων της PI3K (p85α, p110α), αλλά και των μεταλλαγμένων μορίων p110α-E545K, p110α-H1047R, με το σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών Bac-to-Bac σε κύτταρα εντόμων. Το σύστημα αυτό παρέχει τις κατάλληλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για την παραγωγή λειτουργικών ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, ενώ, επιπλέον, επιτυγχάνεται υψηλή έκφραση ακόμα και πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού μεγέθους, όπως αυτό της καταλυτικής υπομονάδας *PIK3CA*. Οι πρωτεΐνες που θα παραχθούν με το σύστημα του βακουλοϊού θα χρησιμοποιηθούν στην παρακάτω δοκιμασία, τόσο για τον έλεγχο της λειτουργικότητάς τους, όσο και για τον εντοπισμό νέων ειδικών αναστολέων.

Παράλληλα με την παραγωγή της πρωτεΐνης, στόχος της εργασίας ήταν η εύρεση αναστολέων, ειδικών για τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας μια δοκιμασία *in vitro* μέτρησης της ενεργότητας της κινάσης, απουσία κυττάρων. Βασικός στόχος ήταν η εύρεση εξειδικευμένων αναστολέων έναντι των μεταλλαγμένων μορφών της κινάσης, οι οποίοι θα αφήνουν ανεπηρέαστη τη φυσιολογική. Με τον τρόπο αυτό, οι νέοι αναστολείς που θα ανακαλυφθούν θα έχουν λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν τοξικότητα σε προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

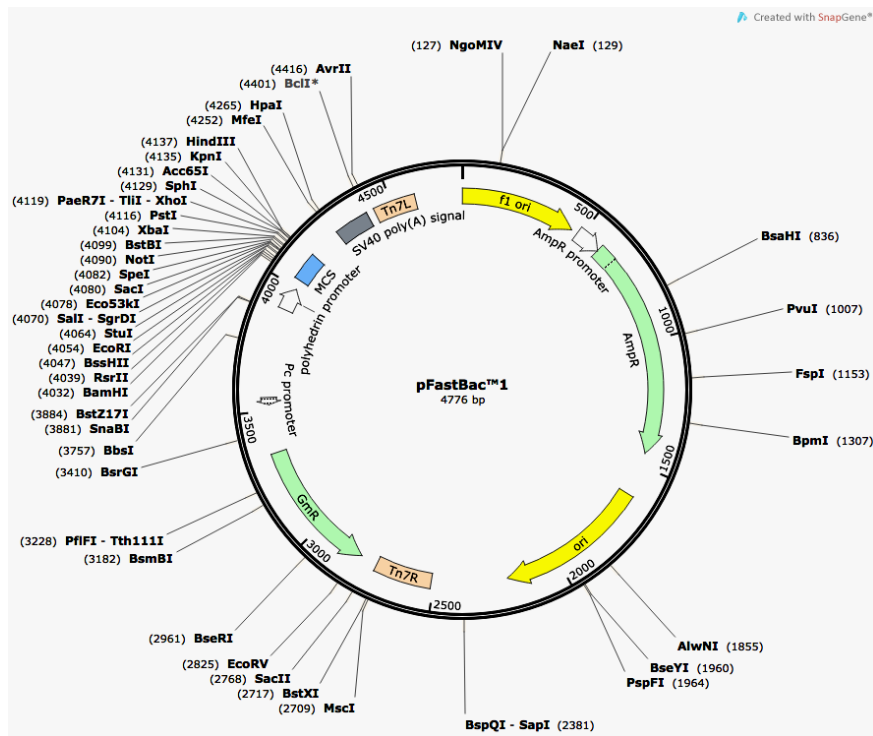
3.1 Φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης στα συστήματα έκφρασης

3.1.1 Φορείς που χρησιμοποιούνται στο σύστημα έκφρασης βακτουλοϊού Bac-to-Bac®

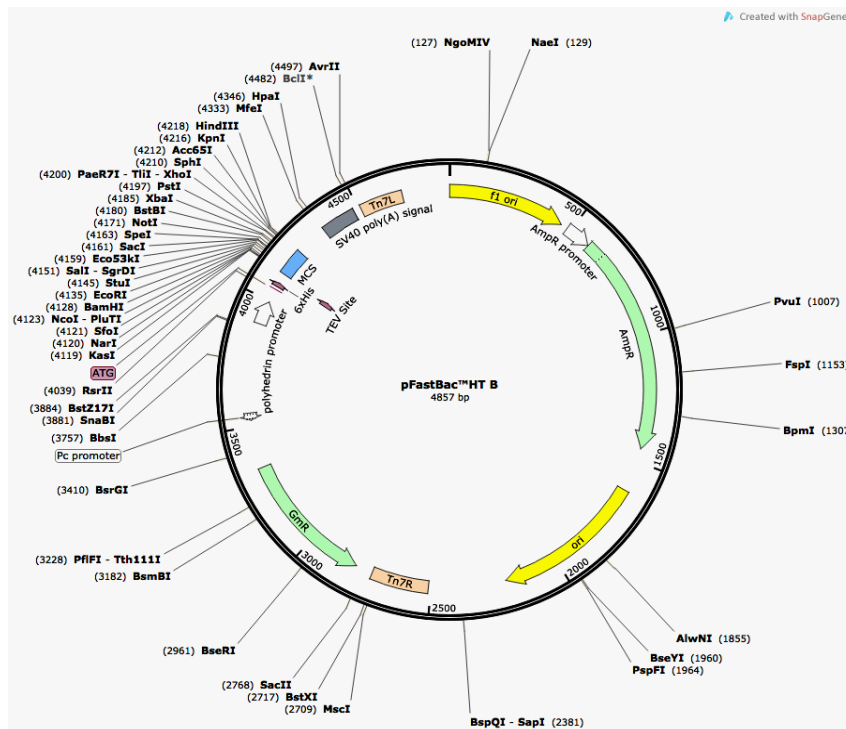
Το πρώτο σημαντικό συστατικό του συστήματος έκφρασης με βακτουλοϊό είναι ένας φορέας pFastBac™ στον οποίο κλωνοποιείται το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι φορέων pFastBac™, ο pFastBac™ 1 και ο pFastBac™ HTb. Στον πρώτο κλωνοποιήθηκε το cDNA της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α της PI3K, ενώ στον δεύτερο κλωνοποιήθηκε το cDNA της καταλυτικής υπομονάδας, τόσο της φυσιολογικής όσο και αυτών που φέρουν τις μεταλλάξεις E545K και H1047R.

Ο pFastBac™ 1 (Εικόνα 3.1, Invitrogen) φέρει τον ισχυρό υποκινητή της πολυεδρίνης του βακτουλοϊού από τον οποίο εξαρτάται η έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου, και το σήμα πολυαδενυλίωσης του *Simian virus 40* (SV40) που είναι υπεύθυνο για την λήξη της μεταγραφής και την πολυαδενυλίωση του mRNA. Επιπρόσθετα, φέρει τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και στην γενταμυκίνη, γονίδια επιλογής για τα βακτήρια *E.coli* που περιέχουν το πλασμίδιο και για τα στελέχη DH10Bac™ *E. coli* που περιέχουν το ανασυνδυασμένο bacmid, αντίστοιχα. Οι σύντομες Tn7 ακολουθίες που υπάρχουν δεξιά (Tn7R) και αριστερά (Tn7L) της κασέτας έκφρασης του γονιδίου επιτρέπουν την μετάθεση ειδικής θέσης στο γονιδίωμα του ιού (bacmid).

Ο pFastBac™ HTb (Εικόνα 3.2, Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης, τόσο της φυσιολογικής όσο και των πιο συχνών μεταλλαγών της E545K και H1047R. Το πλασμίδιο αυτό φέρει όλα τα γενετικά στοιχεία του παραπάνω φορέα, όμως σε αντίθεση με αυτό αποτελεί φορέα σύντηξης, καθώς η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που προκύπτει φέρει στο αμινοτελικό άκρο της την ετικέτα από 6 ιστιδίνες, που κωδικοποιούνται από το πλασμίδιο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο καθαρισμός της συντηγμένης πρωτεΐνης σε στήλη νικελίου. Η θέση αναγνώρισης TEV επιτρέπει την αφαίρεση της N-τελικής ετικέτας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας την AcTEV™ πρωτεάση.

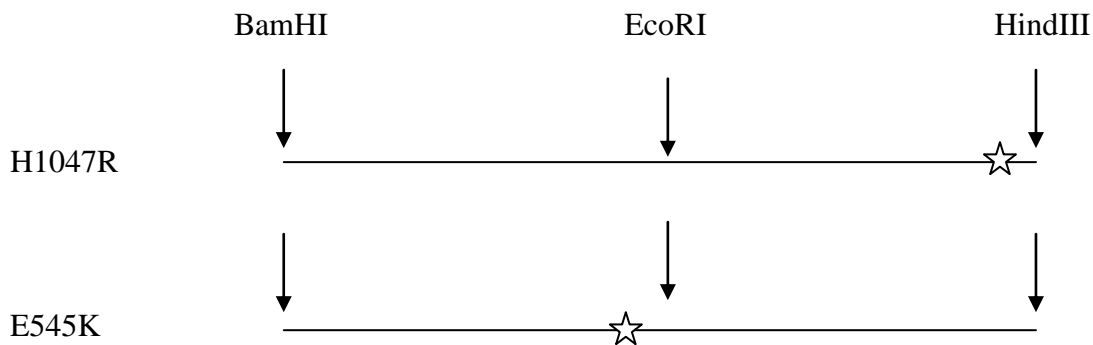


Εικόνα 3.1: Γενετικός χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pFastBac™ 1. Το cDNA της p85α κλωνοποιείται στην θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS).



Εικόνα 3.2: Γενετικός χάρτης του pFastBac™ HTb φορέα κλωνοποίησης. Η καταλυτική υπομονάδα, στην φυσιολογική και στις δυο πιο συχνές μεταλλαγμένες μορφές της, κλωνοποιείται στην θέση MCS.

Τα πλασμίδια με τις κλωνοποιημένες αλληλουχίες των E545K και H1047R αγοράστηκαν από την Addgene, ενώ η αλληλουχία της p85α κλωνοποιήθηκε στον pFastBac1. Το πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία της φυσιολογικής υπομονάδας p110α, προέκυψε από την συνδυασμό των δυο πλασμιδίων που φέρουν τις μεταλλάξεις κατά το ακόλουθο σχήμα (Εικόνα 3.3):



Εικόνα 3.3: Στην εικόνα απεικονίζονται τα ενθέματα (*inserts*) των πλασμυδιακών φορέων που φέρουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου *PIK3CA*. Με τα βέλη σημαίνονται οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων, ενώ με τα άστρα σημειώνονται οι θέσεις των μεταλλάξεων. Τα ενθέματα έχουν ίδιο μέγεθος και μπορούν να αφαιρεθούν από τον φορέα με τη χρήση των *BamH I* και *Hind III* στα άκρα τους.

Για την παραγωγή, συνεπώς, του φορέα με την φυσιολογική PI3K το τμήμα (*BamH I*, *EcoRI*) του άνω ενθέματος κλωνοποιείται στην αντίστοιχη θέση του κάτω ενθέματος, απαλείφοντας έτσι τη μεταλλαγή E545K και δημιουργώντας τη φυσιολογική υπομονάδα.

3.1.2 Φορείς που χρησιμοποιούνται στο σύστημα έκφρασης στην κυτταρική σειρά HEK293

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα έκφρασης στα κύτταρα HEK293, ήταν ο pEGFP-C1 από την Clontech. Στον φορέα αυτόν κλωνοποιήθηκε το cDNA της *PIK3CA* που φέρει τη μεταλλαγή E545K, διαδικασία από την οποία θα προκύψει η μεταλλαγμένη υπομονάδα της p110α, συντηγμένη με την πρωτεΐνη EGFP στο αμινοτελικό της άκρο.

3.2 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν δυο στελέχη βακτηρίων *E. coli*, τα DH10B, για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και τα επιδεκτικά MAX Efficiency® DH10Bac™, για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων του βακουλοϊού (bacmid) και την έκφραση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Στα DH10B, έγινε η παραγωγή τόσο των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μετέπειτα παραγωγή των ανασυνδυασμένων βακουλοϊών, όσο και η παραγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης PI3K-E545K στα HEK293 κύτταρα.

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB (1% Tryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl, pH=7), σε υγρές ή στερεές καλλιέργειες (με προσθήκη 1,5% agar) στους 37 °C. Για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων προστίθεται στο θρεπτικό μέσο κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού/αντιβιοτικών, στα οποία έχουν ανθεκτικότητα μόνο τα μετασχηματισμένα στελέχη.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων DH10Bac™ που φέρουν τους ανασυνδυασμένους φορείς, μπορεί να γίνει και με την προσθήκη στο μέσο, υποστρωμάτων ενζυμικών χρωματικών αντιδράσεων (πχ. Bluo-gal). Τα στελέχη DH10Bac™ αναπτύσσονται παρουσία IPTG και Bluo-gal, έτσι ώστε να επιλεγούν οι κατάλληλες αποικίες με τα ανασυνδυασμένα bacmid (άσπρες αποικίες) σε ένα σύνολο άσπρων-μπλε αποικιών. Το Bluo-gal, παρουσία ενεργής β-γαλακτοσιδάσης, υδρολύεται και παράγει ένα μπλε προϊόν (μπλε αποικίες). Τα στελέχη αυτά (§ 3.3) περιέχουν τον παλινδρομικό φορέα του βακουλοϊού (bacmid) που φέρει τον lacZa παράγοντα, υπεύθυνο για την παραγωγή ενεργού ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης, λόγω της συμπληρωματικότητας που παρέχει στο ελλειμματικό γονίδιο που φέρει το γονιδίωμα αυτών των βακτηρίων. Στα ανασυνδυασμένα bacmid, η αλληλουχία που κωδικοποιεί αυτόν τον παράγοντα διακόπτεται από την μετάθεση ειδικής θέσης που συμβαίνει μεταξύ του bacmid και του φορέα pFastBac, με αποτέλεσμα να μην παράγεται ενεργό ένζυμο (άσπρες αποικίες).

Τα βακτήρια μπορούν να διατηρηθούν παρουσία γλυκερόλης στους -80 °C, για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

3.3 Το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac®

Το σύστημα έκφρασης Bac-to-Bac® αποτελεί μία ταχεία και αποτελεσματική μέθοδο για την παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών. Σε πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται ένας φορέας pFastBac στον οποίο κλωνοποιείται το γονίδιο της πρωτεΐνης-στόχου, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πολυεδρίνης. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό ειδικού στελέχους *E. coli*, του DH10Bac, το οποίο περιέχει έναν παλινδρομικό φορέα του γονιδιώματος του βακουλοϊού (bacmid) και ένα βοηθητικό πλασμίδιο. Στη συνέχεια, ακολουθεί μετάθεση ειδικής θέσης του τμήματος του pFastBac που φέρει το γονίδιο στο bacmid, με τη βοήθεια του βοηθητικού πλασμιδίου που κωδικοποιεί την υπεύθυνη πρωτεΐνη για αυτήν τη διαδικασία. Με αυτό τον τρόπο παράγονται τα ανασυνδυασμένα bacmids που περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαμόλυνση των κατάλληλων κυττάρων εντόμου (Sf9). Το αποτέλεσμα της διαμόλυνσης είναι η παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών πρώτης γενιάς, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του ιού και την παραγωγή δεύτερης και τρίτης γενιάς ιών. Η τρίτη γενιά θεωρείται υψηλός τίτλος ιού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μολύνει κύτταρα εντόμων για μεγάλης κλίμακας έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Invitrogen, 2013).

3.3.1 Καλλιέργεια των Sf9 κυττάρων του εντόμου *Spodoptera frugiperda*

Τα Sf9 κύτταρα προέρχονται από ιστό των ωοθηκών του εντόμου *Spodoptera frugiperda* και αποτελούν κλώνο των Sf21 κυττάρων. Αναπτύσσονται σε φλάσκες T75 σε 15-20 ml θρεπτικό υλικό Sf-900™ III SFM της Gibco™ (χωρίς ορό, με την προσθήκη των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη), με πυκνότητα επίστρωσης $1-2 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.

Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε βαθμό που να καλύπτεται το 90-100% της επιφάνειας της φλάσκας (2-3 ημέρες στους 27 °C), γίνεται αποκόλλησή τους και επίστρωση σε νέα φλάσκα, με την επιθυμητή αραίωση (1:2-1:4). Συγκεκριμένα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα αποκολλώνται με χτύπημα της φλάσκας και συλλέγονται με συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού σε φάλκον, και κατόπιν μοιράζονται στην κατάλληλη ποσότητα σε νέες φλάσκες, που περιέχουν την επίσης κατάλληλα υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού.

Για την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα μεταφέρονται στους -80 °C. Από μια γεμάτη φλάσκα συλλέγεται το θρεπτικό μέσο, ενώ τα κύτταρα αποκολλώνται

με χτύπημα και επαναιωρούνται σε 5 ml από αυτό το θρεπτικό. Έπειτα, φυγοκεντρώνονται στις 1000 rpm για 7 λεπτά. Ετοιμάζεται το freezing media, το οποίο αποτελείται από 46 % θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, 46 % φρέσκο θρεπτικό μέσο και 7,5 % DMSO. Το υπερκείμενο από την φυγοκέντρηση των κυττάρων απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται με 1 ml από το freezing media. Τα κύτταρα μεταφέρονται στους -80 °C.

Η επανακαλλιέργεια σε κανονική θερμοκρασία γίνεται με επώαση του παγωμένου vial σε υδατόλουτρο (37 °C) μέχρι να ξεπαγώσει, και μεταφορά του περιεχομένου του σε φάλλον με 5 ml θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 5 λεπτά στους 25 °C. Το υπερκείμενο πετιέται, ενώ το ίζημα επαναιωρείται σε 5-10 ml θρεπτικού μέσου και μεταφέρεται σε φλάσκα που περιέχει 10 ml φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Οι χειρισμοί των παραπάνω διαδικασιών γίνονται σε εστία νηματικής ροής (hood) υπό άσηπτες συνθήκες.

3.3.2 Διαμόλυνση των Sf9 κυττάρων για την παραγωγή ανασυνδυασμένων ιών

Για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων ιών τα bacmids που φέρουν τα γονίδια των υπό έκφραση υπομονάδων (p110a, p110a-E545K, p110a-H1047R, p85a) χρησιμοποιούνται για την διαμόλυνση κυττάρων Sf9. Για την επιτυχή διαμόλυνσή τους, τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η διαδικασία γίνεται σε 6-well πιάτα, με το κάθε πηγαδάκι να είναι επιστρωμένο με $\sim 8 \cdot 10^5$ κύτταρα. Έτσι, τα κύτταρα μεταφέρονται από τις φλάσκες, επιστρώνονται στην επιθυμητή ποσότητα στα πηγαδάκια και αφήνονται να προσκολληθούν για 30 λεπτά. Παράλληλα, παρασκευάζεται το plating medium με σύσταση 15% Supplemented Grace's Insect Medium (με 10% ορό FBS, χωρίς αντιβιοτικά) και 85% Unsupplemented Grace's Insect Medium (χωρίς ορό και αντιβιοτικά). Με το πέρας των 30 λεπτών, το θρεπτικό απομακρύνεται και σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται 2,5 ml plating medium. Έπειτα ετοιμάζεται το μίγμα λιπιδίου-DNA. Το διάλυμα κατιονικού λιπιδίου Cellfectin® II Reagent αναμιγνύεται με το Unsupplemented Grace's Medium (8 μl λιπιδίου σε 100 μl θρεπτικό ανά πηγαδάκι) και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Αναμιγνύονται 2 μg από το κάθε bacmid με 100 μl με το Unsupplemented Grace's Medium και το μίγμα ανακινείται. Το διάλυμα με το λιπίδιο αναμιγνύεται με το διάλυμα του DNA, και αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ~ 210 μl από αυτό προστίθεται σε σταγόνες στο κάθε πηγαδάκι και επώαζεται για 4 ώρες στους 27 °C. Στη συνέχεια, το μίγμα αφαιρείται και στο κάθε πηγαδάκι προστίθεται 2,5 ml Sf-900™ III SFM (με τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη). Τα κύτταρα επώαζονται στους 27 °C, παρατηρούνται καθημερινά

για σημάδια της μόλυνσης και συλλέγονται μετά από 5 μέρες. Ως μάρτυρες της διαμόλυνσης και της μετέπειτα παραγωγής των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται bacmid που έχει ανασυνδυαστεί με τον άδειο φορέα pFastBac HTb και κύτταρα που δεν έχουν διαμολυνθεί.

Η συλλογή του ιού γίνεται με αναρρόφηση του υπερκείμενου και φυγοκέντρωση του για 5 λεπτά στις 500 g, για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθείται από φίλτρο 0,22 μm και συλλέγεται σε φάλκον, στο οποίο προστίθεται 2% ορός FBS και φυλάσσεται με αλουμινόχαρτο στους 4 °C, καθώς ο ιός είναι φωτοευαίσθητος. Αυτό αποτελεί την πρώτη γενιά του ιού P1.

Τα κύτταρα από τα πιάτα επίσης συλλέγονται, μετά την συλλογή του ιού, για τον έλεγχο παραγωγής της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, προστίθεται 1 ml PBS σε κάθε πηγαδάκι, συλλέγονται τα κύτταρα και φυγοκεντρώνονται στις 1700 rpm για 6 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, και το ίζημα επαναιωρείται με 1 ml PBS και φυγοκεντρείται ξανά στις ίδιες συνθήκες. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται με διπλάσια ποσότητα όγκου διαλύματος λύσης (PBS+ 0,2% Triton), με επώαση του στους 4 °C, υπό κίνηση για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm, στους 4 °C για 2 λεπτά, και τέλος συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο φέρει το εκχύλισμα των πρωτεϊνών.

3.3.3 Επιμόλυνση των Sf9 κυττάρων με τον ιό για την παραγωγή υψηλότερου τίτλου ιού και παραγωγή της πρωτεΐνης

Η P1 γενιά του ιού χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση Sf9 κυττάρων σε φλάσκες T75 με πυκνότητα επικάλυψης 50-60 % της φλάσκας και με αλλαγή του μισού θρεπτικού με φρέσκο. Χρησιμοποιούνται 500 μl από τον κάθε ανασυνδυασμένο ιό (και από το control), τα οποία προστίθενται στις φλάσκες και ανακινούνται. Ακολουθεί επώαση τους στους 27 °C. Μετά από 5 ημέρες, ο ιός απομονώνεται, με την διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω, και αυτό αποτελεί την P2 γενιά του ιού. Τα κύτταρα, επίσης, συλλέγονται με την παραπάνω διαδικασία με την αύξηση της ποσότητας των διαλυμάτων, ανάλογη προς την αύξηση του αριθμού των κυττάρων.

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και η παραγωγή της P3 γενιάς του ιού (με τη διαφορά ότι συλλέγεται μετά από 3 ημέρες, ανάλογα με την εικόνα των επιμολυσμένων κυττάρων). Η γενιά αυτή θεωρείται η ιδανικότερη για την παραγωγή της πρωτεΐνης, αφενός επειδή ο τίτλος του ιού είναι υψηλός, και αφετέρου επειδή οι ιοί μεγαλύτερης γενιάς μπορεί να φέρουν επιβλαβείς μεταλλάξεις. Για την παραγωγή της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες (10μl, 30μl, 90μl) από κάθε ιό της γενιάς αυτής και διαφορετικοί χρόνοι συλλογής

των κυττάρων (24, 48 και 72 ώρες). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν έγινε επιμόλυνση, αλλά και κύτταρα επιμολυσμένα με τον ιό που παράχθηκε με τον άδειο φορέα pFastBac HTb (30μl). Χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 6-well, στα οποία είχαν επιστρωθεί κύτταρα σε υπολογισμένες ποσότητες. Τα κύτταρα συλλέγονται όπως αναφέρεται παραπάνω, και το εκχύλισμα πρωτεΐνης μετράται με τη μέθοδο Bradford.

3.4 Σύστημα έκφρασης σε ευκαρωτικά κύτταρα HEK293

3.4.1 Καλλιέργεια HEK293 κυττάρων

Η κυτταρική σειρά HEK293 προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού, τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με DNA του αδενοϊού τύπου 5. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο DMEM της Gibco™ (με την προσθήκη 10% ορού FCS, παρουσία των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη και γλουταμίνης) σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C.

3.4.2 Διαμόλυνση HEK293 κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-C1

Για την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pEGFP-C1, που φέρει το γονίδιο της p110a με τη μεταλλαγή E545K, χρησιμοποιήθηκε το κατιονικό πολυμερές της πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους, χωρίζονται μία μέρα πριν την διαμόλυνση και μεταφέρονται σε 6-well πιάτα, όπου θα πρέπει να έχουν καλύψει περίπου το 50% της επιφάνειας του κάθε πηγαδιού πριν ξεκινήσει η διαδικασία της διαμόλυνσης. Κρίθηκε σκόπιμο να συλλεχθούν τα κύτταρα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την διαμόλυνσή τους (24, 48 και 72 ώρες μετά), παρακολουθώντας τον φθορισμό, λόγω της EGFP, καθημερινά.

Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικές αραιώσεις της PEI. Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα 25% PEI σε νερό. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το working solution, το οποίο αποτελείται από 9 μl του διαλύματος PEI (25%) διαλυμένο σε 500 μl νερό. Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος του πολυμερούς, χρησιμοποιείται 1 μl από το working solution της PEI, το οποίο αναμιγνύεται με 55 μl θρεπτικού μέσου DMEM (χωρίς ορό), ποσότητες υπολογισμένες για 1 πηγαδάκι. Έπειτα, παρασκευάζεται το διάλυμα που φέρει το πλασμιδιακό DNA με προσθήκη 1,8 μg DNA σε 9 μl θρεπτικού μέσου DMEM (χωρίς ορό). Τα διαλύματα της PEI και του DNA αναμιγνύονται καλά και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο DNA-πολυμερούς.

Από κάθε πηγαδάκι αφαιρείται το ~70% του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (με ορό) που περιέχει, και όταν ολοκληρωθεί η επώαση του μίγματος DNA-πολυμερούς, το σύμπλοκο που προκύπτει προστίθεται σε σταγόνες σε αυτό, το πιάτο ανακινείται καλά και επωάζεται στους 37 °C για 3 ώρες. Έπειτα, προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό (με ορό) στο κάθε πηγαδάκι, σε ποσότητα ανάλογη αυτής που είχε αφαιρεθεί, ώστε ο συνολικός όγκος να αντιστοιχεί στις κανονικές συνθήκες καλλιέργειας. Το πιάτο επωάζεται στους 37 °C, και τα πηγαδάκια παρατηρούνται ανά 24 ώρες για φθορισμό, ώστε να αποφασιστεί ο χρόνος συλλογής των κυττάρων.

Για την συλλογή των κυττάρων από το πηγαδάκι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό προσεκτικά, γιατί τα κύτταρα αποκολλώνται εύκολα. Ακολουθεί μία πλύση με 1 ml PBS, και αναρροφάται. Τα κύτταρα συλλέγονται με 300 µl διαλύματος λύσης (PBS και 0,2% Triton) και φυγοκεντρώνται στις 12000 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο βρίσκεται το εκχύλισμα πρωτεϊνών και ακολουθεί μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

3.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting) και αντίδραση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)

Για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα δυο συστήματα έκφρασης, το ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και έπειτα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επωάζεται αρχικά με το πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, και στη συνέχεια με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP). Το δευτερογενές αντίσωμα ανιχνεύει το πρωτογενές αντίσωμα, και η δράση της συζευγμένης σε αυτό υπεροξειδάσης είναι υπεύθυνη για την εκπομπή φωτός.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- το PI3K p85α (N-18) πολυκλωνικό IgG αντίσωμα κατσίκας (Santa Cruz Biotechnology), που είναι ειδικό για έναν επίτοπο κοντά στο αμινοτελικό άκρο της ανθρώπινης p85α και χρησιμοποιήθηκε ως πρωτογενές αντίσωμα με αραιώση 1:200.

- το συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP) IgG (H+L) πολυκλωνικό αντίσωμα βοειούς (Jackson Immunoresearch), που είναι ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κατσίκας και χρησιμοποιήθηκε ως δευτερογενές με αραιώση 1:5000.
- το PI3K p110α (H-201) πολυκλωνικό IgG αντίσωμα κουνελιού (Santa Cruz Biotechnology), που είναι ειδικό για έναν επίτοπο κοντά στο αμινοτελικό άκρο της ανθρώπινης p110α, που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτογενές αντίσωμα με αραιώση 1:200
- το συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP) IgG (H+L) πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας (Jackson Immunoresearch), που είναι ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κουνελιού και χρησιμοποιήθηκε ως δευτερογενές με αραιώση 1:5000
- το αντίσωμα κουνελιού ειδικό για την GFP (Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ") που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτογενές με αραιώση 1:1000.

Μετά την επώαση με τα αντισώματα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με ένα διάλυμα δύο αντιδραστηρίων ECL (Roche) τα οποία αναμιγνύονται σε ισόποσες ποσότητες. Το ένα αποτελεί ένα διάλυμα υπεροξειδίου και το άλλο ένα διάλυμα ενισχυτή του σήματος. Η διάρκεια της επώασης είναι λίγα λεπτά (συνήθως 5 λεπτά) και γίνεται σε συνθήκες έλλειψης φωτός, όπου και πραγματοποιείται η αντίδραση χημειοφωταύγειας μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται φως από την ενζυματική δράση της HRP, το οποίο ενισχύεται από τον ενισχυτή του σήματος. Στη συνέχεια, η μεμβράνη μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο, όπου πραγματοποιείται η εμφάνιση του σήματος της αντίδρασης πάνω σε ειδικά φιλμ.

3.6 Δοκιμασία της δράσης της PI3 κινάσης *in vitro*

3.6.1 Βασικές αρχές της μεθόδου

Ο βαθμός της επίδρασης διαφόρων μορίων ή ουσιών στην ενεργότητα της κινάσης είναι δυνατόν να μετρηθεί με την *in vitro* δοκιμασία της ενεργότητας της κινάσης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της δράσης και των 4 ισομορφών της τάξης I της φυσιολογικής PI3K κινάσης, αλλά και της μεταλλαγμένης μορφής της.

Η μέθοδος στηρίζεται στη φυσιολογική λειτουργία της κινάσης να φωσφορυλιώνει το PIP2 και να το μετατρέπει σε PIP3. Συγκεκριμένα για την δοκιμασία αυτή, χρησιμοποιούνται πιάτα επικαλυμμένα με γλουταθειόνη (GSH), στα οποία γίνεται σταδιακά η δέσμευση μορίων

που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Αρχικά, στα πιάτα προσδένεται η GST-GRP1, μια συντηγμένη πρωτεΐνη που αποτελείται από την GST (Glutathione S-transferase) πρωτεΐνη, που δεσμεύει με υψηλή συγγένεια τη γλουταθειόνη, και από την GRP1 (General Receptor of Phosphoinositides 1) πρωτεΐνη, η οποία φέρει την περιοχή ομολογίας με την πλεκστρίνη (PH domain) που δεσμεύει επιλεκτικά και ισχυρά το PIP3. Στη συνέχεια, στα πιάτα προσδένεται το βιοτινυλιωμένο PIP3 (biotin-PIP3, b-PIP3), το οποίο δεσμεύεται στην GRP1. Η βιοτίνη που φέρει αυτό, δεσμεύεται παράλληλα από τη συντηγμένη με την HRP στρεπταβιδίνη. Παρουσία κατάλληλου υποστρώματος, όπως του OPD που χρησιμοποιείται σε αυτήν την δοκιμασία, η αντίδραση με την HRP παράγει ένα προϊόν που έχει μέγιστη απορρόφηση στα 492 nm.

Η μέθοδος είναι ανταγωνιστική καθώς το PIP3 και το b-PIP3 ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την θέση πρόσδεσης στην GRP1. Έτσι, παρουσία ενεργής κινάσης, το PIP3 που παράγεται εμποδίζει την πρόσδεση του b-PIP3 (που προσδένει την στρεπταβιδίνη-HRP και παράγει κίτρινο χρώμα), με αποτέλεσμα το χαμηλό σήμα κατά την μέτρηση στα 492 nm. Παρουσία κάποιου αναστολέα της κινάσης, τα πράγματα αντιστρέφονται, και το b-PIP3 που υπερτερεί σε ποσότητα από το PIP3, δίνει υψηλότερο σήμα κατά την μέτρηση στα 492 nm.

3.6.2 Μέθοδος της *in vitro* δοκιμασία της δράσης του ενζύμου

Παρακάτω στον **Πίνακα 3.1**, παρουσιάζονται τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας:

Πίνακας 3.1: Προετοιμασία των διαλυμάτων και η τελική σύσταση τους για την *in vitro* δοκιμασία της PI3K.

Διάλυμα	Σύσταση διαλύματος
TBS+0,2% gelatin	50 mM Tris pH=7.4, 150 mM NaCl και 0,2% gelatin σε απιονισμένο H ₂ O
TBST+0,2 % gelatin	50 mM Tris pH=7.4, 150 mM NaCl 0,2% gelatin και 0,05% Tween 20 σε απιονισμένο H ₂ O
GST-GRP1	1 µg/100 µl TBS + 0,2 % gelatin
5x reaction buffer	250 mM Tris pH=7.4, 10 mM MgCl ₂
ATP	1 mM (1 µl 100 mM ATP σε 99 µl H ₂ O)
PIP2+lipids	40 ng/µl σε H ₂ O

PI3K wt	2,5 ng/ μ l σε 25 mM Hepes pH=7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mg/ml BSA
PI3K mutant	2,5 ng/ μ l σε 25 mM Hepes pH=7.5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mg/ml BSA
b-PIP3	0,25 ng/ μ l σε TBS +0,2% gelatin
Streptavidin-HRP	1:500 σε PBS και 1% BSA
OPD	6,075 ml κιτρικού οξέος (2,1 g/100 ml H ₂ O) , 6,425 ml Na ₂ HPO ₄ (2,87 g/100 ml H ₂ O) και 12,5 ml H ₂ O

Αρχικά, γίνεται το μπλοκάρισμα των πηγαδιών γλουταθειόνης με την προσθήκη του διαλύματος TBST+0,2% gelatin (220 μ l/πηγαδάκι), το οποίο αφήνεται για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό κίνηση. Στη συνέχεια τα πηγαδάκια ξεπλένονται με TBS+0,2% gelatin (220 μ l/πηγαδάκι) 2 φορές, και προστίθεται σε αυτά 100 μ l διάλυμα GST-GRP1 (1 μ g πρωτεΐνης/πηγαδάκι) και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, υπό κίνηση.

Στο χρονικό διάστημα αυτό, παρασκευάζονται τα διαλύματα τα οποία θα προστεθούν στα σωληνάρια (αριθμημένα κατά αντιστοιχία με τα πηγαδάκια), στα οποία γίνεται και η αντίδραση. Τα πρώτα 8 δείγματα που ετοιμάζονται χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για την αντίδραση, ενώ μετά από αυτά το κάθε υπό μελέτη μόριο (compound) εξετάζεται ανά τριπλέτα, στην ίδια συγκέντρωση. Στο ίδιο πείραμα μπορεί να μελετηθεί το ίδιο μόριο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά και περισσότερα μόρια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.2**), φαίνεται η σύσταση των σωληναρίων της αντίδρασης:

Πίνακας 3.2: Ποσότητες των αντιδραστηρίων σε κάθε σωληνάριο.

Σωληνάριο	5x reaction buffer (μ l)	1 mM ATP (μ l)	BSA 10% (μ l)	PIP2 +lipids 40 ng/ μ l (μ l)	PI3K wt/mutant 2,5 ng/ μ l (μ l)	DMSO 100% (μ l)	H ₂ O (μ l)	Compound (μ l)
1	5	2,5	2	5	-	1	9,5	-
2	5	2,5	2	5	-	1	9,5	-
3	5	2,5	2	5	2	1	7,5	-
4	5	2,5	2	5	2	1	7,5	-
5	5	2,5	2	5	2	1	7,5	-
6	5	2,5	2	5	2	1	7,5	-
7	5	2,5	2	5	1	1	8,5	-

8	5	2,5	2	5	1	1	8,5	-
9,10,11	5	2,5	2	5	2	-	7,5	1

Τα δείγματα-μάρτυρες εξετάζονται διπλά. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα 1 και 2 αποτελούν αρνητικούς μάρτυρες της αντίδρασης, καθώς δεν περιέχουν καθόλου κινάση. Τα δείγματα 3 και 4 αντιπροσωπεύουν την αντίδραση σε αρχικό χρόνο $t=0$, ενώ τα δείγματα 5 και 6 σε τελικό χρόνο $t=8$ λεπτά. Τέλος, στα δείγματα 7 και 8 πραγματοποιείται η αντίδραση με την μισή ποσότητα κινάσης.

Στο σημείο αυτό, το μόνο που δεν έχει προστεθεί στα σωληνάρια ακόμα είναι το υπόστρωμα της κινάσης (PIP2+lípids). Τα σωληνάρια μεταφέρονται στο υδατόλουτρο στους 25 °C για 10 λεπτά, ενώ παράλληλα ετοιμάζονται τα διαλύματα διακοπής.

Για τα δείγματα 1 και 2, το διάλυμα διακοπής περιέχει: 57 μl TBS (χωρίς gelatin), 10 μl 10% BSA in TBS, 7 μl sodium deoxycholate 10% και 1μl 0,5M EDTA pH=8.0 για κάθε δείγμα. Για τα υπόλοιπα δείγματα ετοιμάζεται διάλυμα διακοπής ώστε σε κάθε δείγμα να αντιστοιχούν οι παρακάτω ποσότητες: 55,8 TBS, 10 μl 10% BSA in TBS, 7 μl sodium deoxycholate 10% και 1,2 μl 0,25 ng/μl b-PIP3.

Για την αντίδραση στο υδατόλουτρο ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- στα δείγματα 3,4 προστίθενται 75 μl διαλύματος διακοπής και έπειτα 5 μl PIP2
- στα δείγματα 1,2 προστίθενται 5 μl PIP2
- στα υπόλοιπα δείγματα προστίθενται 5 μl PIP2, ανά 15'' με χρονόμετρο, ώσπου να συμπληρωθούν 8 λεπτά αντίδρασης
- μόλις συμπληρωθούν 8 λεπτά στο χρονόμετρο, προστίθενται 75 μl διαλύματος διακοπής και στα υπόλοιπα δείγματα, ανά 15'' ώστε ο χρόνος αντίδρασης σε κάθε σωληνάριο να είναι 8 λεπτά

Ο συνολικός όγκος σε αυτά είναι 100 μl.

Τα πηγαδάκια ξεπλένονται με TBST+0,2% gelatin (220 μl) 4 φορές, και 2 φορές με TBS+0,2% gelatin (220 μl). Το περιεχόμενο των σωληναρίων μεταφέρεται σε αυτά κατά αντιστοιχία και επωάζονται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (υπό κίνηση). Έπειτα, ακολουθούν 3 πλύσεις με TBST+0,2% gelatin και 2 με TBS+0,2% gelatin. Στα πηγαδάκια προστίθενται 100 μl διαλύματος streptavidin-HRP και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά, υπό κίνηση. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των 40 λεπτών, ακολουθούν πλύσεις στα πηγαδάκια 3 φορές με TBST+0,2% gelatin (220μl) και 2 φορές με TBS+0,2% gelatin (220μl). Ακριβώς, πριν την προσθήκη του OPD στα πηγαδάκια, προστίθενται σε αυτό 10 μl H₂O₂ 30% (για 25 ml OPD), και έπειτα προστίθενται 200 μl από αυτό σε κάθε πηγαδάκι. Τα

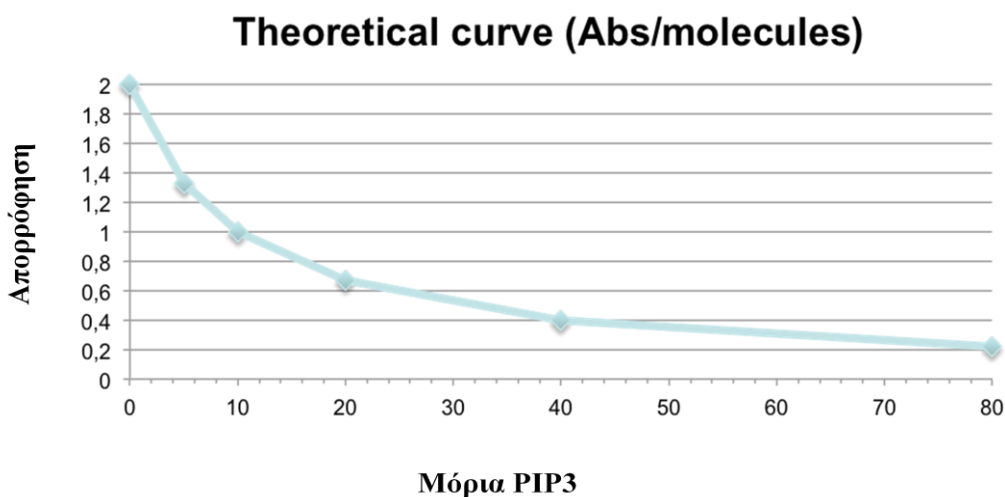
δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά, η αντίδραση σταματάει με προσθήκη 50 μl 1M (2N) H₂SO₄. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής μετρώνται στα 492 nm (Elisa reader) και καταγράφονται.

3.6.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των τιμών της απορρόφησης στα 492 nm μεταφέρονται σε υπολογιστικά φύλλα Excel. Για τον υπολογισμό της δράσης της κινάσης οι απορροφήσεις κανονικοποιούνται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Κανονικοποιημένη απορρόφηση} = \frac{\text{απορρόφηση στα 492 nm} * 2}{\text{απορροφήσεων για t=0}}$$

Η κανονικοποιημένη απορρόφηση έχει κλίμακα από 0 έως 2. Το 0 αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό μορίων PIP3, ενώ το 2 στο μέγιστο αριθμό μορίων b-PIP3. Με βάση αυτές τις απορροφήσεις και την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης (**Εικόνα 3.4**), υπολογίζονται εν συνεχεία τα μόρια PIP3 που αντιστοιχούν σε αυτές.



Εικόνα 3.4: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης και αριθμού μορίων PIP3.

Στη συνέχεια, προσδιορίζεται η % αναστολή της κινάσης, και άρα η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή της κινάσης} = (\mu.ο \text{ μορίων PIP3 για } t=8 \text{ λεπτά} - \text{μόρια PIP3 στην τιμή απορρόφησης}) / (\mu.ο. \text{ μορίων PIP3 για } t=8 \text{ λεπτά}) * 100$$

Εάν, το φάρμακο προκαλέσει σημαντική αναστολή της δράσης της κινάσης, τότε κρίνεται σκόπιμος ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50} του φαρμάκου.

3.6.4 Προσδιορισμός της τιμής IC_{50} των αναστολέων

Η τιμή IC_{50} αποτελεί ποσοτικό μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας να αναστέλλει μια συγκεκριμένης βιολογική ή βιοχημική διαδικασία κατά το ήμισυ. Χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του υπό εξέταση μορίου κατά την πειραματική διαδικασία, ενώ ο υπολογισμός της τιμής του IC_{50} γίνεται με υπολογιστικά προγράμματα (Sigma Plot).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Υπερέκφραση των υπομονάδων της PI3 κινάσης με το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac®

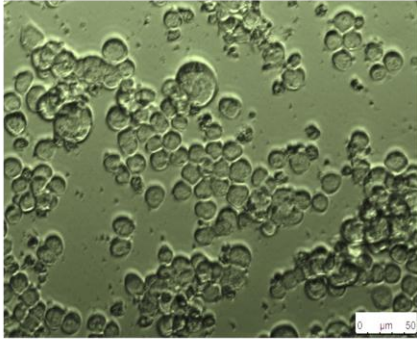
Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα εντόμου Sf9, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης βακουλοϊού Bac-to-Bac® (Invitrogen). Έτσι, οι πλασμιδιακοί φορείς στους οποίους έχουν κλωνοποιηθεί οι φυσιολογικές υπομονάδες της πρωτεΐνης p110α και p85α, ή η p110α με τις δυο πιο συχνές μεταλλάξεις της (E545K, H1047R), χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό ενός ειδικού στελέχους *E.coli*, το στέλεχος DH10Bac™, το οποίο φέρει τον παλινδρομικό φορέα του βακουλοϊού bMON14272 (bacmid) και ένα βοηθητικό πλασμίδιο (pMON7124). Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς, τα ανασυνδυασμένα bacmids προκύπτουν από την μετάθεση που συμβαίνει μεταξύ του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και του bacmid του βακουλοϊού, με τη βοήθεια του βοηθητικού πλασμιδίου, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταθετάση.

Τα ανασυνδυασμένα bacmids που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς Sf9. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο άδειος φορέας pFastBacHTb. Μετά την διαδικασία της διαμόλυνσης τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο ανά 24 ώρες για να διαπιστωθεί εάν υπήρχαν σημάδια μόλυνσης. Τα σημάδια αυτά περιλαμβάνουν αύξηση στο μέγεθος των κυττάρων και του πυρήνα (αρχικά σημάδια της μόλυνσης), εμφάνιση κοκκίων, στασιμότητα στην ανάπτυξη και αποκόλληση τους από την επιφάνεια του πιάτου (μετέπειτα σημάδια της μόλυνσης) και τέλος, λύση των κυττάρων (τελικό στάδιο της μόλυνσης). Τα σημάδια αυτά αναμένονται περίπου 3 ημέρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων, οπότε και συλλέχθηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας στο οποίο εκκρίνεται ο παραγόμενος ιός (πρώτη γενιά του ιού, P1).

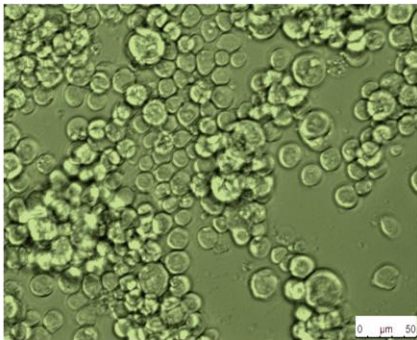
Επειδή τα σημάδια μόλυνσης δεν ήταν εμφανή κατά τις 3 πρώτες μέρες, τα κύτταρα αφέθηκαν σε καλλιέργεια, μετά τη διαμόλυνση, για 5 ημέρες και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν (**Εικόνα 4.1**). Αν και τα κύτταρα δεν είχαν έντονα τα σημάδια της μόλυνσης, ωστόσο παρατηρήθηκε σε ένα βαθμό αύξηση του μεγέθους τους, καθώς φαίνονταν πιο διογκωμένα, ενώ κάποιοι πυρήνες φαίνονταν να καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του κυττάρου σε σχέση με τους πυρήνες στα κύτταρα-μάρτυρες. Επιπλέον, στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το bacmid της p110α WT,

παρατηρήθηκε στασιμότητα στην περαιτέρω ανάπτυξή τους (παρατηρήθηκαν μεγάλα κενά στην επιφάνεια του πιάτου).

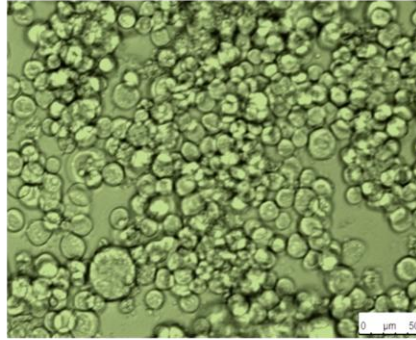
Control κύτταρα



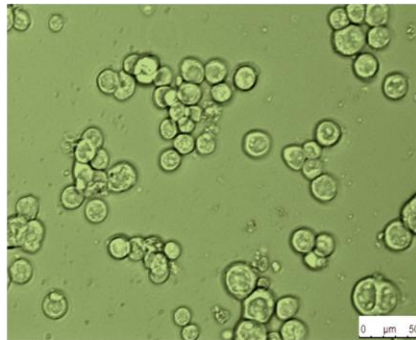
p110α H1047R



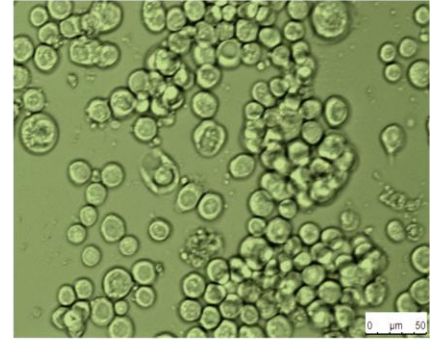
Άδειο bacmid



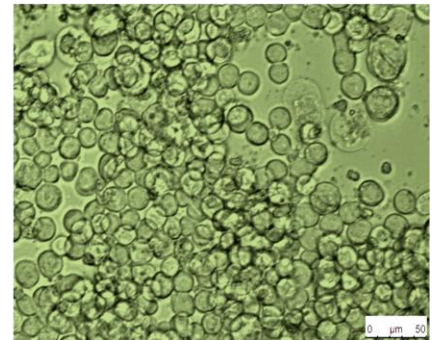
wt p110α



p110α E545K



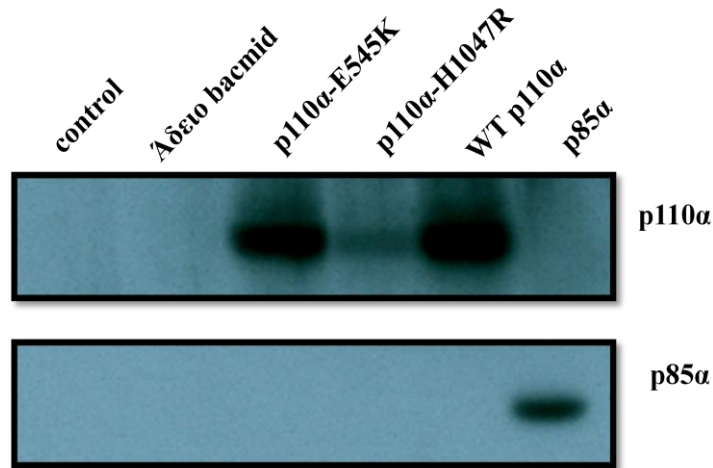
p85α



Εικόνα 4.1: Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων Sf9, έπειτα από διαμόλυνσή τους με τους ανασυνδυασμένους φορείς του βακουλοϊού: κύτταρα-μάρτυρες που δεν διαμολύνθηκαν (control), κύτταρα-μάρτυρες που διαμολύνθηκαν με το άδειο bacmid και κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το bacmid της p110α-E545K, της p110α-H1047R, της wt p110α ή της p85α, αντίστοιχα.

Πέρα από το υπερκείμενο της καλλιέργειας που συλλέχθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί για μόλυνση νέων κυττάρων, για παραγωγή ιού με υψηλότερο τίτλο, γενιάς P2, συλλέχθηκαν επίσης τα κύτταρα, στα οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης. Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, τα κύτταρα λύθηκαν και στη συνέχεια, το εκχύλισμα πρωτεϊνών που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Έπειτα, ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για τις επιθυμητές πρωτεΐνες (πολυκλωνικά αντι-p110α και αντι-p85α). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής φαίνονται στην **Εικόνα 4.2**.

Διαμόλυνση κυττάρων με bacmids

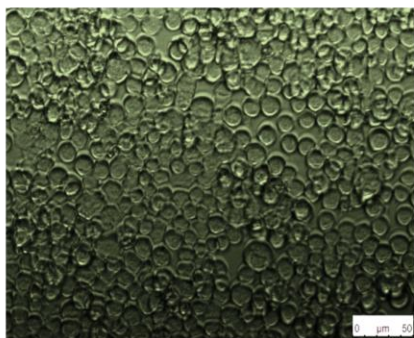


Εικόνα 4.2: Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ύστερα από διαμόλυνση των κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα bacmids. Ως μάρτυρες (control cells) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν διαμολύνθηκαν, καθώς και κύτταρα που διαμολύνθηκαν από το άδειο bacmid.

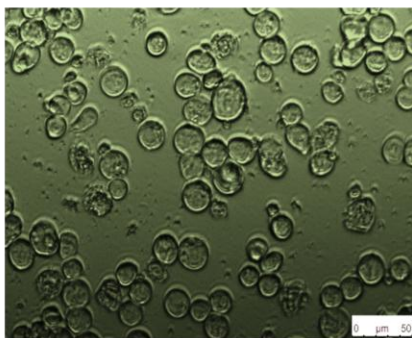
Για τον έλεγχο της έκφρασης, φορτώθηκαν στην ηλεκτροφόρηση δείγματα ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης 150 μ g. Για το δείγμα της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α φορτώθηκαν 50 μ g συνολικής πρωτεΐνης, καθώς από προηγούμενα πειράματα έκφρασης είχε φανεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (p85α) εκφράζεται σε αρκετά αυξημένα επίπεδα. Η έκφραση της μεταλλαγμένης υπομονάδας H1047R ήταν αρκετά χαμηλή. Αντιθέτως, η έκφραση της φυσιολογικής καταλυτικής υπομονάδας και της μεταλλαγμένης E545K φάνηκε να είναι αρκετά καλή.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του τίτλου του ιού, καθώς ο ιός πρώτης γενιάς (P1) δεν θεωρείται ιός υψηλού τίτλου. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα Sf9 επιμολύνθηκαν με την P1 γενιά του ιού προς παραγωγή ιού με υψηλότερο τίτλο, γενιάς P2. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε με 500 μ l του ιού P1 και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 27 °C για 5 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο για έλεγχο σημάδιων μόλυνσης (**Εικόνα 4.3**).

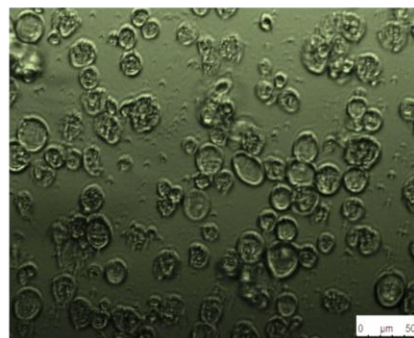
Control κύτταρα



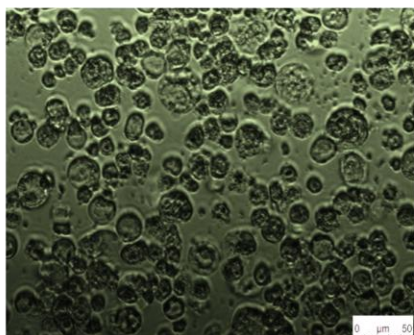
Άδειο bacmid



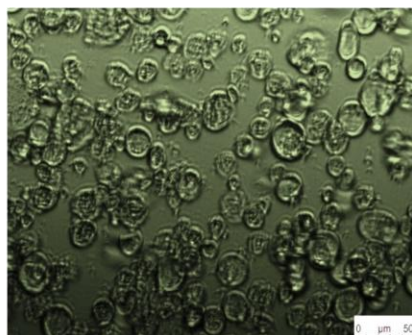
p110α-E545K



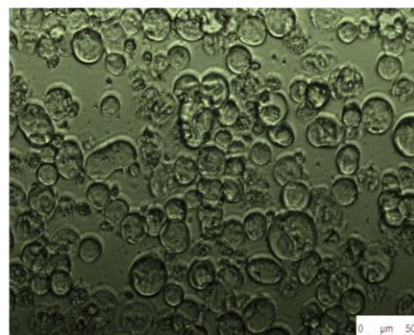
p110α-H1047R



p110α WT



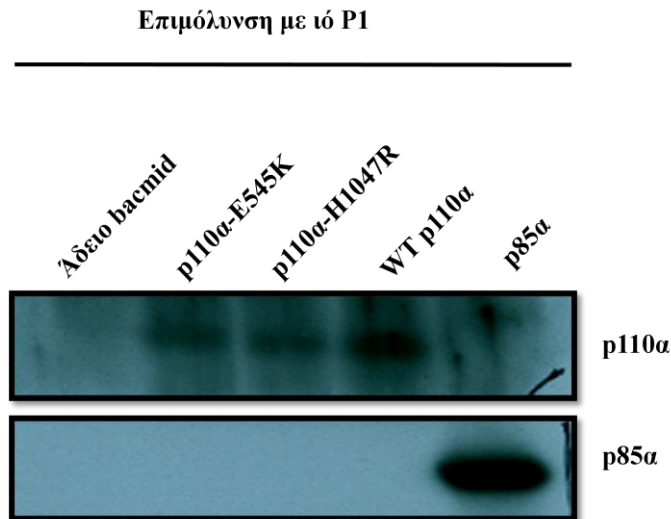
p85α



Εικόνα 4.3: Έλεγχος της μορφολογίας των κυττάρων, έπειτα από επιμόλυνση τους με τους ανασυνδυασμένους ιούς P1. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα (control) που δεν επιμολύνθηκαν και κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον ιό που προέκυψε από το άδειο bacmid.

Τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τους ιούς γενιάς P1 είχαν έντονα τα σημάδια μόλυνσης (**Εικόνα 4.3**). Ήταν εμφανώς διογκωμένα και αρκετά λιγότερα σε αριθμό σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (control), ενώ παράλληλα είχαν κοκκιώδη μορφολογία, η οποία οφείλεται στην εκβλάστηση του ιού γενιάς P2. Παράλληλα, παρατηρήθηκε έντονη λύση των κυττάρων και κυτταρικός θάνατος στα επιμολυσμένα κύτταρα (**Εικόνα 4.3**), σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (control), αλλά και σε σχέση με τα διαμολυσμένα κύτταρα (**Εικόνα 4.1**). Αυτό οφείλεται στην αποτελεσματική μόλυνση των κυττάρων με τον ανασυνδυασμένο ιό, καθώς και στην παραγωγή ιού με ισχυρότερο τίτλο, ο οποίος εκβλαστάνει από αυτά.

Έπειτα, ακολούθησε η συλλογή του υπερκειμένου της καλλιέργειας των επιμολυσμένων κυττάρων από όπου συλλέχθηκε ο ιός P2, αλλά και η συλλογή των κυττάρων για τον έλεγχο της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της πρωτεϊνικής έκφρασης φαίνονται στην **Εικόνα 4.4**.



Εικόνα 4.4: Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ύστερα από επιμόλυνση των κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους ιούς P1 γενιάς. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία μολύνθηκαν με τον ιό που προέκυψε από το άδειο bacmid.

Και σε αυτή την περίπτωση, φορτώθηκαν στην πηκτή δείγματα ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης 150 μg, με εξαίρεση τα δείγματα wt p110a (90 μg) και p85a (50 μg), για τα οποία δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα δείγματος. Η έκφραση της μεταλλαγής H1047R ήταν αρκετά χαμηλή αν και φάνηκε να βελτιώνεται σε μικρό βαθμό με την ενίσχυση του ιού. Αντιθέτως, η έκφραση της φυσιολογικής καταλυτικής υπομονάδας και της μεταλλαγής της E545K, η οποία ήταν αρκετά καλή κατά την διαμόλυνση, φάνηκε να είναι χαμηλότερη κατά την ενίσχυση του ιού, γεγονός μη αναμενόμενο. Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται στην τοξικότητα του ιού που προκαλεί κυτταρικό θάνατο πριν παραχθεί επαρκής ποσότητα πρωτεΐνης. Τέλος, όσον αφορά την p85a, η έκφραση της ήταν πολύ καλύτερη σε σχέση με αυτήν της καταλυτικής υπομονάδας και φάνηκε να αυξάνεται σε σχέση με τη διαμόλυνση.

Για μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της έκφρασης, με την ίδια πειραματική διαδικασία, ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης που προκύπτει από την επιμόλυνση με ιό γενιάς P2 (Εικόνα 4.5). Σε αυτήν την περίπτωση φορτώθηκαν στην πηκτή δείγματα πρωτεΐνης 100 μg. Παρατηρήθηκε έκφραση όλων των πρωτεϊνών, ακόμα και της H1047R υπομονάδας που δεν είχε εκφραστεί ικανοποιητικά στα προηγούμενα πειράματα, ενώ την καλύτερη έκφραση συνέχισε να έχει η ρυθμιστική υπομονάδα. Η έκφραση, αν και καλύτερη για κάποιες υπομονάδες, δε φάνηκε να είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί και από την μικρότερη ποσότητα δείγματος που

φορτώθηκε, αλλά και από το γεγονός ότι τα κύτταρα συλλέχθηκαν νωρίτερα (3 μέρες μετά τη μόλυνση).

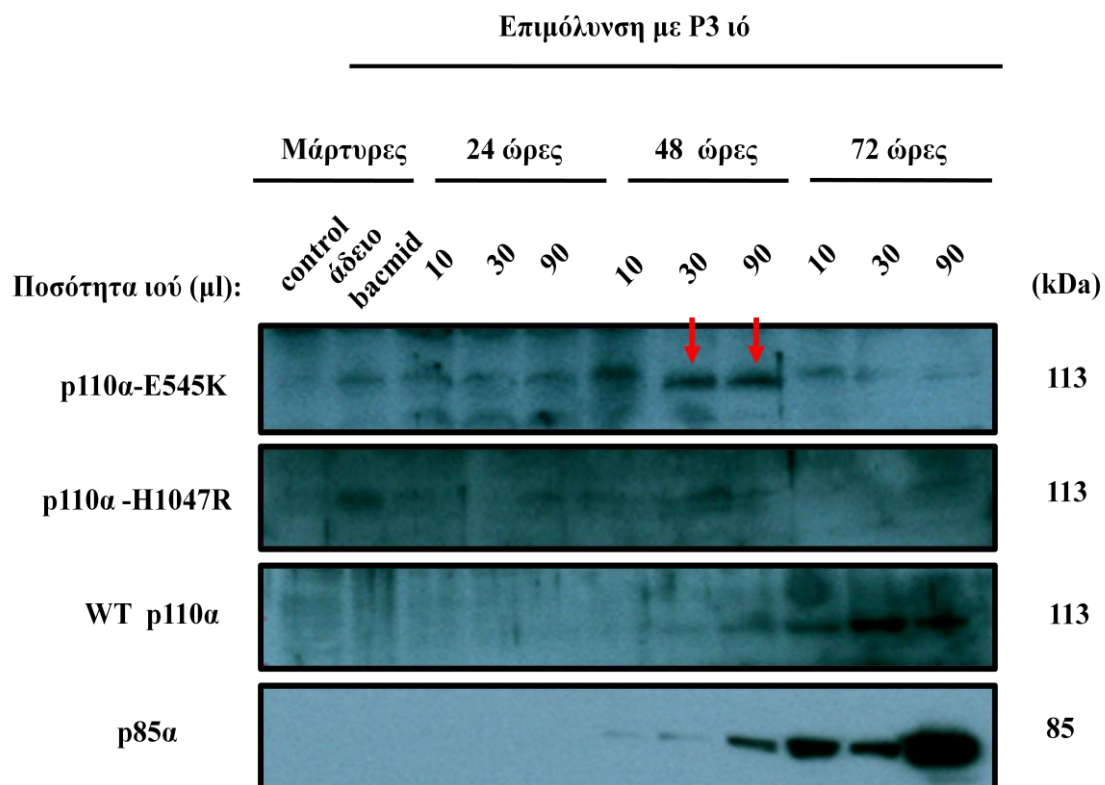


Εικόνα 4.5: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την υπερέκφραση των πρωτεϊνικών υπομονάδων της κινάσης, ύστερα από επιμόλυνση με τους ανασυνδυασμένους ιούς γενιάς P2. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν είχαν μολυνθεί (control), αλλά και κύτταρα που είχαν μολυνθεί με ιό που δεν φέρει το γονίδιο κάποιας υπομονάδας (άδειο bacmid).

Ο παραγόμενος ιός, γενιάς P3, συλλέχθηκε, όπως και τα επιμολυσμένα κύτταρα, μετά από 3 μέρες καθώς τα σημάδια της μόλυνσης παρατηρήθηκαν νωρίτερα και ήταν πιο έντονα. Αυτή η γενιά του ιού θεωρείται η ιδανικότερη για την επιμόλυνση κυττάρων για την αποτελεσματική παραγωγή της πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό, κρίθηκε χρήσιμο να ελεγχθεί και να καθοριστεί τόσο η βέλτιστη συγκέντρωση του ιού που επιμολύνει τα κύτταρα, όσο και ο κατάλληλος χρόνος συλλογής των κυττάρων, σε προκαταρκτικά πειράματα έκφρασης. Ως εκ τούτου, στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες του εκάστοτε ιού (10, 30, 90 μ l) για την επιμόλυνση των κυττάρων (επιστρωμένων σε πηγαδάκια πιάτου 6-well) και η συλλογή αυτών έγινε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (24, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση).

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4.6**, για τον κάθε ιό εξετάστηκαν δυο παράμετροι, η ποσότητα του ιού και ο χρόνος της μόλυνσης. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Sf9 που αναπτύχθηκαν στα ίδια πιάτα χωρίς να επιμολυνθούν (control cells), αλλά και κύτταρα που επιμολύνθηκαν με 30 μ l του ιού που είχε προκύψει από τον άδειο φορέα pFastBac HTb

(άδειο bacmid). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.6**, το γονίδιο της ρυθμιστικής υπομονάδας εκφράστηκε πολύ καλύτερα σε σχέση με το γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας και των μεταλλαγών του, και με τρόπο που φάνηκε να εξαρτάται τόσο από τον χρόνο επιμόλυνσης όσο και από την ποσότητα του ιού, καθώς η καλύτερη παραγωγή παρατηρήθηκε στη μέγιστη δόση και μετά από 72 ώρες επώασης με τον ιό. Επιπρόσθετα, ήδη από τα προηγούμενα πειράματα είχε φανεί ότι η ρυθμιστική υπομονάδα έχει αποτελεσματική έκφραση, η οποία ενισχύεται παράλληλα με την ενίσχυση του ιού.



Εικόνα 4.6: Επιμόλυνση των κυττάρων με διαφορετικές ποσότητες ιών γενιάς P3 (οι προς έκφραση υπομονάδες φαίνονται στα αριστερά) και συλλογή της πρωτεΐνης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα (control) που δεν επιμολύνθηκαν, ή κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον άδειο ιό. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στην p110α-E545K, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες σε αυτή τη σειρά έχουν τρέξει λίγο πιο ψηλά και πιθανώς ανήκουν σε άλλες πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν μη ειδικά από το αντίσωμα.

Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας δεν φάνηκε να έχει καλή έκφραση. Σημαντικό ρόλο στην έκφρασή του φαίνεται να παίζει ο χρόνος συλλογής των κυττάρων, καθώς η έκφραση της πρωτεΐνης για τη WT p110a ανιχνεύεται στις 72 ώρες, αλλά και η ποσότητα του ιού, καθώς στη μικρότερη συγκέντρωση (10 μ l) η παραγωγή πρωτεΐνης είναι αισθητά μειωμένη. Όσον αφορά τη μεταλλαγή H1047R, η έκφραση της ήταν πολύ χαμηλή έως ανύπαρκτη, ενώ η έκφραση της E545K ήταν επίσης ανύπαρκτη στις περισσότερες ώρες και συγκεντρώσεις, με εξαίρεση δύο σχετικά έντονες ζώνες (με κόκκινα βέλη στην εικόνα) που ανιχνεύθηκαν στις 48 ώρες μετά την μόλυνση με τις δυο υψηλές συγκεντρώσεις του ιού. Η αδυναμία παραγωγής της p110a, και ειδικά των μεταλλαγμένων μορφών της που είναι σημαντικά πιο ενεργές από την φυσιολογική υπομονάδα, μπορεί να ερμηνευτεί από την πιθανή τοξικότητα που προκαλεί η έκφραση αυτών στα κύτταρα, με συνέπεια τον θάνατο τους. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα ενεργότητας της AKT (καθοδικός στόχος της PI3K) μπορεί να οδηγήσουν, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε αυξημένη τοξικότητα και κυτταρικό θάνατο (Nogueira et al., 2008).

Στα κύτταρα, τα οποία ήταν επιμολυσμένα με τους ανασυνδυασμένους ιούς της E545K και H1047R μεταλλαγής, παρατηρήθηκε μια ζώνη στο μάρτυρα (άδειο bacmid), γεγονός μη αναμενόμενο, που πιθανότατα οφείλεται στην μη ειδική ανίχνευση άλλης πρωτεΐνης αντίστοιχου μοριακού βάρους. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το αντίσωμα φαινόταν να συνδέεται μη ειδικά και σε άλλες ζώνες (διαφορετικού μοριακού μεγέθους), οδήγησε στην ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της ειδικότητας και ευαισθησίας του αντισώματος. Αφού προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα του αντισώματος, θα είναι δυνατόν να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα για την έκφραση της πρωτεΐνης με το σύστημα του βακουλοϊού.

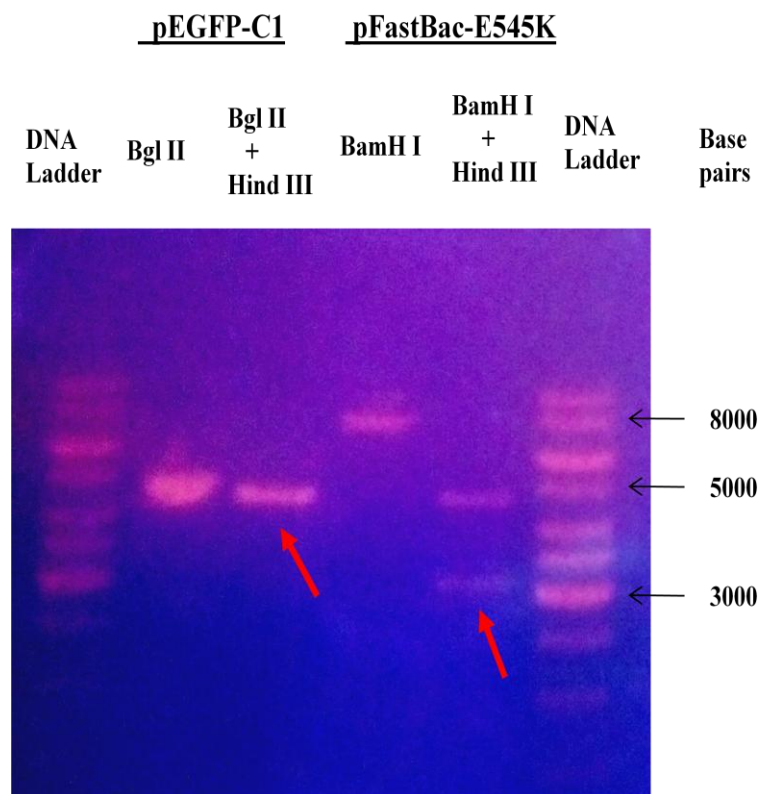
4.2 Υπερέκφραση του γονιδίου της μεταλλαγής E545K της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης σε κύτταρα HEK293

Για την μελέτη της αποτελεσματικότητας του αντισώματος της p110a, έγινε η έκφραση της E545K μεταλλαγής της πρωτεΐνης σε άλλο σύστημα, αυτό των κυττάρων HEK293. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEGFP-C1, στο οποίο το γονίδιο που κλωνοποιείται, εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του ιού *Human Cytomegalovirus* και παράγει πρωτεΐνη η οποία είναι συντηγμένη με την EGFP στο αμινοτελικό άκρο της.

4.2.1 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pEGFP-C1 με το γονίδιο της *PIK3CA* E545K

Για την έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε το cDNA του γονιδίου που ήταν κλωνοποιημένο στον pFastBac HTb (~8000 bp). Το γονίδιο (3100 bp) ανακτήθηκε με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων BamH I και Hind III, τα οποία κόβουν στα 5' και 3' άκρα του αντίστοιχα. Για την σωστή τοποθέτηση του στο νέο φορέα pEGFP-C1 (~4700 bp), αυτός κόπηκε από τα ένζυμα Bgl II και Hind III, στα 5' και 3' άκρα αντίστοιχα. Το Bgl II είναι συμπληρωματικό ένζυμο της BamH I, για αυτό και στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία συμπληρωματικών άκρων.

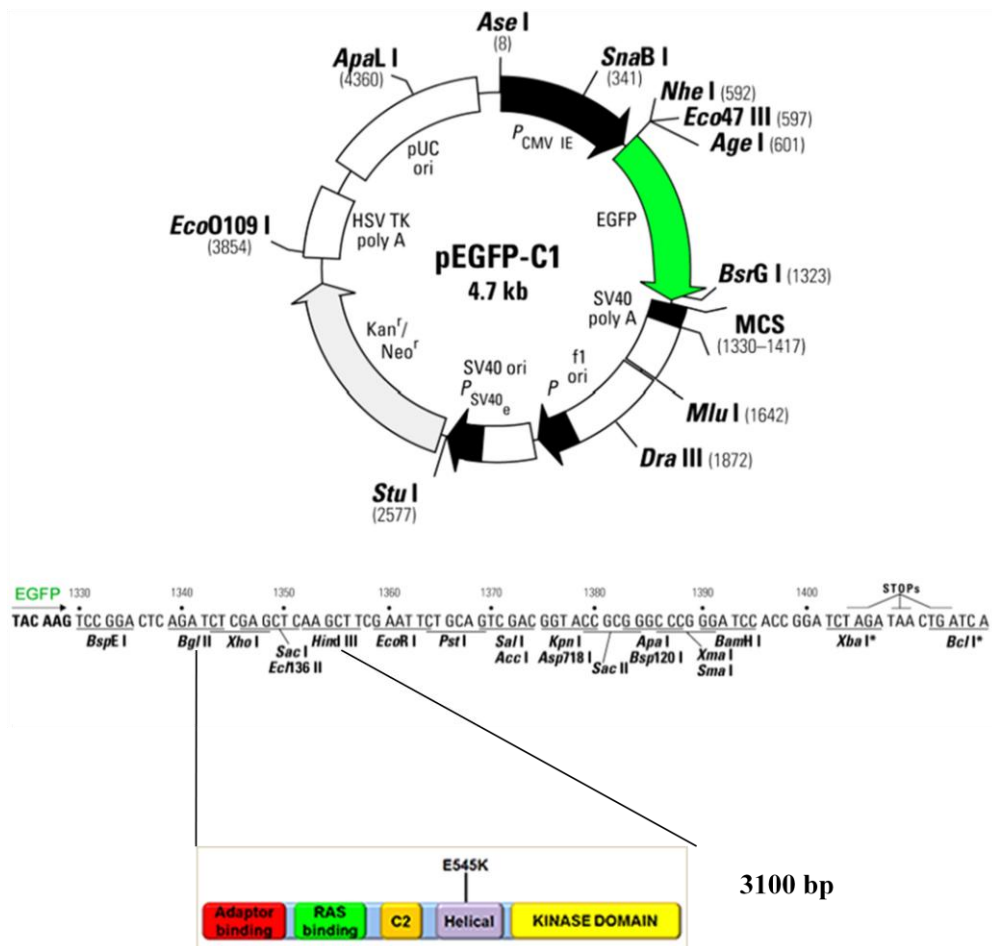
Στην **Εικόνα 4.7**, φαίνονται οι ζώνες που προκύπτουν από τις πέψεις των δυο πλασμιδίων, του pEGFP-C1 και του pFastBacHTb-E545K.



Εικόνα 4.7: Διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8 % σε TAE. Τα δείγματα (5μl) φορτώνονται ύστερα από την 1^η, αλλά και την 2^η πέψη, και ηλεκτροφορούνται με σκοπό να επιβεβαιωθούν οι πέψεις, αλλά και να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα των πέψεων. Στα πρώτα δυο πηγαδάκια φορτώνονται τα προϊόντα των πέψεων που ανήκουν στο φορέα που θα κλωνοποιηθεί το

γονίδιο, ενώ στα επόμενα δυο τα προϊόντα των πέψεων του φορέα με το κλωνοποιημένο γονίδιο. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται τα προϊόντα των πέψεων που μας ενδιαφέρουν.

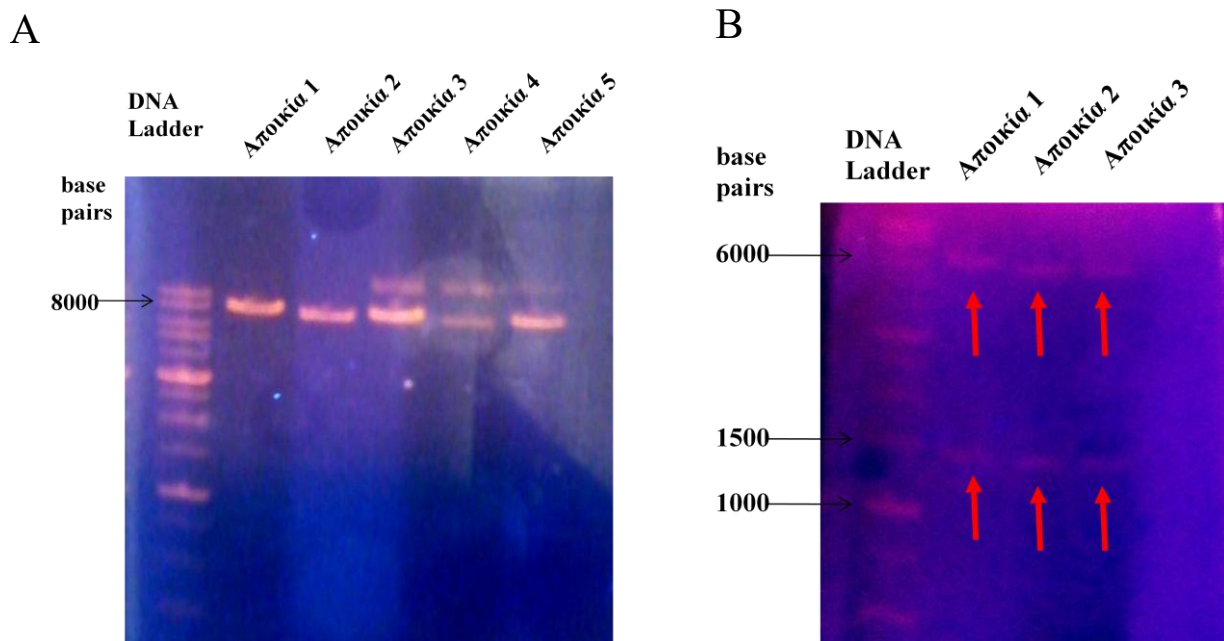
Στη συνέχεια, το σύνολο των δειγμάτων των πέψεων ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτική αгарόζης, από όπου εξήχθησαν οι ζώνες που μας ενδιέφεραν και καθαρίστηκαν. Αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους, με την βοήθεια της T4 DNA λιγάσης. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας αποτελεί ο νέος ανασυνδυασμένος φορέας με το γονίδιο της *PIK3CA-E545K* (Εικόνα 4.8), με μέγεθος ~8000 βάσεις.



Εικόνα 4.8: Σχηματική αναπαράσταση του φορέα κλωνοποίησης και του cDNA της *p110α*. Το cDNA κλωνοποιήθηκε στην θέση MCS του φορέα, με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού.

Μετά την παραγωγή του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου, αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών DH10B *E.coli* κυττάρων, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB με το αντιβιοτικό καναμυκίνη, στο οποίο έχουν ανθεκτικότητα μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο. Από αυτήν την καλλιέργεια αναλύθηκαν 5 αποικίες, από τις οποίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA. Έπειτα, ακολούθησε πέψη με το ένζυμο Hind III και ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων σε πηκτή αγαρόζης, με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου (**Εικόνα 4.9A**).

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι όλες οι αποικίες είχαν πλασμίδιο μεγέθους ~8000 βάσεων. Οι δυο πρώτες έφεραν μόνο αυτό, ενώ οι υπόλοιπες έφεραν και κάποιο άλλο μεγαλύτερου μεγέθους. Για να επιβεβαιωθεί ότι το πλασμίδιο ήταν το σωστό, ακολούθησαν πέψεις του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από τις 3 πρώτες αποικίες, με τα ένζυμα Hind III και Xba I, τα οποία κόβουν το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο σε τμήματα μεγέθους περίπου 6500 και 1500 βάσεων. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (**Εικόνα 4.9B**) και επιβεβαίωσαν την παρουσία του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου στις αποικίες που αναπτύχθηκαν.



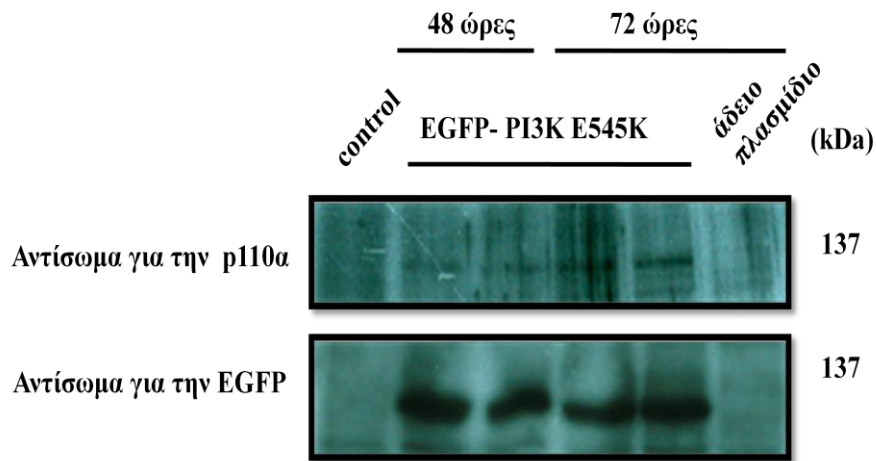
Εικόνα 4.9: (A) Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από τις αποικίες που προέκυψαν, ύστερα από μετασχηματισμό με το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο. Τα δείγματα έχουν υποστεί πέψη με το ένζυμο Hind III. (B) Διαγνωστική ηλεκτροφόρηση ύστερα από πέψεις του πλασμιδιακού DNA των αποικιών με τα ένζυμα Hind III και Xba I, για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου.

4.2.2 Υπερέκφραση της συντηγμένης με την EGFP πρωτεΐνης PI3K στην κυτταρική σειρά HEK293

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισήχθη στα κύτταρα HEK293 (ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα), με τη βοήθεια της πολυαιθυλενιμίνης (PEI) και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37 °C. Εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού ανά 24 ώρες, για σημάδια παραγωγής της συντηγμένης πρωτεΐνης. Η συλλογή και λύση των κυττάρων έγινε σε δυο χρονικές στιγμές, μετά από 48 και από 72 ώρες διαμόλυνσης.

Στη συνέχεια, τα δείγματα μετρήθηκαν για το ολικό εκχύλισμα πρωτεΐνης που περιέχουν, και 40 µg από το καθένα χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στη συνέχεια, οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με το ειδικό αντίσωμα για την p110α πρωτεΐνη. Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολούθηθηκε και για την ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση της μεμβράνης με το ειδικό αντίσωμα για την EGFP πρωτεΐνη, με τη διαφορά ότι φορτώθηκαν 30 µg συνολικής πρωτεΐνης.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν διαμολύθηκαν με κάποιο πλασμίδιο, αλλά και κύτταρα τα οποία διαμολύθηκαν με τον άδειο φορέα pEGFP-C1. Τα κύτταρα που διαμολύθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, εμφάνισαν διαφορές στην εικόνα του επιπέδου έκφρασής τους όταν εξετάστηκαν με το ένα ή με το άλλο αντίσωμα, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης τους που να σχετίζονται με το χρόνο συλλογής τους (**Εικόνα 4.10**). Η εικόνα της έκφρασης, όταν αυτή μελετήθηκε με το αντίσωμα για την p110α, ήταν διαφορετική (σημαντικά χαμηλότερη) συγκριτικά με την εικόνα της έκφρασης, όταν μελετήθηκε με το άλλο αντίσωμα (αντι-GFP). Επιπλέον, το αντίσωμα της p110α φάνηκε να προσδέεται μη ειδικά και σε άλλες ζώνες διαφορετικού μοριακού μεγέθους. Από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει πως το αντίσωμα της p110α φαίνεται να μην είναι απόλυτα ειδικό για την πρωτεΐνη, ούτε αποτελεσματικό για ισχυρή πρόσδεση. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης που ανιχνεύονται από το αντίσωμα (στα πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης με το σύστημα του βακουλοϊού, **Εικόνες 4.4 - 4.6**) δεν αντικατοπτρίζουν τα πραγματικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης (υποεκτιμούν την έκφραση).

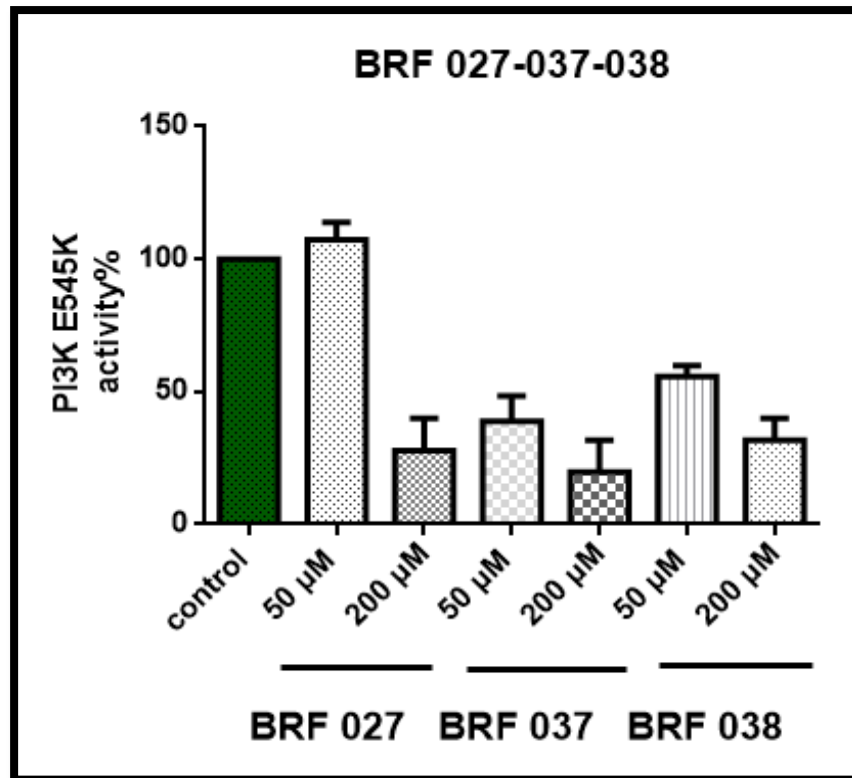


Εικόνα 4.10: Ανοσοαποτύπωση της υπερέκφρασης της p110α-E545K υπομονάδας σε κύτταρα HEK293 και έλεγχος της έκφρασης της συντηγμένης πρωτεΐνης με δυο διαφορετικά αντισώματα, με το ένα έναντι της p110α και το άλλο έναντι της EGFP πρωτεΐνης.

4.3 Έλεγχος της αναστολής της δράσης της κινάσης σε *in vitro* πειράματα, απουσία κυττάρων

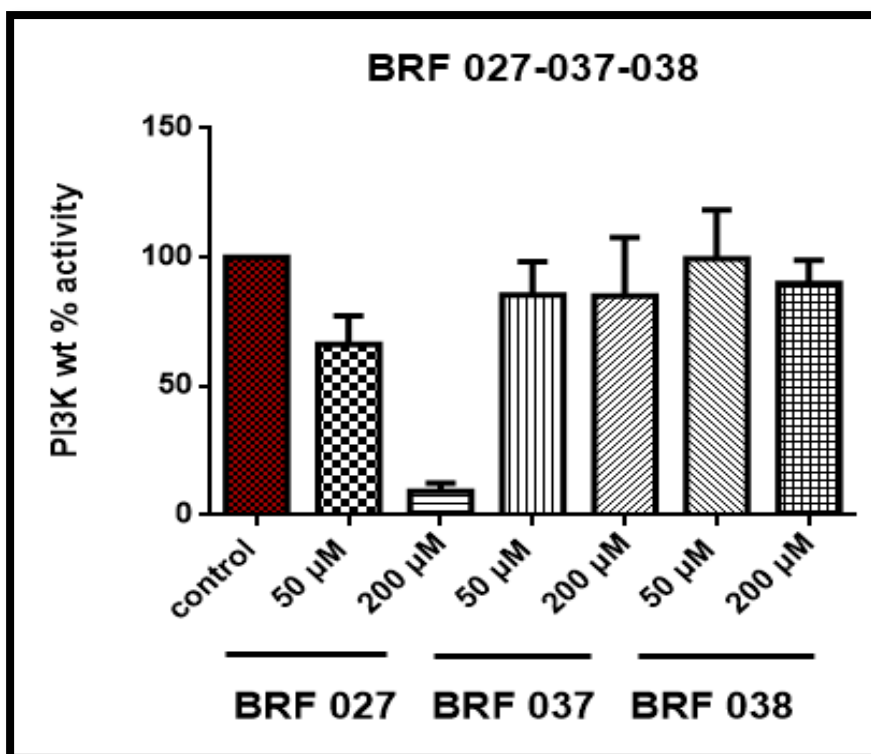
Για την εύρεση εξειδικευμένων αναστολέων των μεταλλαγμένων μορφών της κινάσης, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα ποσοτικοποίησης της ενεργότητας της κινάσης, παρουσία των υποψήφιων αναστολέων. Οι υποψήφιοι αναστολείς προκύπτουν από *de novo* (εξαρχής) σχεδιασμό και εικονική αξιολόγηση χημικών μορίων, μέσω υπολογιστή και με βάση τη δομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, εν προκειμένω της E545K (συνεργασία με το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια, IBΕΑΑ). Τα υποψήφια φάρμακα θα πρέπει να στοχεύουν αποκλειστικά τη μεταλλαγμένη μορφή της κινάσης, αφήνοντας ανέπαφη την φυσιολογική.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.11**, τρία μόρια από τους υποψήφιους αναστολείς προκάλεσαν αναστολή της κινάσης, όπου τα BRF-037 και -038 προκαλούν ικανοποιητική αναστολή και στις δύο συγκεντρώσεις.



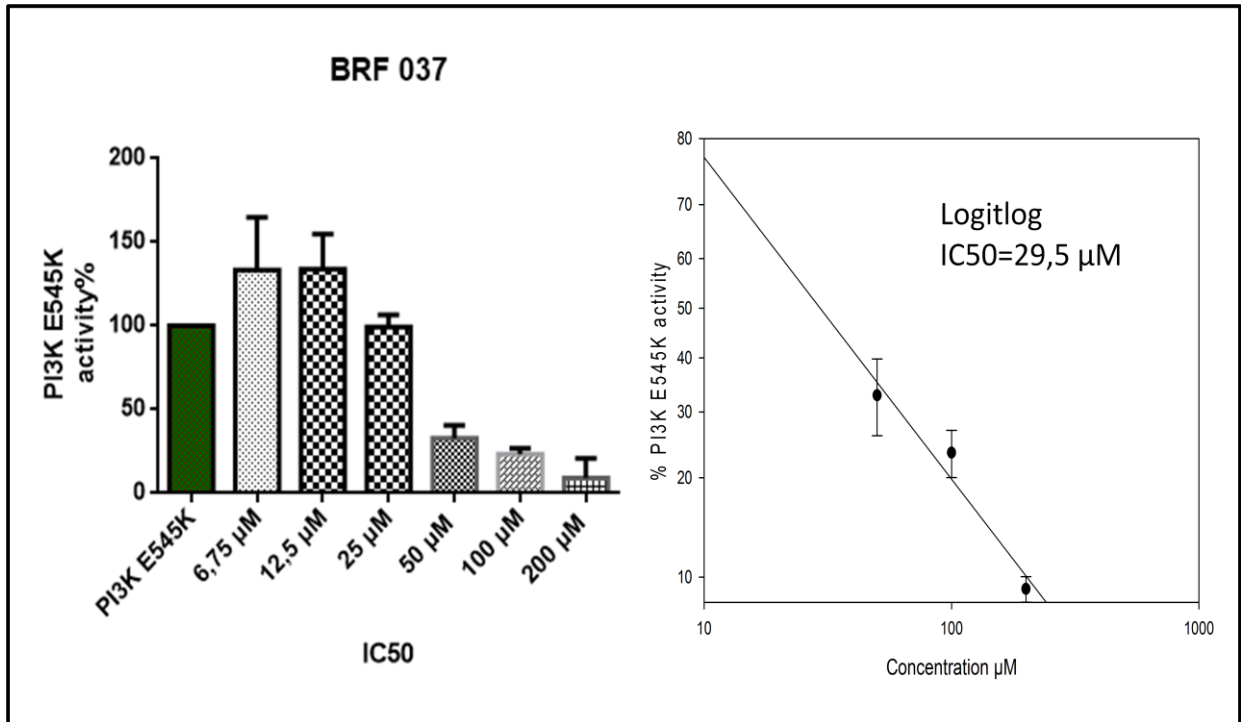
Εικόνα 4.11: Επίδραση δύο συγκεντρώσεων (50 και 200 μM) των μορίων BRF027, -037 και -038 στην ενεργότητα της μεταλλαγμένης PI3K (E545K). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Έπειτα, εξετάστηκε η επίπτωση τους στην φυσιολογική κινάση, καθώς οι εξειδικευμένοι αναστολείς δεν θα πρέπει να επηρεάζουν την ενεργότητα της φυσιολογικής πρωτεΐνης. Στην **Εικόνα 4.12** φαίνεται η επίδραση των μορίων BRF-027, -037 και -038, στην δράση της PI3K αγρίου τύπου. Όπως προκύπτει από την εικόνα, ο BRF-027 προκάλεσε αναστολή στην φυσιολογική κινάση, ενώ τα άλλα δύο μόρια όχι. Συνεπώς, ο BRF-027 δεν αποτελεί ειδικό αναστολέα της μεταλλαγμένης μορφής και αποκλείστηκε από περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 4.12: Επίδραση δύο συγκεντρώσεων (50 και 200 μ M) των μορίων BRF-027, -037 και -038 στην ενεργότητα της φυσιολογικής PI3K. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Έτσι, τα πειράματα συνεχίστηκαν με προσδιορισμό της τιμής IC_{50} για αυτά τα δυο μόρια στην μεταλλαγμένη κινάση. Η μελέτη για το BRF-038 έδειξε πως το μόριο αυτό δεν είχε αναστολή στην μεταλλαγμένη κινάση, σε αντίθεση με τα προηγούμενα πειράματα. Ωστόσο, το BRF-037 είχε αναστολή στη μεταλλαγμένη κινάση και προσδιορίστηκε και η συγκέντρωση του μορίου που μπορεί να προκαλέσει 50% αναστολή της κινάσης, η οποία είναι 29,5 μ M. (Εικόνα 4.13). Το γεγονός αυτό καθιστά το συγκεκριμένο μόριο ως ένα ικανοποιητικό αναστολέα της πρωτεΐνης, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελλοντικά πειράματα προσδιορισμού του τρόπου δράσης του μορίου.



Εικόνα 4.13: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (6,75, 12,5, 25, 50, 100 και 200 μM) του μορίου BRF-037 στην ενεργότητα της μεταλλαγμένης κινάσης (E545K). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 3 ανεξάρτητα πειράματα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Παραγωγή της πρωτεΐνης με το σύστημα του βακουλοϊού

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή των ανασυνδυασμένων υπομονάδων, p110α και p85α, αλλά και των δυο πιο συχνών μεταλλαγών της καταλυτικής υπομονάδας E545K και H1047R, με το σύστημα Bac-to-Bac (Invitrogen, 2013) το οποίο επιτρέπει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και υψηλή παραγωγικότητα ακόμα και πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού μεγέθους (άνω των 130 kDa).

Η έκφραση των WT p110α, E545K και p85α ήταν ικανοποιητική μετά τη διαμόλυνση με τα ανασυνδυασμένα bacmids, με εξαίρεση την H1047R που δεν φάνηκε να εκφράζεται το ίδιο καλά. Ωστόσο, όσον αφορά την έκφραση τους έπειτα από επιμόλυνση με τον παραγόμενο ιό γενιάς P1, αν και παρατηρήθηκε έκφραση όλων των υπομονάδων, η έκφραση της E545K και της WT ήταν σημαντικά μειωμένη, ενώ της H1047R κυμαινόταν στα ίδια χαμηλά επίπεδα. Το γεγονός αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, καθώς κατά την επιμόλυνση αναμένεται καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης (η μόλυνση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε από τα έντονα μορφολογικά σημάδια των κυττάρων, **Εικόνα 4.3**). Η έκφραση της φυσιολογικής ρυθμιστικής υπομονάδας ήταν αυξημένη στη δεύτερη περίπτωση, όπως αναμενόταν, και συνολικά καλύτερη σε σχέση με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας. Ο ιός γενιάς P2 που παράχθηκε ήταν πιο αποτελεσματικός, καθώς τα σημάδια της μόλυνσης ήταν ορατά νωρίτερα (3 μέρες μετά την επιμόλυνση σε αντίθεση με τις 5 ημέρες στα προηγούμενα πειράματα) και παρατηρήθηκε έκφραση όλων των υπομονάδων, ακόμα και της H1047R που ήταν πολύ χαμηλή. Συνεπώς, επιβεβαιώθηκε η ενίσχυση του τίτλου του ιού.

Τελικά, απομονώθηκε ο ιός γενιάς P3, ο οποίος σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας (Invitrogen, 2013), θεωρείται η κατάλληλη γενιά για την αποτελεσματική έκφραση της πρωτεΐνης. Διερευνήσαμε τις παραμέτρους (χρόνος μετά την μόλυνση και ποσότητα του ιού) για την αποδοτική παραγωγή της πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα, ώστε να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες πριν την τελική παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια κυττάρων. Ωστόσο η εικόνα της έκφρασης δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική. Ενώ για την ρυθμιστική υπομονάδα φάνηκε ότι ο ιός λειτουργεί πολύ καλά και η έκφραση της σχετίζεται με την ποσότητα του ιού και το χρόνο συλλογής (η μέγιστη ποσότητα πρωτεΐνης στα 90 μl και μετά από 72 ώρες), η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας ήταν χαμηλότερη (με τη χρήση του ιού P3) σε σχέση με την παραγωγή με ιό προηγούμενης γενιάς. Στη WT και στην

E545K παρατηρήθηκε μια μικρή παραγωγή, στις 72 και 48 ώρες αντίστοιχα, και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του ιού 30-90 μ l, ενώ στην H1047R δεν παρατηρήθηκε καμία ζώνη, πιθανώς λόγω αυξημένης τοξικότητας.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε πως ο καταλληλότερος χρόνος συλλογής κυμαίνεται μεταξύ 48 και 72 ωρών, γεγονός που είναι αναμενόμενο καθώς το cDNA της PI3K βρίσκεται υπό τη δράση του υποκινητή του γονιδίου της πολυεδρίνης, το οποίο είναι ενεργό στα τελευταία στάδια της μόλυνσης. Όσο πιο ενεργή είναι μορφή της PI3K τόσο πιο σύντομος είναι ο χρόνος έκφρασης της (Burke et al., 2012), γεγονός που ερμηνεύει την σύντομη έκφραση της E545K (48 ώρες). Οι προτιμώμενες ποσότητες του ιού φαίνεται να είναι οι δύο μεγαλύτερες. Παρόλα αυτά, η έκφραση των δυο μεταλλαγμένων υπομονάδων που είναι πιο ενεργές σε σχέση με τη WT, και ιδιαιτέρως της H1047R που θεωρείται η πιο ενεργή από τις δυο, φάνηκε να είναι δύσκολη, πιθανώς λόγω τοξικότητας που επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Παρόμοιο πρόβλημα αντιμετωπίστηκε από τους Madleker et al. (2009) με την προσθήκη αναστολέα της PI3K κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης, γεγονός που αύξησε σημαντικά την απόδοση.

Ένα άλλο πιθανό σενάριο είναι η αποικοδόμηση της καταλυτικής υπομονάδας από κυτταρικές ή/και ιικές πρωτεάσες. Για την αποφυγή της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης κατά την συλλογή και λύση των κυττάρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μίγμα αναστολέων των πρωτεασών που θα εξασφαλίσει την ακεραιότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό πρόβλημα κατά την προσπάθεια παραγωγής της p110α καταλυτικής υπομονάδας είναι η εξάρτησή της από την p85 ρυθμιστική υπομονάδα, η οποία φαίνεται πως σταθεροποιεί τη μονομερή ασταθή καταλυτική υπομονάδα και ταυτόχρονα καταστέλλει τη δράση της (Yu et al., 1998). Έτσι, για την έκφραση ενεργούς συμπλόκου, προτιμάται η συνέκφραση των δυο υπομονάδων σε κύτταρα εντόμων, καθώς οι προσπάθειες για την παραγωγή μονομερούς p110α δεν είχαν θετικά αποτελέσματα. Προφανώς, η έκφραση ενός σταθερού ετεροδιμερούς εξαρτάται από την αλληλοαναδίπλωση των δύο υπομονάδων κατά τη διάρκεια της έκφρασης (Meier et al., 2004; Sinnamon et al., 2010).

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή της πρωτεΐνης, ανάμεσα σε αυτούς και ο τίτλος του ιού που χρησιμοποιείται. Με το σύστημα Bac-to-Bac (Invitrogen, 2013) ο τίτλος του ιού που παράγεται σε κάθε γενιά μπορεί να θεωρηθεί ότι κυμαίνεται εντός κάποιων ορίων και η P3 γενιά προτείνεται ως η ιδανικότερη για αυτόν τον σκοπό. Ωστόσο, στα πειράματά μας η εικόνα ήταν διαφορετική για το γονίδιο της ρυθμιστικής και της καταλυτικής υπομονάδας. Ίσως η P3 γενιά του ιού να μην είναι η καταλληλότερη για την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας, και ο κατάλληλος ιός να είναι της γενιάς P2.

Τέλος ένα πρόβλημα που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η μη ειδική ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών από το αντίσωμα της p110a, γεγονός που διερευνήθηκε σε διαφορετικό σύστημα έκφρασης, αυτό των HEK293 κυττάρων με τη χρήση φορέα που οδηγεί στη σύντηξη του γονιδίου με την EGFP πρωτεΐνη. Κατά τη σύγκριση της εικόνας της έκφρασης με τα δύο αντισώματα, αντι-p110a και αντι-EGFP, φάνηκε ότι το αντίσωμα της p110a δεν ήταν ικανό να ανιχνεύσει με την ίδια αποτελεσματικότητα την έκφραση της πρωτεΐνης και δεν είναι απόλυτα ειδικό. Συνεπώς, τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρήθηκαν με τη χρήση του μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν τα πραγματικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης.

Για την βελτιστοποίηση της έκφρασης, πριν αυτή πραγματοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα, χρειάζεται να γίνουν τεχνικές διορθώσεις και μένει να αξιολογηθεί αν το κόστος αυτού του συστήματος είναι συμφερότερο από την αγορά των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αφού συνεκφραστούν οι υπομονάδες για τη δημιουργία του ετεροδιμερούς μορίου, μένει να προσδιορισθεί αν θα είναι ενεργό με πειράματα προσδιορισμού της ενεργότητας του.

5.2 Εύρεση αναστολέων ειδικών για τη μεταλλαγμένη μορφή της κινάσης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν μόρια τα οποία έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την αναστολή της μεταλλαγμένης μορφής της κινάσης E545K, σε *in vitro* πειράματα μέτρησης της ενεργότητας της κινάσης παρουσία του φυσικού της υποστρώματος (PIP2 σε λιποσώματα). Η σημασία εύρεσης αναστολέων που θα είναι όχι μόνο ειδικοί για την α-ισομορφή της πρωτεΐνης, αλλά πιο συγκεκριμένα για τις μεταλλαγμένες μορφές της, έχει τονιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς αυτό θα μείωνε σημαντικά τις πιθανές παρενέργειες του αναστολέα σε πειράματα *in vivo*.

Για τον σκοπό αυτό, τα αρχικά πειράματα έγιναν με την μεταλλαγμένη και έπειτα με την αγρίου τύπου κινάση, με στόχο να αποκλειστούν τα μόρια που θα προκαλούσαν την αναστολή της φυσιολογικής πρωτεΐνης και επομένως, δεν θα ήταν εξειδικευμένοι αναστολείς της μεταλλαγμένης μορφής. Με αυτόν τον τρόπο αποκλείστηκε ο αναστολέας BRF-027, καθώς φάνηκε να αναστέλλει σημαντικά την φυσιολογική κινάση και συνεπώς δεν είχε ενδιαφέρον για τη συνέχεια της μελέτης. Στην επόμενη φάση προσδιορίστηκε το IC₅₀ των μορίων που δεν προκάλεσαν αναστολή στην φυσιολογική κινάση και θα μπορούσαν συνεπώς να αποτελούν ειδικούς αναστολείς της μεταλλαγμένης μορφής. Ο BRF-038 δεν φαίνεται να προκαλεί αναστολή της μεταλλαγμένης μορφής, ενώ ο BRF-037 προκαλεί 50% αναστολή της

ενεργότητας κινάσης στην τιμή των 29,5 μM και συνεπώς αποτελεί ικανοποιητικό αναστολέα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα πειράματα.

Μέχρι σήμερα οι αναστολείς της PI3K είναι κυρίως ανταγωνιστικοί αναστολείς της θέσης δέσμευσης του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Όμως αυτή η θέση είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των ισομορφών της I τάξης της PI3K με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να βρεθούν ειδικοί αναστολείς για την κάθε ισομορφή. Ωστόσο, αυτό δεν είναι ακατόρθωτο διότι υπάρχουν αρκετά κομβικά κατάλοιπα που είναι διαφορετικά στις τέσσερις αυτές ισομορφές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη τέτοιων αναστολέων (Sabbah et al., 2016).

Όμως, ακόμα και ένας εξειδικευμένος αναστολέας για την α ισομορφή μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα, πχ. λόγω της σημασίας της φυσιολογικής p110 α στο μεταβολισμό της γλυκόζης (Foukas et al., 2006). Οι δυο πιο συχνές μεταλλάξεις της p110 α , E545K και H1047R, εντοπίζονται στην ελικοειδή και την περιοχή της κινάσης αντίστοιχα, όχι όμως στην θέση πρόσδεσης του ATP. Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλλει στην προσπάθεια ανάπτυξης αναστολέων που θα στοχεύουν σε άλλες περιοχές της κινάσης (αλλοστερικοί αναστολείς) και που είναι πιο πιθανό να δρουν εξειδικευμένα για αυτές τις μεταλλαγμένες μορφές. Για παράδειγμα, η H1047R προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της κινάσης, η οποία ευνοεί την πρόσδεση της στη μεμβράνη και την αυξημένη πρόσδεση του ATP. Αυτές οι εκτεταμένες αλλαγές στη δομή του μορίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θέσεις-στόχοι για την ανάπτυξη αλλοστερικών αναστολέων που θα επηρεάζουν τη σύνδεση με τη μεμβράνη.

Η συγκεκριμένη *in vitro* δοκιμασία που εφαρμόστηκε σε αυτή την εργασία αποτελεί το πρώτο βήμα για την ανακάλυψη πιθανών ειδικών αναστολέων. Αφού βρεθούν μόρια τα οποία αναστέλλουν τη δράση της κινάσης, η συγκεκριμένη δοκιμασία επιτρέπει την τροποποίηση των παραμέτρων της ώστε να διερευνηθεί ο πιθανός τρόπος δράσης των μορίων αυτών, για παράδειγμα καθορισμός συναγωνιστικού-αλλοστερικού αναστολέα, με την χρήση υψηλής και φυσιολογικής συγκέντρωσης ATP κατά την πειραματική διαδικασία. Στη συνέχεια, μένει να αξιολογηθεί η δράση των αναστολέων με μελέτες σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Έπειτα, η συνέχιση της αξιολόγησης των μορίων περιλαμβάνει μακροχρόνιες μελέτες σε πειραματόζωα και, τελικώς, στον ίδιο τον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Au S, Wu W, Panté N. Baculovirus nuclear import: open, nuclear pore complex (NPC) sesame. *Viruses* (2013) 5: 1885-900.

Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* (2008) 410: 1-17.

Benistant C, Chapuis H, Roche S. A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma. *Oncogene* (2000) 19: 5083-5090.

Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109: 15259-15264.

Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends Biochem Sci* (2015) 40: 88-100.

Castel P, Toska E, Zumsteg ZS, Carmona FJ, Elkabets M, Bosch A, Scaltriti M. Rationale-based therapeutic combinations with PI3K inhibitors in cancer treatment. *Mol Cell Oncol* (2014) 1: e963447.

Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev pathol* (2009) 4: 127-150.

Chikh A, Ferro R, Abbott JJ, Piñeiro R, Buus R, Iezzi M, Ricci F, Bergamaschi D, Ostano P, Chiorino G, Lattanzio R, Broggin M, Piantelli M, Maffucci T, Falasca M. Class II phosphoinositide 3-kinase C2 β regulates a novel signaling pathway involved in breast cancer progression. *Oncotarget* (2016) 7: 18325-18345.

Ciraolo E, Iezzi M, Marone R, Marengo S, Curcio C, Costa C, Azzolino O, Gonella C, Rubinetto C, Wu H, Dastrù W, Martin EL, Silengo L, Altruda F, Turco E, Lanzetti L, Musiani P, Rückle T, Rommel C, Backer JM, Forni G, Wymann MP, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal* (2008) 1: ra3.

Dou Z, Chattopadhyay M, Pan JA, Guerriero JL, Jiang YP, Ballou LM, Yue Z, Lin RZ, Zong WX. The class IA phosphatidylinositol 3-kinase p110-beta subunit is a positive regulator of autophagy. *J Cell Biol* (2010) 191: 827-843.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* (2006) 7: 606–619.

Falasca M, Maffucci T. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J* (2012) 443: 587-601.

Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* (2004) 279: 41189–41196.

Foukas LC, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, Sancho S, Smith AJ, Withers DJ, Vanhaesebroeck B. Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* (2006) 441: 366–370.

Fresno-Vara JA, Casado E, De Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzales Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* (2004) 30: 193–204.

Fry MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res* (2001) 3: 304-312.

Furet P, Guagnano V, Fairhurst RA, Imbach-Weese P, Bruce I, Knapp M, Fritsch C, Blasco F, Blanz J, Aichholz R, Hamon J, Fabbro D, Caravatti G. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* (2013) 23: 3741-3748.

Gkeka P, Evangelidis T, Pavlaki M, Lazani V, Christoforidis S, Agianian B, Cournia Z. Investigating the Structure and Dynamics of the PIK3CA Wild-Type and H1047R Oncogenic Mutant. *PLoS Comput Biol* (2014) 10: e1003895.

Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM. The structure of a human p110/p85 complex elucidates the effects of oncogenic PI3K mutations. *Science* (2007) 318: 1744–1748.

Invitrogen. Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. User guide. (2013)

Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* (2014) 127: 923–928.

Jessen K, Wang S, Kessler L, Guo X, Kucharski J, Staunton J. INK128 is a potent and selective TORC1/2 inhibitor with broad oral antitumor activity. *Mol Cancer Ther* (2009) 8: Supplement 1.

Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* (2009) 102: 19-65.

Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Carpino N, Wang D, Ihle JN. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* (2002) 22: 8580–8591.

Juric D, Krop I, Ramanathan RK, Xiao J, Sanabria S, Wilson TR, Choi YJ, Parmar H, Hsu J, Baselga J, Von Hoff DD. Abstract LB-64: GDC-0032, a beta isoform-sparing PI3K inhibitor: Results of a first-in-human phase Ia dose escalation study. *Cancer Res* (2013) 73: LB-64.

Juss JK, Hayhoe RP, Owen CE, Bruce I, Walmsley SR, Cowburn AS, Kulkarni S, Boyle KB, Stephens L, Hawkins PT, Chilvers ER, Condliffe AM. Functional redundancy of class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) isoforms in signaling growth factor-mediated human neutrophil survival. *PLoS One* (2012) 7: e45933.

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* (2003) 2: 339–345.

Lim DH, Cho JY, Song DJ, Lee SY, Miller M, Broide DH. PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2009) 296: L210–9.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* (2009) 8: 627–644.

Liu S, Knapp S, Ahmed AA. The structural basis of PI3K cancer mutations: from mechanism to therapy. *Cancer Res* (2014) 74: 641-646.

Lu N, Shen Q, Mahoney TR, Neukomm LJ, Wang Y, Zhou Z. Two PI 3-kinases and one PI 3-phosphatase together establish the cyclic waves of phagosomal PtdIns(3)P critical for the degradation of apoptotic cells. *PLoS Biol* (2012) 10: e1001245.

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* (1993) 67: 4566–4579.

Maffucci T, Falasca M. New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem Soc Trans* (2014) 42: 1378–1382.

Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang CH, Kinzler KW, Vogelstein B, Amzel LM. A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K α and the membrane. *Proc Nat Acad Sci USA* (2009) 106: 16996-17001.

Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, Bressanin D, Fini M, McCubrey JA. Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget* (2012) 3: 371–394.

Martini M, Ciruolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in cancer: any good news? *Front Oncol* (2013) 3: 108.

Mazza S, Maffucci T. Class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha: what we learned so far. *Int J Biochem Mol Biol* (2011) 2: 168-182.

Meier TI, Cook JA, Thomas JE, Radding JA, Horn C, Lingaraj T, Smith MC. Cloning, expression, purification, and characterization of the human Class Ia phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Protein Expr Purif* (2004) 35: 218–224.

Mellor P, Furber LA, Nyarko JN, Anderson DH. Multiple roles for the p85alpha isoform in the regulation and function of PI3K signalling and receptor trafficking. *Biochem J* (2012) 441: 23–37.

Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* (2007) 317: 239–242.

Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* (2004) 15: 161–170.

Mothes B, Bucher K, Ammon-Treiber S, Schwab M, Piekorz RP, Hirsch E, Bernd Nürnberg B, Beer-Hammer S. p110 γ/δ Double-Deficiency Induces Eosinophilia and IgE Production but Protects from OVA-Induced Airway Inflammation. *PLoS One* (2016) 11: e0159310.

Nezis IP, Sagona AP, Schink KO, Stenmark H. Divide and ProsPer: the emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends Cell Biol* (2010) 20: 642-649.

Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T, Hay N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* (2008) 14: 458–470.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* (2004) 118: 375–387.

Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* (2000) 14: 1027–1047.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* (2014) 4: 64.

Raiborg C, Schink KO, Stenmark H. Class III phosphatidylinositol 3-kinase and its catalytic product PtdIns3P in regulation of endocytic membrane traffic. *FEBS J* (2013) 280: 2730-2742.

Sabbah DA, Hu J, Zhong HA. Advances in the Development of Class I Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Inhibitors. *Curr Top Med Chem* (2016) 16: 1413-1426.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* (2004) 304: 554.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* (2005) 307: 1098–1101.

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* (2000) 287: 1040-1046.

Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* (2009) 186: 773-782.

Sinnamon RH, McDevitt P, Pietrak BL, Leydon VR, Xue Y, Lehr R, Qi HW, Burns M, Elkins P, Ward P, Vincentini G, Fisher D, Grimes M, Brandt M, Auger KR, Ho T, Johanson K, Jones CS, Schwartz B, Sweitzer TD, Kirkpatrick RB. Baculovirus production of fully-active phosphoinositide 3-kinase alpha as a p85 alpha-p110 alpha fusion for X-ray crystallographic analysis with ATP competitive enzyme inhibitors. *Protein Expr Purif* (2010) 73: 167-176.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 10983–10985.

Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* (2015) 15: 7–24.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010) 11: 329–341.

Yao N, Yao LG, Kan YC, Zhou WK, Qi YP. Improvement of baculovirus expression system and purification of IL-6 protein expressed in insect cells. *Chin J Biotech* (2006) 22: 572-580.

Yazdani Y, Azari S, Kalhor HR. Expression of Functional Recombinant Human Tissue Transglutaminase (TG2) Using the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. *Adv Pharm Bull* (2016) 6: 49-56.

Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, Aki S, Miyazawa H, Biswas K, Nagakura C, Ueno M, Iseki S, Schwartz RJ, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams RH, Takakura N, Takuwa Y. Endothelial PI3K-C2a, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med* (2012) 18: 1560-1569.

Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 α Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. *Mol Cell Biol* (1998) 18: 1379-1387.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* (2008) 27: 5497-5510.

Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105: 2652–2657.