



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ  
*Insulin - PI3k – mTOR- p70s6k* ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



*Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου*



Ορισμός έναρξης της εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου Παπαγεωργίου Κυριακής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 127/23-03-2009

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 128/03-04-2009

Επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Επιβλέπων)
2. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)
3. Γρηγορίου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Παν/μιου Θράκης (Μέλος)

Ορισμός θέματος από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 128/03-04-2009

Θέμα: «Ανάλυση της επίδρασης του Αναπτυξιακού Μονοπατιού Wnt και της Σηματοδότησης της Ινσουλίνης στο Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων»

Τροποποίηση τίτλου από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 227/05-10-2015

Νέος τίτλος: «Ανάλυση της Επίδρασης του Άξονα Σηματοδότησης Insulin - PI3k – mTOR-p70s6k στη Βιολογία των Νευρικών Κυττάρων»

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 227/05-10-2015

1. Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Πρόεδρος της Επιτροπής)
2. Ευστάθιος Χατζηλουκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)
3. Μαρία Γρηγορίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Παν/μιου Θράκης (Μέλος)
4. Μαρίκα Σύρρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)
5. Θεώνη Τραγκα, Καθηγήτρια Τμήματος του Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)
6. Γεωργιος Θυφρονίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)
7. Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μιου Ιωαννίνων (Μέλος)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-10-2015





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα 08-04-2009

.....  
Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451-10  
ΤΗΛ: (26510) 97265, 97277, 97294  
FAX: (26510) 97064  
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Α.ΥΦΑΝΤΗ

**Β Ε Β Α Ι Ω Σ Η**

Βεβαιώνεται ότι η κ. Παπαγεωργίου Κυριακή του Γεωργίου, με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών (Συνεδρία αριθμ. 127/23-03-2009), έχει γίνει δεκτή για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, σύμφωνα με τα οριζόμενα στον Κανονισμό Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος.

Βεβαιώνεται ακόμη ότι:

Με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος (Συνεδρία αριθμ. 128/03-04-2009):

α) ορίσθηκε στην κ. Παπαγεωργίου Κυριακή Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή, αποτελούμενη από τους:

1. Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέποντα
2. Δραίνα Κωνσταντίνο, Καθηγητή Τμήματος Χημείας του Π. της, Μέλος.
3. Γρηγορίου Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Πανεπιστήμιο Θράκης., Μέλος

(β) ορίσθηκε το ακόλουθο θέμα για τη διδακτορική της διατριβή: “Ανάλυση της επίδρασης του αναπτυξιακού μονοπατιού Wnt και της σηματοδότησης της ινσουλίνης στο πεπρωμένο των νευρικών βλαστικών κυττάρων”.

Η χρονική διάρκεια για το Διδακτορικό Δίπλωμα δεν μπορεί να υπερβαίνει τα δώδεκα (12) εξάμηνα και δεν μπορεί να διαρκέσει λιγότερο από έξι (6) εξάμηνα.

Η βεβαίωση αυτή χορηγείται στην ενδιαφερόμενη για κάθε νόμιμη χρήση.

Με εντολή της Προέδρου  
Η Γραμματέας του Τμήματος







Αρχείο



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα 3-11-2011  
Αριθμ. Πρωτ.: 222

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07 265, 07 336  
FAX:(26510) 07 064  
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ : Άννα Υφαντή

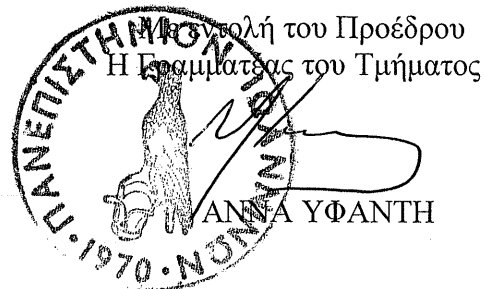
Προς τους κ.κ.:

- 1) Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπλ. Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Παν/μίου Ιωαννίνων (Επιβλέπων)
- 2) Ευστάθιο Χατζηλουκά, Αναπλ. Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & του Παν/μίου Ιωαννίνων Τεχνολογιών.
- ✳ 3) Γρηγορίου Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Πανεπιστήμιο Θράκης.

**Θέμα:** «Αντικατάσταση μέλους Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής»

Σας πληροφορούμε ότι, μετά από εισήγηση του Επιβλέποντα κ Θεολόγου Μιχαηλίδη, Αναπλ. Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων, και της Σ.Ε.Μ.Σ. του Τμήματος, για τροποποίηση της σύνθεσης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, η Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης, στη Συνεδρίασή της αριθμ. 179/10-10-2011, σας όρισε μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής της κα Κυριακής Παπαγεωργίου.

Κοινοποίηση:  
- κ. Κυριακή Παπαγεωργίου





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Ιωάννινα, 29-09-2015

**Θεολόγος Μιχαηλίδης**  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ση: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
Τηλ: 26510-07101  
FAX: 26510-07064  
e-mail: [tmichael@uoi.gr](mailto:tmichael@uoi.gr)

Προς τη Γραμματεία,  
του  
Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &  
Τεχνολογιών,  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αξιότιμοι κυρίες/κύριοι,

Θα θέλαμε να σας ενημερώσουμε ότι ο τελικός τίτλος της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος Παπαγεωργίου Κυριακής είναι ελαφρά τροποποιημένος. Ο αρχικός τίτλος ήταν: «Ανάλυση της επίδρασης του Αναπτυξιακού Μονοπατιού Wnt και της Σηματοδότησης της Ινσουλίνης στο Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων» και ο τελικός τίτλος τροποποιήθηκε ως εξής: «Ανάλυση της Επίδρασης του Άξονα Σηματοδότησης Insulin - PI3k - mTOR- p70s6k στη Βιολογία των Νευρικών Κυττάρων».

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II: «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας του ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ», κωδικός έργου 80650.

Βεβαιώνουμε ότι με την τροποποίηση του τίτλου δεν τροποποιείται το ήδη εγκεκριμένο φυσικό αντικείμενο του έργου.

Με εκτίμηση,

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

**Μαρία Γρηγορίου**, Αν. Καθηγήτρια  
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

**Ευστάθιος Χατζηλουκάς**, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Θεολόγος Μιχαηλίδης**, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

*[Handwritten signatures]*



Εγχειρίδιο στη  
Γ-Σ-Ε Ε  
Οφ 227/5-10-15  
Γραφείας του Σχ/α.σ.  
Υφανή



Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336, 7294  
FAX: (26510) 07064  
ΠΑΗΡΟΦΟΡΕΣ: Άννα Υφαντή  
e-mail: grambet@cc.uoi.gr

Ιωάννινα, 15 Οκτωβρίου 2015  
Αριθμ. Πρωτ.: 138

Προς τους κ.κ. :

1. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Μαρία Γρηγορίου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Πανεπιστημίου Θράκης
3. **Ευστάθιο Χατζηλουκά**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. **Μαρίκα Σύρρου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Θεώνη Τράγκα**, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Γεώργιος Θυφρονίτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. **Θεόδωρος Φώτης**, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

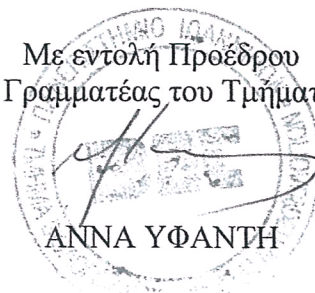
**Θέμα: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας. Κυριακής Παπαγεωργίου»**

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 227/05-10-2015, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε η κ. Κυριακή Παπαγεωργίου με τίτλο «Ανάλυση της επίδρασης του αναπτυξιακού μονοπατιού Wnt και της Σηματοδότησης της Ινσουλίνης στο Πεπρωμένο των Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κος Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Κοινοποίηση:  
κα. Κυριακή Παπαγεωργίου

Με εντολή Προέδρου  
Η Γραμματέας του Τμήματος







ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ ΘΕΟΛΟΓΟΣ  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛ: 26510-07101, FAX: 26510 07061

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Τ.Μ.Β. ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
Αριθμ. Πρωτ. 198
Ημερομηνία 4/11/15

Ιωάννινα, 29-10-2015

### ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μετά από πρόσκληση του Επιβλέποντα Αν. Καθηγητή Μοριακής Γενετικής κ. Θ. Μιχαηλίδη, σήμερα Πέμπτη 29/10/2015 και ώρα 14:30, έλαβε χώρα σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την αξιολόγηση και κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Κυριακής Παπαγεωργίου με θέμα: «Ανάλυση της Επίδρασης του Άξονα Σηματοδότησης Insulin - PI3k - mTOR- p70s6k στη Βιολογία των Νευρικών Κυττάρων». Προσήλθε η κ. Παπαγεωργίου, η οποία ανέπτυξε το θέμα της διατριβής της, της έγιναν ερωτήσεις από τη Επιτροπή και αποχώρησε. Στη συνέχεια, η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψήφιας στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της.

Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε παμψηφεί η διδακτορική διατριβή με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ». Παράλληλα, ζητήθηκε από την κ. Παπαγεωργίου να βελτιώσει συγκεκριμένα σημεία του γραπτού κειμένου.

#### Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

#### ΤΑ ΜΕΛΗ

Μαρία Γρηγορίου, Αν. Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Θράκης

Θεόδωρος Φώτης, Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ευστάθιος Χατζηλουκάς, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεώνη Τράγκα Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μαρίκα Σύρρου, Αν. Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεώργιος Θυφρονίτης Αν Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων





Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει δημοσιευτεί ως εξής:

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

- Papageorgiou K., Parapouli M., Drainas C., Michaelidis T.M. «Comparative proteomic analysis of yeast cells growing in nutrient conditions that activate or inhibit the TOR signaling pathway». 63ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας. 9-11 Νοεμβρίου 2012, Ηράκλειο.
- Κυριακή Παπαγεωργίου, Ερμής Ρυακιωτάκης, Θεολόγος Μιχαηλίδης. «Επίδραση της σηματοδότησης Akt στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση νευροβλαστωματικών κυττάρων». 35ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών. 23-25 Μαΐου 2013, Ναύπλιο.
- Papageorgiou Kyriaki, Tsigkas Ioannis, Michaelidis M. Theologos. : «Comparative analysis of Akt and mTOR signaling in neuroblastoma». 8-10 Μαΐου 2014, Ιωάννινα.
- Papageorgiou Kyriaki, Darsinou Marousa, Tsigkas Ioannis, Michaelidis M. Theologos. «Analysis of the role of the PI3k/Akt and mTOR signaling pathways in the neural stem cell proliferation». 21-23 Μαΐου 2015, Βόλος.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b> .....	<b>3</b>
<b>1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>5</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>9</b>
3.1 Ο ρόλος του μονοπατιού της Ινσουλίνης/IGF1 στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.....	9
3.2 Η δράση της Ινσουλίνης και του IGF1 διαμεσολαβείται από τη σηματοδότηση PI3K/AKT.....	11
3.3 Το μονοπάτι σηματοδότησης mTOR.....	15
3.3.1 Το σύμπλοκο mTOR .....	16
3.3.2 Στόχοι του συμπλόκου mTORC1.....	18
3.3.3 Ανάδρομη ρύθμιση του άξονα Ινσουλίνη-Akt-mTOR .....	22
3.4 Ο ρόλος του μονοπατιού Ινσουλίνη/IGF1 – Akt – mTOR στην καρκινογένεση.....	22
3.5 Η αναστολή του μονοπατιού PI3k/Akt – mTOR ως στόχος αντικαρκινικών θεραπειών .....	24
3.5.1 Η δράση του αναστολέα LY294002.....	24
3.5.2 Η δράση της ραπαμυκίνης.....	25
3.5.3 Προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση θεραπευτικών μορίων που στοχεύουν στο μονοπάτι PI3k - mTOR και τρόποι αντιμετώπισής τους .....	27
3.6 Το Νευροβλάστωμα .....	29
3.6.1 Στάδια εξέλιξης του νευροβλαστώματος .....	30
3.6.2 Θεραπεία του νευροβλαστώματος.....	31
3.6.3 Στόχευση του μονοπατιού PI3k – mTOR για τη θεραπεία του νευροβλαστώματος .....	32
3.7 Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων .....	33

3.7.1	Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου .....	33
3.7.2	Η φάση G0 .....	36
3.7.3	Οι πρωτεΐνες - ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου .....	38
3.7.4	Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου .....	42
3.7.5	Η σχέση του άξονα PI3k - mTOR - p70s6k με τον κυτταρικό κύκλο .....	44
3.8	Μονοπάτια/μόρια που αλληλεπιδρούν με τον άξονα Ινσουλίνη - PI3k – mTOR....	46
3.8.1	Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hsp90 για τη λειτουργία του κυττάρου και η σχέση της με τη σηματοδότηση Akt .....	46
3.8.2	Το μονοπάτι P38MAPK .....	48
3.8.2.A	Η σχέση του μονοπατιού P38MAPK με τον κυτταρικό κύκλο .....	49
3.8.2.B	Η αλληλεπίδραση της κινάσης p38 με τη σηματοδότηση PI3k/Akt - mTOR .....	51
4.	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	53
5.	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	55
5.1	<b>ΥΛΙΚΑ</b> .....	55
5.1.1	Αναλώσιμα .....	55
5.1.2	Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά .....	55
5.1.2.A	Διαλύματα μοριακής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο .....	56
5.1.2.B	Διαλύματα μοριακής βιολογίας του εμπορίου .....	58
5.1.2.Γ	Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο .....	59
5.1.2.Δ	Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας του εμπορίου .....	60
5.1.2.E	Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών .....	60
5.1.3	Χημικοί αναστολείς – επαγωγείς .....	60
5.1.4	Αντισώματα .....	60
5.1.5	Κυτταρικές σειρές .....	62
5.1.6	Πλασμίδια .....	62
5.1.7	Εκκινητές .....	64
5.1.8	Λογισμικό .....	64

5.1.9	Εξοπλισμός .....	64
<b>5.2</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>65</b>
5.2.1	Καλλιέργεια κυττάρων.....	65
5.2.2	Ανακαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης.....	66
5.2.3	Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer ....	67
5.2.4	Αποθήκευση κυτταρικών σειρών .....	67
5.2.5	Απόψυξη των κυττάρων.....	68
5.2.6	Νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A.....	68
5.2.7	Μεταχείριση των κυττάρων με τους χημικούς αναστολείς.....	69
5.2.8	Διαμόλυνση των κυττάρων (Transfection).....	70
5.2.9	Πρωτόκολλο προετοιμασίας των κυττάρων για ανάλυση FACS .....	71
5.2.10	Έμμεσος ανοσοφθορισμός .....	73
5.2.11	Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρήση 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU) .....	75
5.2.12	Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα .....	75
5.2.13	Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από το DNA.....	77
5.2.14	Αντίστροφη Μεταγραφή .....	78
5.2.15	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)...	79
5.2.15.A	Σχεδιασμός εκκινήτων.....	80
5.2.15.B	Σύσταση μίγματος αντίδρασης και πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή για τα διάφορα ζεύγη εκκινήτων .....	80
5.2.16	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Q-PCR) .....	81
5.2.16.A	Η τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου).....	82
5.2.16.B	Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR.....	83
5.2.16.Γ	Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR .....	84
5.2.17	Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα .....	85
5.2.18	Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford ....	85
5.2.19	Ανοσοαποτύπωση (Western blot) .....	86
5.2.19.A	Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου.....	86

<b>5.2.19.B</b>	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	<b>89</b>
<b>5.2.19.Γ</b>	Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών .....	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>93</b>
<b>6.1</b>	Επιλογή του κυτταρικού μοντέλου .....	<b>93</b>
<b>6.2</b>	Επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης των αναστολέων και έλεγχος της επίδρασής τους στο μονοπάτι PI3k – mTOR .....	<b>93</b>
<b>6.3</b>	Η παρουσία LY και RAPA μειώνει τον αριθμό των κυττάρων Neuro2A, επηρεάζοντας με διαφορετικό τρόπο τον πολλαπλασιασμό και την μορφολογία τους .....	<b>95</b>
<b>6.3.1</b>	Επίδραση των αναστολέων στον πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία των κυττάρων.....	<b>95</b>
<b>6.3.2</b>	Το ποσοστό των κυττάρων που ενσωματώνουν BrdU διαφέρει μεταξύ των αναστολέων .....	<b>97</b>
<b>6.4</b>	Οι αναστολείς LY και RAPA επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τον κυτταρικό κύκλο των νευροβλαστωματικών κυττάρων.....	<b>98</b>
<b>6.5</b>	Η παρουσία του LY οδηγεί τα κύτταρα σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0 (G0- like) .....	<b>99</b>
<b>6.6</b>	Η παρουσία της RAPA επιβραδύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου .....	<b>103</b>
<b>6.7</b>	Η RAPA καθυστερεί τα κύτταρα να περάσουν το σημείο ελέγχου της μίτωσης και να ολοκληρώσουν τον κυτταρικό κύκλο .....	<b>105</b>
<b>6.8</b>	Ανάκαμψη των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων .....	<b>109</b>
<b>6.9</b>	Η επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων στον αριθμό και τη μορφολογία των κυττάρων Neuro2A είναι αντιστρεπτή .....	<b>110</b>
<b>6.10</b>	Η απομάκρυνση των αναστολέων επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τον κυτταρικό κύκλο των νευροβλαστωματικών κυττάρων .....	<b>111</b>
<b>6.11</b>	Οι μεταβολές των πρωτεϊνών δεικτών της φάσης G0 υποδηλώνουν την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο μετά την απομάκρυνση του LY και τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά τη RAPA .....	<b>112</b>
<b>6.12</b>	Οι μεταβολές στις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου επιβεβαιώνουν τη συνέχιση του κύκλου μετά την απομάκρυνση και των δυο αναστολέων.....	<b>114</b>

<b>6.13</b>	Η μεταβολή του αριθμού των $pH3^+$ κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων παρουσιάζει αντίστροφη σχέση μεταξύ των αναστολέων κατά την απομάκρυνσή τους.....	<b>116</b>
<b>6.14</b>	Επίδραση των αναστολέων στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων Neuro2A .....	<b>118</b>
<b>6.15</b>	Ο LY αναστέλλει αντιστρεπτά τη διαφοροποίηση των κυττάρων ενώ η RAPA προκαλεί μόνιμη αναστολή της διαφοροποίησης.....	<b>120</b>
<b>6.16</b>	Η επίδραση των αναστολέων LY και RAPA στους στόχους του μονοπατιού PI3k – mTOR είναι αντιστρεπτή.....	<b>122</b>
<b>6.17</b>	Η αναστολή του συμπλόκου mTOR αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY εμποδίζει επιλεκτικά τη φωσφορυλίωση της p70s6k και τη φυσιολογική ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού .....	<b>125</b>
<b>6.18</b>	Η Hsp90 είναι απαραίτητη για την έντονη ενεργοποίηση της p-p70(Thr389) και πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά την ανάκαμψη από LY.....	<b>126</b>
<b>6.19</b>	Συσχέτιση του άξονα mTOR - p70s6k με σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στη φάση της μίτωσης.....	<b>130</b>
<b>6.20</b>	Η αναστολή του μονοπατιού PI3k – mTOR μειώνει αντιστρεπτά την έκφραση της κινάσης p38.....	<b>131</b>
<b>6.21</b>	Η δράση της κινάσης p38 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της p70s6k κατά την ανάκαμψη των κυττάρων .....	<b>132</b>
<b>6.22</b>	Η φωσφορυλίωση της p70s6k στη θέση Thr389 είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της κινάσης p38 .....	<b>134</b>
<b>6.23</b>	Η αναστολή της κινάσης p38 παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά την απομάκρυνση του LY και της RAPA .....	<b>136</b>
<b>6.24</b>	Η ανάκαμψη των κυττάρων παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA επάγει το σχηματισμό πρωτογενών μικροτριχιδίων .....	<b>138</b>
<b>7.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>141</b>
<b>7.1</b>	Η παρουσία LY επηρεάζει με αντιστρεπτό τρόπο το μονοπάτι PI3k – mTOR – p70s6k και τον πολλαπλασιασμό, ενώ η δράση της RAPA προκαλεί μόνιμες μεταβολές στη βιολογία του κυττάρου .....	<b>141</b>

7.2	Η ανάκαμψη των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης p38MAPK .....	145
7.3	Η αναστολή της p38MAPK κατά την ανάκαμψη των κυττάρων από RAPA αλλά όχι από LY οδηγεί στο σχηματισμό πρωτογενών μικροτριχιδίων.....	146
7.4	Συμπεράσματα – Προοπτικές.....	149
8.	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	151
8.1	<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	151
8.2	<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ</b> .....	154
9.	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	155



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) που εδράζεται στην Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο Αναπληρωτής καθηγητής του ΤΒΕΤ Δρ. Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Μιχαηλίδη για την ενεργό συμμετοχή του στην διεκπεραίωση της διατριβής καθώς και για τις καθοριστικής σημασίας επισημάνσεις και συμβουλές που μου παρείχε. Φυσικά η υπομονή και η επιμονή που επέδειξε καθώς και οι γνώσεις που μας μετέφερε διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ενός επιστημονικού και δημιουργικού περιβάλλοντος στο εργαστήριο.

Συνεχίζοντας, θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Αλέξανδρο Τσελέπη, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η συμβολή του οποίου ήταν καταλυτική για τα πειράματα Κυτταρομετρίας Ροής καθώς μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε το Κυτταρόμετρο Ροής του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Χημείας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Περικλή Παππά, επίκουρο καθηγητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος μας δέχτηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας και μας βοήθησε στην πραγματοποίηση των πειραμάτων της QPCR.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαρία Γρηγορίου, αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θράκης και τον Δρ. Ευστάθιο Χατζηλουκά, αναπληρωτή καθηγητή του ΤΒΕΤ, μέλη της συμβουλευτικής τριμελούς επιτροπής μου, για την παρακολούθηση και υποστήριξη της προόδου της διατριβής μου από την πρώτη στιγμή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου και μέλη ΔΕΠ του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Θεόδωρο Φώτση, Δρ. Θεώνη Τράγκα, Δρ. Μαρίκα Σύρρου και Δρ. Γεώργιο Θυφρονίτη για την πολύτιμη συμμετοχή τους και τη συμβολή τους στη διαδικασία αξιολόγησης της διατριβής.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ομάδας που με στήριξαν, με βοήθησαν στην πραγματοποίηση μέρους των πειραμάτων και έκαναν την παρουσία μου στο χώρο αποδοτική. Αυτοί είναι οι Υποψήφιοι Διδάκτορες: Ιωάννης Τσίγκας, ο οποίος

συνέβαλε στα πειράματα ανοσοφθορισμού και Μαρούσα Δαρσινού, η οποία έχει αναλάβει την καλλιέργεια των νευρικών βλαστικών κυττάρων, η Αλεξία Τσακανέλη, η οποία βοήθησε στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων, η Νατάσα Ξαγαρά και Ευτυχία Βασίλη, καθώς και η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Θεοδώρα Σούρδη και οι προπτυχιακοί φοιτητές που δημιουργούσαν πάντα μια ευχάριστη και ανανεωμένη ατμόσφαιρα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου και τους στενούς μου φίλους για την συνεχή υποστήριξη, την κατανόηση και την αισιοδοξία που μου παρείχαν στις δύσκολες στιγμές.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- APC/C: Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (Σύμπλεγμα προαγωγής της ανάφασης)
- ATM/ATR: Ataxia telangiectasia mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
- bFGF: basic Fibroblast Growth Factor
- BrdU: Bromo-deoxyuridine (Βρωμο-δεοξουριδίνη)
- CDK: Cyclin-Dependent Kinase
- CHCl<sub>3</sub>: Χλωροφόρμιο
- CKIs: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors (Αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών)
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- ddH<sub>2</sub>O: Double-distilled (διδς απεσταγμένο) H<sub>2</sub>O
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide
- dn: dominant negative
- DNA: Deoxyribonucleic Acid
- DNase: Deoxyribonuclease (Δεοξυριβονουκλεάση)
- EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetic acid
- EGF: Epidermal Growth Factor
- eIF4E: eukaryotic Initiation Factor 4E
- EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition
- et al.,: και συνεργάτες
- EtOH: Αιθανόλη
- FBS: Fetal Bovine Serum
- FGF: Fibroblast Growth Factor
- HBS: HEPES-buffered saline
- Hsp: Heat shock protein
- IGF1: Insulin-like Growth Factor 1
- IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor
- LY: LY294002

- MAPKs: Mitogen-Activated Protein Kinases
- MPF: Maturation Promoting Factor (παράγοντας προαγωγής της φάσης M)
- mTORC1/2: mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
- NSCs: Neural Stem Cells
- O/N: OverNight
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
- PI3k: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 – kinase
- Plk1: Κινάση Polo 1
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- pRb: φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος
- QPCR: Quantitative (Ποσοτική) PCR
- RA: Retinoic Acid
- RAPA: RAPAMYCIN (ραπαμυκίνη)
- RNA: Ribonucleic Acid
- RNase: Ribonuclease (Ριβονουκλεάση)
- rpm: revolutions per minute
- SDS: Sodium Dodecyl sulfate
- Ser: Serine (Σερίνη)
- Thr: Threonine (Θρεονίνη)
- Tyr: Tyrosine (Τυροσίνη)
- wt: wild type

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διαταραχές στην ενεργοποίηση του άξονα «*Ινσουλίνη - PI3k – mTOR - p70s6k*» έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη ασθενειών, ανάμεσά τους και ο καρκίνος. Η αναστολή των μονοπατιών PI3k/Akt και mTOR με εξειδικευμένους αναστολείς όπως είναι χημικά μόρια με δράση ανάλογη του LY294002 και της ραπαμυκίνης, αποτελεί μια από τις στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνων, όπως είναι το νευροβλάστωμα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η στόχευση μορίων, που βρίσκονται ανοδικά στο μονοπάτι αυτό, όπως είναι η PI3k αναστέλλει με αντιστρεπτό τρόπο τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων καθώς τα οδηγεί σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0, όπως φαίνεται από την ελαχιστοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ki67 και την αύξηση της p27, ένα φαινόμενο το οποίο αντιστρέφεται μετά την απομάκρυνση του αναστολέα LY294002. Αντίθετα, η δράση της ραπαμυκίνης, η οποία στοχεύει σε μόρια που βρίσκονται χαμηλά στο μονοπάτι όπως είναι το mTOR, προκαλεί μόνιμες μεταβολές στη βιολογία των κυττάρων, όπως είναι η παρεμπόδιση της διαφοροποίησης και η μη ομαλή πρόοδος του πολλαπλασιασμού (γρήγορη διέλευση από τις φάσεις της μίτωσης μετά την απομάκρυνσή της), διαδικασίες οι οποίες συνοδεύονται από αναστολή της ενεργότητας της κινάσης p70s6k. Η δράση μονοπατιών που ενεργοποιούνται σε συνθήκες στρες, όπως είναι η σηματοδότηση από την p38MAPK είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της p70s6k και την ανάκαμψη των κυττάρων, αφού η αναστολή της μετά την απομάκρυνση του LY294002 και της ραπαμυκίνης οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των μορίων – δεικτών του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα (Ki67, pH3 και ακετυλιωμένη τουμπουλίνη). Παρατηρήσαμε επίσης ότι η αναστολή της p38MAPK κατά την ανάκαμψη από ραπαμυκίνη, οδηγεί τα κύτταρα σε μια εναλλακτική κατάσταση επιβίωσης, κατά την οποία τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται (Ki67) και εμφανίζουν χαρακτηριστικές τριχοειδείς προεκβολές, που είναι γνωστές ως πρωτογενή μικροτριχίδια (primary cilia). Η παρουσία αυτών των δομών στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα είναι θεμελιώδης για την χωρική οργάνωση των κυττάρων στους νευρικούς ιστούς. Ο σχηματισμός των μικροτριχιδίων παρατηρήθηκε μόνο κατά την ανάκαμψη από

την αναστολή του mTOR και όχι της κινάσης PI3K, γεγονός που ίσως συνδέεται με την απορρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου από τη ραπαμυκίνη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναδεικνύουν για πρώτη φορά μια αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών mTOR – p38 – p70s6k, η οποία φαίνεται ότι έχει ενεργό ρόλο στην ανάκαμψη των νευροβλαστωματικών κυττάρων από συνθήκες στρες που προκαλούνται από την παρεμπόδιση του άξονα PI3k/Akt – mTOR. Κατά συνέπεια, θεραπείες που στηρίζονται στη χρήση φαρμάκων (όπως ανάλογα της ραπαμυκίνης) που αναστέλλουν το mTOR είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με αναστολείς μορίων που επάγουν την επιβίωση, όπως η p38MAPK, ενδέχεται να μην είναι αποτελεσματικές επειδή τα κύτταρα μπορεί να αποκτούν νέες ιδιότητες. Αντίθετα, προσεγγίσεις που στοχεύουν σε μόρια που βρίσκονται ανοδικά στο μονοπάτι PI3k – mTOR (όπως μόρια ανάλογα του LY294002) σε συνδυασμό με την αναστολή της p38MAPK ή της Hsp90 θα μπορούσαν να αποτελούν έναν νέο τρόπο αντιμετώπισης καρκίνων όπως το νευροβλάστωμα. Αποκαλύπτεται τέλος, ότι τα νευροβλαστωματικά κύτταρα έχουν μηχανισμούς δημιουργίας πρωτογενών μικροτριχιδίων, ένα χαρακτηριστικό που αξίζει περαιτέρω διερεύνηση, αφού μπορεί να συνδέεται με την ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας, και θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ελκυστικό φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπισή του νευροβλαστώματος.

## 2. ABSTRACT

The dysregulation of the "*Insulin - PI3k - mTOR - p70s6k*» axis has been associated with the development of serious diseases, such as cancer. Consequently, the inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway with specific agents represents a clinically relevant target and has been employed to combat various types of cancers, including neuroblastoma.

The results of this study revealed that targeting molecules which are acting upstream on this pathway, such as the PI3K kinase, leads to a reversible inhibition of neuroblastoma cell proliferation, by forcing the cells to enter a G0-like state or quiescence, as it is shown by the significant reduction of Ki67 and the increase in p27 protein levels, a phenomenon which is reversed after removal of the inhibitor. In contrast, the application of drugs acting downstream on this signaling axis, such as the mTOR inhibitor rapamycin causes permanent changes in the biology of neuroblastoma cells, including inhibition of the differentiation potential and abnormal proliferation, the latter reflected by an unusually rapid passage through the early prophase stages of mitosis after the removal of the drug. Importantly, these phenomena are accompanied by an irreversible inhibition of the p70s6k kinase activity. We further observed that activation of stress response pathways such as the p38MAPK kinase cascade is essential for both, the activation of p70s6k and the recovery of cells, after drug withdrawal, since inhibition of p38MAPK impairs the expression of the proliferation markers Ki67 and PH3, and the formation of midbodies. Interestingly, the inhibition of p38MAPK activity during recovery from rapamycin treatment induces a survival state in which the cells do not proliferate (Ki67-), and they also form primary cilia, microtubule-based organelles known to be involved in sensing the surrounding milieu and processing of developmental signals. The presence of these structures in neuronal progenitors has also been shown to be essential for the spatial organization of the cells in the neural tissues. Interestingly, the induction of ciliogenesis was observed only during recovery of the cells from the inhibition of mTOR, which may be related to the deregulation of the cell cycle checkpoint control mechanisms by rapamycin.

In conclusion, our data reveal an interplay between the mTOR - p38 - p70s6k molecules which appears to have an active role in the recovery of neuroblastoma cell from stress conditions that are caused by the inhibition of the PI3k/Akt – mTOR axis. Thus, therapies that are based on application of drugs (like the rapalogs) which inhibit mTOR, either as monotherapy, or in combination with inhibitors of molecules that induce survival, such as the p38MAPK kinase, may not be effective because the cells can acquire new properties. In contrast, approaches which are based on targeting molecules that are located upstream of the PI3k - mTOR pathway (such analogs of LY294002) in combination with inhibition of p38MAPK or of the chaperon protein Hsp90, might provide a new strategy for treating cancers such as neuroblastoma. Finally, from this work it is disclosed that neuroblastoma cells have mechanisms of inducing ciliogenesis, a process that merits further investigation since it can be associated with the development of chemoresistance, and hence could be an attractive target for drug development against this disease.



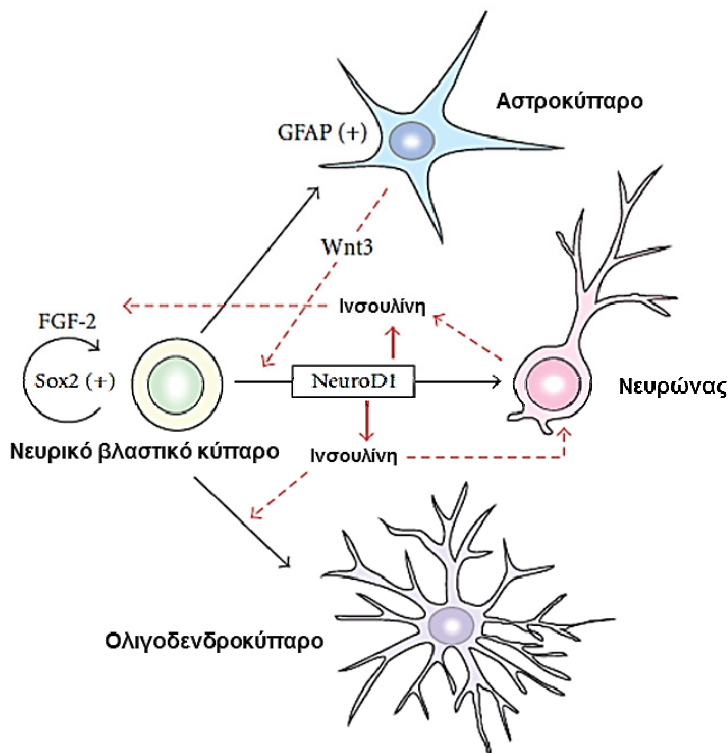
### **3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **3.1 Ο ρόλος του μονοπατιού της Ινσουλίνης/IGF1 στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος**

Το μονοπάτι της ινσουλίνης και του συγγενικού της αναπτυξιακού παράγοντα, Insulin-like growth factor 1 (IGF1) ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον είναι υψηλά και ρυθμίζει διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η επιβίωση των κυττάρων, και η ανάπτυξη. Παρουσία γλυκόζης παράγεται ινσουλίνη από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και προάγει τον καταβολισμό της γλυκόζης, την αποθήκευση της στο συκώτι και στους μύες καθώς και την αποθήκευση λίπους στο λιπώδη ιστό. Η αφθονία των θρεπτικών συστατικών οδηγεί στην παραγωγή του IGF1 από το συκώτι ο οποίος ρυθμίζει κυρίως την επιβίωση των κυττάρων και την ανάπτυξη του οργανισμού (Rafalski et al., 2011). Δεν είναι πλήρως γνωστό πώς ρυθμίζονται οι διαφορετικοί ρόλοι της ινσουλίνης και του IGF1 μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο πιστεύεται ότι βασικές διαφορές στη δομή τους αλλά και στη δομή των υποδοχέων τους αντανakλούν τη διαφορετική συγγένεια με τα υποστρώματα τους. Επίσης, η λειτουργία των πρωτεϊνών IGF-BPs (IGF-1 binding proteins) οι οποίες ελέγχουν τη σύνδεση του IGF-1 με τους υποδοχείς του και η διαφορετική κατανομή των υποδοχέων της ινσουλίνης και του IGF1 στους διάφορους ιστούς αποτελούν δυο ακόμη στοιχεία της διαφορετικής λειτουργίας τους (Rafalski et al., 2011).

Η ινσουλίνη και ο IGF παίζουν πολύ βασικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης εκφράζεται ο IGF2 όπως δίνει τη θέση του στον IGF1 στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης ([www.ncbi.nlm](http://www.ncbi.nlm)). Μελέτες έχουν δείξει ότι η λειτουργία της ινσουλίνης/IGF καθώς και των υποδοχέων τους είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου που βρίσκεται στο προ-παγκρεατικό στάδιο και στις περιοχές που θα μετατραπούν όχι μόνο σε πάγκρεας αλλά σε συκώτι και λεκιθικό σάκο. Ακόμη, η ινσουλίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό και άλλων εμβρυικών κυττάρων όπως είναι οι πρόδρομοι των μυϊκών και των νευρικών κυττάρων (Liu et al., 1997).

Υποδοχείς της ινσουλίνης/IGF1 βρίσκονται και στον εγκέφαλο και ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος τους στα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs). In vivo και in vitro πειράματα έχουν αποδείξει ότι ο IGF1 αλληλεπιδρώντας και με άλλους αναπτυξιακούς παράγοντες (bFGF και/ή EGF) επάγει τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των NSCs τόσο προς νευρωνική όσο και προς ολιγοδενδριτική μοίρα (Aberg et al., 2003). Έχει βρεθεί πως η ινσουλίνη παράγεται και στον εγκέφαλο τόσο στο εμβρυικό όσο και στο ενήλικο στάδιο, αλλά ο ρόλος της ινσουλίνης στον εγκέφαλο είναι διαφορετικός απ' ότι στο συκώτι και στους μύες. Η κύρια δράση της είναι η ρύθμιση της ομοιόστασης της ενέργειας του οργανισμού διατηρώντας την ισορροπία των επιπέδων της γλυκόζης και δρώντας στα κέντρα ελέγχου της σίτισης του υποθαλάμου (hypothalamic feeding centers) (Yu et al., 2008). Όπως συμβαίνει και με τον IGF1, υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης στον εγκέφαλο επάγουν τον πολλαπλασιασμό, την αυτό-ανανέωση των NSCs καθώς και τη διαφοροποίηση προς νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα (εικόνα 3.1) (Machida et al., 2012). Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων της οδηγεί σε αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο, μια διαδικασία που επάγεται όταν τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου είναι πολύ χαμηλά (Yu et al., 2008).



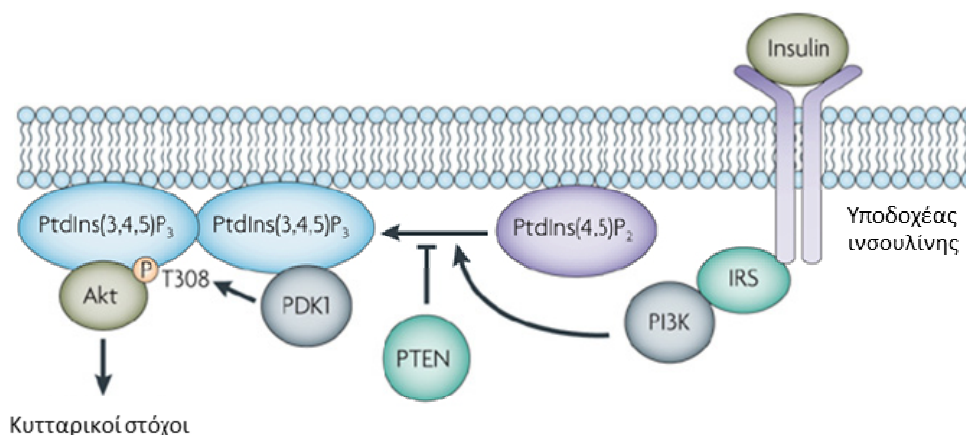
**Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση των μορίων και των σημάτων που εμπλέκονται στην ενήλικη νευρογένεση.** Τα αδιαφοροποίητα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Sox2, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αυτό-ανανέωσή τους. Η παρουσία του αναπτυξιακού παράγοντα FGF-2 σε συνδυασμό με τη δράση της ινσουλίνης και του IGF1 προάγουν τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Τα αστροκύτταρα εκκρίνουν τον παράγοντα Wnt3 ο οποίος επάγει τη διαφοροποίηση προς τη νευρική μοίρα ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα NeuroD1. Ο NeuroD1, εκτός των άλλων, προάγει την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης, η οποία οδηγεί στη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων προς ολιγοδενδροκύτταρα. Επίσης, η ινσουλίνη, ο IGF1 και ο IGF2 προάγουν την επιβίωση των νευρικών κυττάρων και παρεμποδίζουν τον κυτταρικό θάνατο (Τροποποίηση από: Machida et al., 2012).

### **3.2 Η δράση της ινσουλίνης και του IGF1 διαμεσολαβείται από τη σηματοδότηση PI3K/AKT**

Η ινσουλίνη και ο IGF1 δρουν μέσω της ενεργοποίησης βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το PI3k/Akt – mTOR, PI3k/Akt – FOXO και Ras/MAPK. Ο βασικός στόχος της ινσουλίνης/IGF1 ειδικά στα νευρικά κύτταρα είναι η σηματοδότηση PI3k/Akt – mTOR. Το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται και από την παρουσία άλλων αναπτυξιακών παραγόντων όπως είναι ο VEGF, PDGF, EGF και ο FGF. Χαρακτηριστικό όλων αυτών των μορίων είναι ότι συνδέονται σε υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (RTKs). Δηλαδή, η σύνδεση του αναπτυξιακού παράγοντα οδηγεί στην ενεργοποίηση – αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα σε κατάλοιπο τυροσίνης. Το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο αναγνωρίζεται απευθείας από την υπομονάδα p85 της κινάσης PI3k. Βέβαια, σε κάποιες περιπτώσεις, όπως του υποδοχέα της ινσουλίνης, απαιτείται μια ενδιάμεση πρωτεΐνη (insulin receptor substrate protein - IRS) για την προσέλκυση της PI3k στον υποδοχέα (Brock T. 2009).

Η κινάση PI3k είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δυο υπομονάδες: μια ρυθμιστική περιοχή 85kDa και μια καταλυτική περιοχή 100kDa. Η αναγνώριση της φωσφορυλιωμένης περιοχής των τυροσινικών υποδοχέων και η σύνδεση της υπομονάδας p85 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PI3k. Η PI3k, μέσω της καταλυτικής περιοχής p100, φωσφορυλιώνει το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2 ή PIP2) με αποτέλεσμα την παραγωγή του phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3 ή PIP3). Η

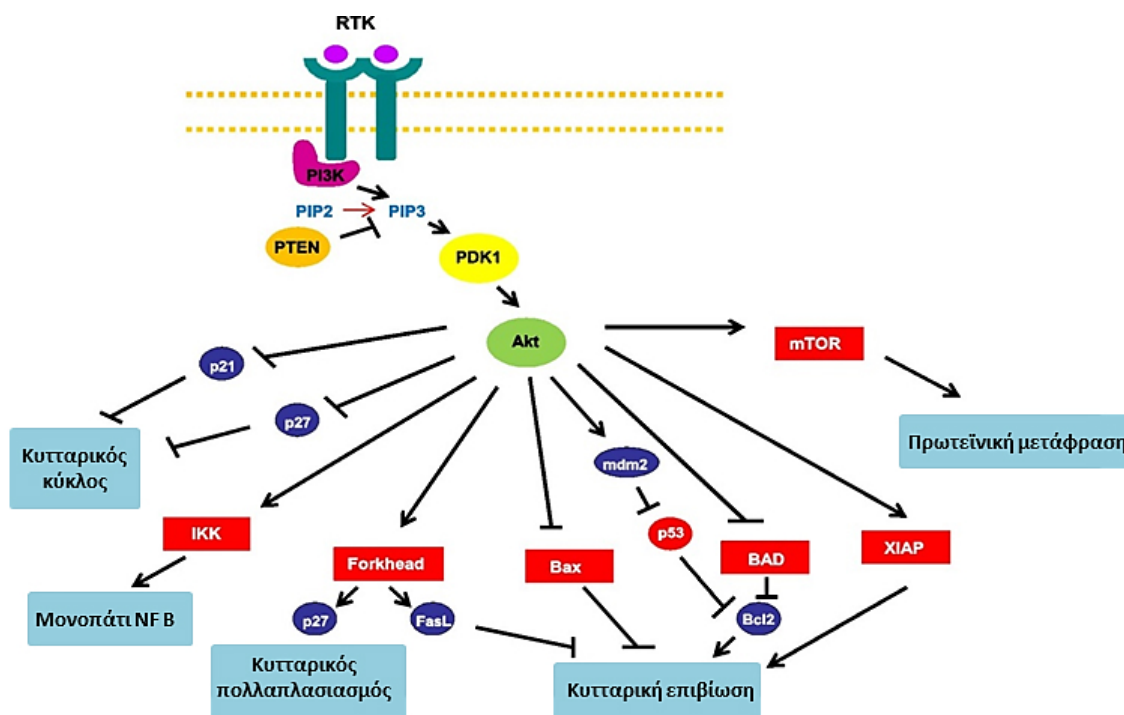
δημιουργία του PIP3 αναστέλλεται από τη φωσφατάση PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) η οποία αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από το PIP3 και το μετατρέπει σε PIP2. Το PIP3 προσελκύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τις κινάσες Akt και PDK1 (ή PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) αναγνωρίζοντας την κοινή περιοχή των δυο μορίων, PH (pleckstrin homology). Αυτή η συνεντόπιση έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της Akt στο ενεργοποιητικό της κατάλοιπο, Thr308, από την PDK1 (Εικόνα 3.2). Για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt και την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα υποστρώματα απαιτείται η φωσφορυλίωσή της και στο κατάλοιπο Ser473 από το σύμπλοκο mTORC2 (Tchevkina et al., 2012).



**Εικόνα 3.2:** Απεικόνιση της ενεργοποίησης της PI3k και της Akt από την ινσουλίνη μέσω του υποδοχέα της (Τροποποίηση από: Buchkovich et al., 2008).

Η πρωτεΐνη Akt αποτελεί ένα από τα βασικά μόρια επιβίωσης και ανήκει στην κατηγορία των AGC κινασών (όπως και οι PKA, PKG και PKC). Φωσφορυλιώνει τους στόχους της σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, γι αυτό και ονομάζεται κινάση σερίνης/θρεονίνης. Ρυθμίζει σχεδόν όλες τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η μεταγραφή, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Η κινάση Akt, αφού ενεργοποιηθεί, απομακρύνεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη για να φωσφορυλιώσει τους στόχους της. Εισέρχεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες CREB (cAMP response element binding), NF-κB (nuclear factor kappa from B cells), E2F (eukaryotic transcription factor 2) και MDM2 (murine double minute 2). Ακόμη, φωσφορυλιώνει και

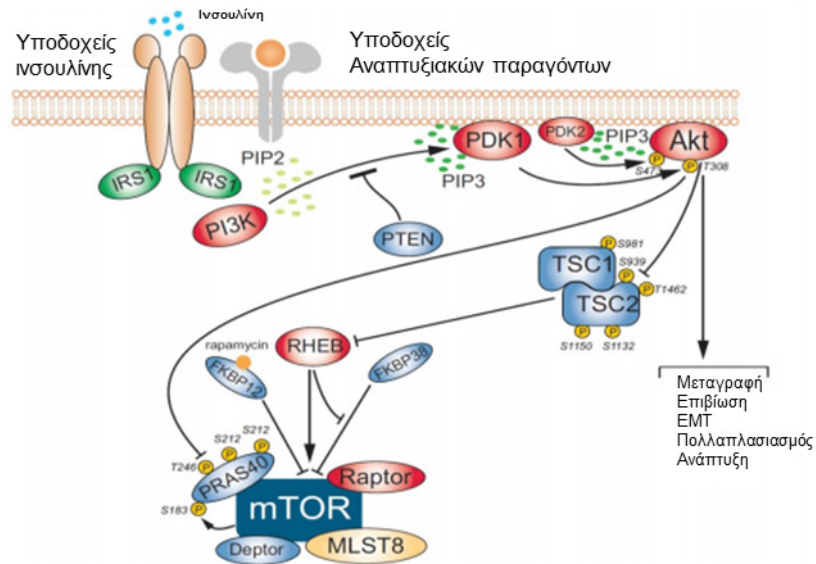
απενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες (Forkhead box O1 & O3) FOXO1 και FOXO3. Κάποιοι από τους κυτταροπλασματικούς της στόχους είναι η κινάση GSK-3β (glycogen-synthase kinase-3β) την οποία φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο Ser9 και εμποδίζει την απενεργοποιητική της δράση στον στόχο του μονοπατιού Wnt, β-catenin. Επίσης, παρεμποδίζει την απόπτωση φωσφορυλιώνοντας την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAD και επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου παρεμποδίζοντας τη δράση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p21 και p27 όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.3 (Grasso et al., 2012).



Εικόνα 3.3: Οι στόχοι της κινάσης Akt (Τροποποίηση από: Grasso et al., 2012).

Η πιο βασική δράση της κινάσης Akt που συνδέεται με την επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι η ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται κυρίως μέσω παρεμπόδισης της δημιουργίας του ογκοκατασταλτικού συμπλόκου TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1/2). Η κινάση Akt φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TSC2 σε αρκετά κατάλοιπα. Στα θηλαστικά, συγκεκριμένα, στοχεύει στα κατάλοιπα Ser939 και Thr1462 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δημιουργίας του συμπλόκου TSC1/TSC2. Όταν το σύμπλοκο είναι ενεργό αλληλεπιδρά με τη GTPαση Rheb και τη μετατρέπει στην ανενεργή GDP-συνδεδεμένη μορφή. Η πρωτεΐνη Rheb συνδέεται

με το σύμπλοκο mTORC1 σε οποιαδήποτε μορφή και να βρίσκεται. Ωστόσο, η σύνδεση της ανενεργής πρωτεΐνης Rheb (δηλαδή απουσία GTP) δεν οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 (εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.4:** Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κινάσης Akt με το σύμπλοκο mTORC1 (Τροποποίηση από: Tchekina et al., 2012).

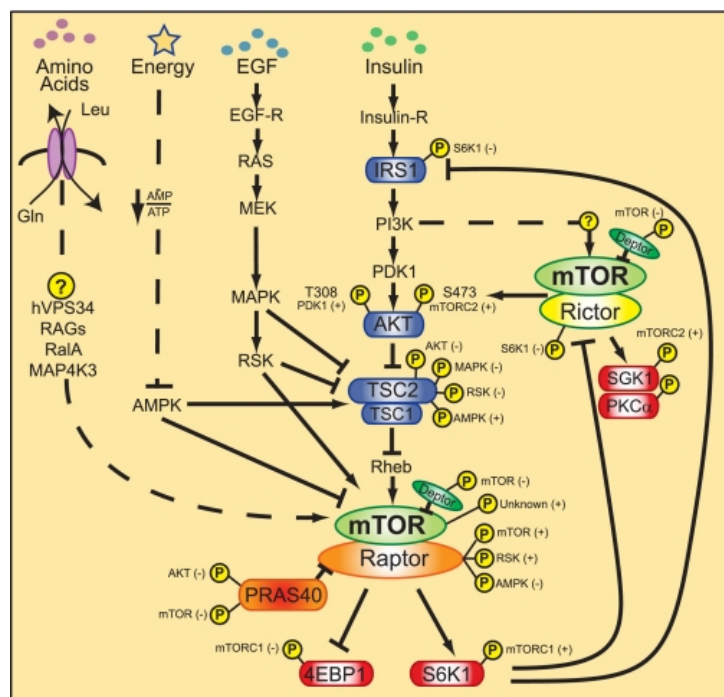
Ένας δεύτερος τρόπος ενεργοποίησης του συμπλόκου mTORC1 μέσω της Akt είναι η φωσφορυλίωση του αναστολέα PRAS40 στο κατάλοιπο Thr246 (εικόνα 3.4). Αυτή η τροποποίηση οδηγεί στην αποδέσμευση του PRAS40 από το σύμπλοκο mTORC1 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ικανότητας του PRAS40 να αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου (Tchekina et al., 2012). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η κινάση Akt μπορεί να φωσφορυλιώνει και άμεσα την πρωτεΐνη mTOR στο κατάλοιπο (Ser2448) και να την ενεργοποιεί (Sekulic et al., 2000).

### 3.3 Το μονοπάτι σηματοδότησης mTOR

Το μονοπάτι σηματοδότησης TOR (Target of Rapamycin) αποτελεί έναν εξαιρετικά συντηρημένο μηχανισμό από το ζυμομύκητα μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά και ενεργοποιείται από μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών σημάτων. Η ονομασία του προέρχεται από το αντιβιοτικό ραπαμυκίνη το οποίο αναστέλλει τη λειτουργία του και αποτέλεσε το μέσο για την ανακάλυψη της πρωτεΐνης TOR καθώς στις αρχές του 1990 γενετικοί έλεγχοι σε ζυμομύκητα ανέδειξαν τις πρωτεΐνες TOR1 και TOR2 ως τους διαμεσολαβητές της τοξικότητας της ραπαμυκίνης στα κύτταρα (Cafferkey et al., 1993). Λίγο αργότερα απομονώθηκε η κινάση TOR και στα θηλαστικά ως φυσικός στόχος της ραπαμυκίνης και ονομάστηκε

mTOR (mammalian TOR) (Sabatini et al., 1994).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR ενεργοποιείται από την παρουσία αναπτυξιακών παραγόντων, αντιλαμβάνεται τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου καθώς και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (εικόνα 3.5) και συμμετέχει στη



Εικόνα 3.5: Η ρύθμιση της σηματοδότησης mTOR (Foster et al., 2010)

του κυττάρου στις αλλαγές

των περιβαλλοντικών συνθηκών. Όπως προαναφέρθηκε η παρουσία ινσουλίνης και IGF1 (όπως και VEGF) ενεργοποιεί το mTOR μέσω της σηματοδότησης PI3k/Akt – TSC1/2. Η αναστολή του συμπλόκου TSC1/2 αποτελεί επίσης το μέσο για την ενεργοποίηση του συμπλόκου mTOR από τον EGF. Ακόμη, το Wnt ενεργοποιεί το mTOR αναστέλλοντας τη δράση της κινάσης GSK3 η οποία κανονικά φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TSC2 επάγοντας την ανασταλτική της δράση στο σύμπλοκο mTOR (Foster et al., 2010).

Αξίζει να σημειωθεί ότι χαμηλά επίπεδα ενέργειας εντός του κυττάρου αναστέλλουν τη σηματοδότηση mTOR μέσω ενεργοποίησης της κινάσης AMPK που

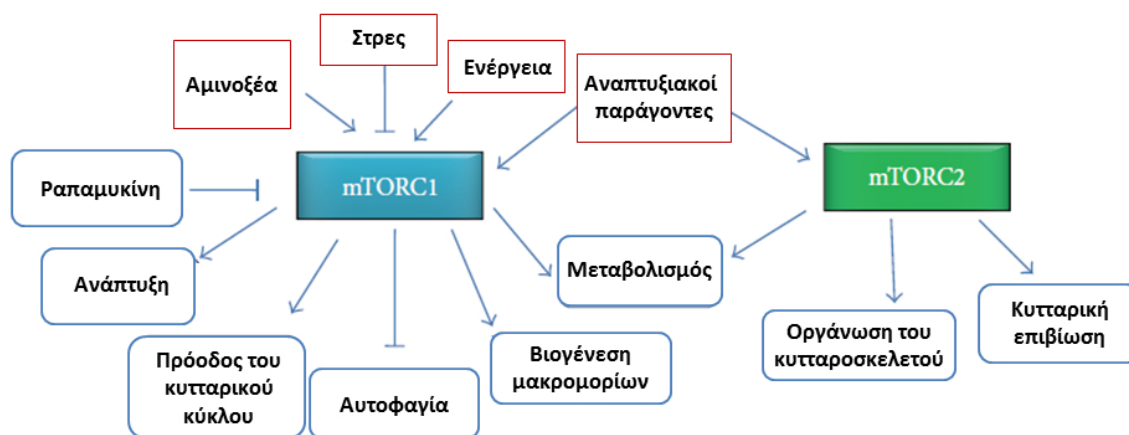
ακολουθείται από ενεργοποίηση του συμπλόκου TSC1/TSC2. Επίσης, η έλλειψη αμινοξέων και θρεπτικών συστατικών καταστέλλει την ενεργοποίηση του mTOR ακόμη και όταν υπάρχει περίσσεια αναπτυξιακών παραγόντων. Αυτή η ενέργεια διαμεσολαβείται από την καταστολή των GTPασων RAG και Ra1A καθώς και από την κινάση hVPS34, η οποία ανήκει στην κατηγορία των κινασών PI3k τάξης III (εικόνα 3.5). Τέλος, διάφορα είδη στρες όπως υποξία, βλάβες στο DNA, οσμωτικό και μηχανικό στρες αναστέλλουν τη σηματοδότηση mTOR επάγοντας τη δράση του συμπλόκου TSC1/TSC2 (Foster et al., 2010).

### **3.3.1 Το σύμπλοκο mTOR**

Η πρωτεΐνη mTOR είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και ανήκει στην κατηγορία των PI3K-συσχετιζόμενων κινασών (PIKKs) καθώς η καρβοξυτελική της περιοχή παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την καταλυτική περιοχή της PI3k. Αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες για το σχηματισμό δυο πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, των mTORC1 και mTORC2. Το σύμπλοκο mTORC1 διαδραματίζει βασικό ρόλο στη σηματοδότηση mTOR καθώς αποτελεί τον κύριο αποδέκτη των σημάτων που ρυθμίζουν τη δράση αυτής της σηματοδότησης (εικόνα 3.5). Το mTORC1 ελέγχει σχεδόν όλες τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι η πρωτεϊνοσύνθεση, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η βιοσύνθεση των μακρομορίων και η ανάπτυξη και καταστέλλει την αυτοφαγία (Showkat et al., 2014).

Το σύμπλοκο mTORC2 ενεργοποιείται παρουσία αναπτυξιακών παραγόντων και είναι απαραίτητο για τον μεταβολισμό, όπως και το mTORC1. Ωστόσο, οι κύριες λειτουργίες του διαφέρουν από το mTORC1 καθώς επάγει την οργάνωση του κυτταροσκελετού και την κυτταρική επιβίωση (εικόνα 3.6).

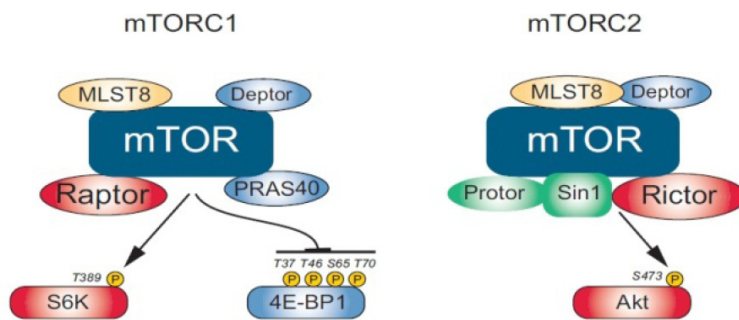




Εικόνα 3.6: Οι λειτουργίες των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 (Τροποποίηση από: Showkat et al., 2014).

Τα δυο σύμπλοκα (mTORC1 και mTORC2) έχουν διαφορετική ευαισθησία στο αντιβιοτικό ραπαμυκίνη και ελαφρώς διαφορετική σύνθεση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.7, το σύμπλοκο mTORC1 αποτελείται από τις ακόλουθες πρωτεΐνες: την κινάση mTOR, την πρωτεΐνη raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin), η οποία καθορίζει τη συνάθροιση του συμπλόκου και τη σύνδεσή του στα υποστρώματα, τον στόχο της Akt, PRAS40 (proline-rich Akt substrate-40 kDa), τον αναστολέα του mTOR, DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) και την πρωτεΐνη mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8) της οποίας η λειτουργία δεν είναι ακόμη γνωστή. Το σύμπλοκο συμπληρώνεται με την παρουσία των πρωτεϊνών Tti1 και Tel2, οι οποίες δρουν ως μόρια ικρίωματος (scaffold proteins) και είναι απαραίτητες για τη συνάθροιση και τη σταθερότητα του συμπλόκου.

Οι πρωτεΐνες mTOR, DEPTOR, mLST8, Tti1 και Tel2 αποτελούν συστατικά και του συμπλόκου mTORC2. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο απαρτίζεται ακόμη από τις ακόλουθες πρωτεΐνες: rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) η δράση του οποίου είναι ανάλογη της raptor στο mTORC1, mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1) που λειτουργεί ως πρωτεΐνη του ικρίωματος και είναι απαραίτητη για τη συνάθροιση του συμπλόκου όπως είναι και οι πρωτεΐνες pitor 1 και 2 (protein observed with rictor 1 and 2) (Laplante et al., 2012).



Εικόνα 3.7: Σύσταση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 και παρουσίαση των κύριων στόχων τους (Tchevkina et al., 2012).

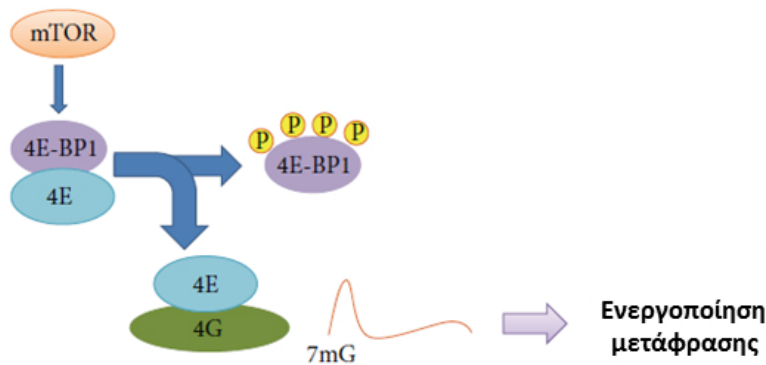
Οι διαφορές στη σύσταση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 καθώς και οι διαφορετικοί άνωθεν ρυθμιστές τους αντανακλούν τη διαφορετικότητα των στόχων των δυο συμπλόκων. Ο κύριος στόχος του mTORC2 είναι η κινάση Akt, την οποία, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιεί φωσφορυλιώνοντάς τη στο κατάλοιπο Ser473. Η συγκεκριμένη τροποποίηση είναι απαραίτητη για την Akt προκειμένου να επάγει διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η κυτταρική ανάπτυξη, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, και να αναστείλει την απόπτωση. Επίσης, η ενεργοποίηση της Akt είναι ο κύριος τρόπος με τον οποίο το σύμπλοκο mTORC2 επάγει την οργάνωση του κυτταροσκελετού (Sen et al., 2014). Δυο ακόμη βασικοί στόχοι του συμπλόκου mTORC2 είναι οι κινάσες SGK (serum and glucocorticoid-inducible kinase) και PKC (protein kinase C) (Showkat et al., 2014).

### 3.3.2 Στόχοι του συμπλόκου mTORC1

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι στόχοι του συμπλόκου mTORC1 είναι η πρωτεΐνη 4E-BP1 και η κινάση p70s6k.

- *4E-BP1*. Η πρωτεΐνη 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1) λειτουργεί ως αναστολέας της έναρξης της μετάφρασης καθώς συνδέεται στον παράγοντα eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) και αναστέλλει τη δράση του. Ο συγκεκριμένος παράγοντας, όταν είναι ενεργός, συνδέεται με τους eIF4A και eIF4G με σκοπό τη δημιουργία του συμπλόκου eIF4F. Το σύμπλοκο eIF4F συνδέεται στο μεθυλιωμένο 5' άκρο του mRNA και επάγει την αλληλεπίδραση του με τα ριβοσώματα,

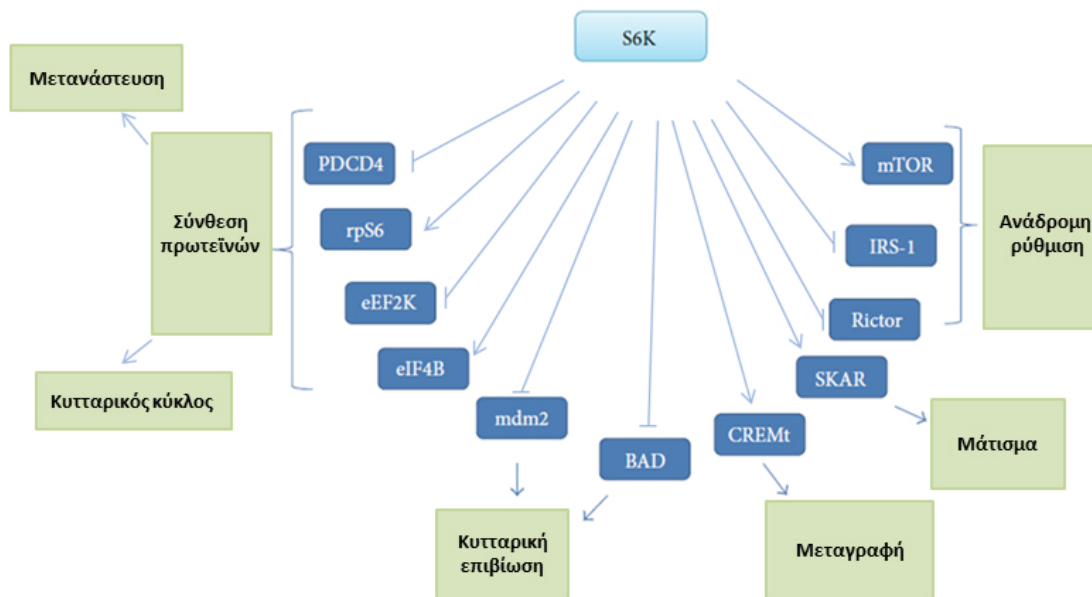
με σκοπό τη μετάφρασή του (εικόνα 3.8). Η πρωτεΐνη 4E-BP1 συνδέεται στον eIF4E και παρεμποδίζει τη σύνδεση του με τους άλλους παράγοντες. Η κινάση mTOR φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη 4E-BP1 και την απενεργοποιεί με αποτέλεσμα να επάγεται η μετάφραση. Τα βασικά κατάλοιπα στα οποία το mTORC1 φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη 4E-BP1 είναι τα Thr37, Thr46, Ser65 και Thr70. (Showkat et al., 2014).



Εικόνα 3.8: Ρύθμιση της δράσης της πρωτεΐνης 4E-BP1 (Τροποποίηση από: Showkat et al., 2014).

- *P70s6k*. Η 70kDa ριβοσωμική S6 κινάση (p70s6k) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ανήκει στην οικογένεια των AGC κινασών και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του κυττάρου (Showkat et al., 2014). Βρίσκεται σε δυο ισομορφές: μια 70kDa η οποία είναι κυτταροπλασματική και μια 85kDa που είναι πυρηνική. Η αλληλουχία τους είναι ίδια εκτός από 23 αμινοξέα στην 85kDa ισομορφή που αποτελούν το σήμα εισόδου στον πυρήνα. Έχουν χαρακτηριστεί δυο ομόλογες p70s6k πρωτεΐνες: η p70s6k1 και η p70s6k2 οι οποίες έχουν 70% ομολογία και είναι ευαίσθητες στο αντιβιοτικό ραπαμυκίνη που σημαίνει ότι και οι δυο φωσφορυλιώνονται από την κινάση mTOR. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες διαφορές στη λειτουργία τους όπως για παράδειγμα, μόνο η p70s6k2, και όχι η p70s6k1, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με το μονοπάτι Sonic Hedgehog (Mizuarai et al., 2009). Η κινάση p70s6k ενεργοποιείται ύστερα από φωσφορυλίωση σε αρκετά κατάλοιπα. Έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής οι ακόλουθες θέσεις ανασταλτικής αυτοφωσφορυλίωσης της p70: Ser404, Ser411, Ser418, Ser424 και Thr421. Ακόμη, έχουν βρεθεί τρεις θέσεις στην καταλυτική της περιοχή που επάγουν τη δράση της και είναι οι: Thr229, Ser371 και Thr389. Η αυτοφωσφορυλίωση της p70s6k επάγεται από μέλη της οικογένειας των MAPK όπως είναι η κινάση p38.

Αντίθετα, η φωσφορυλίωση στη θέση Thr229 πραγματοποιείται από την PDK1 ενώ το σύμπλοκο mTORC1 είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση στις θέσεις Thr389 και Ser371 (Berven et al., 2000). Η p70s6k συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες του κυττάρου (εικόνα 3.9). Ο πιο βασικός της ρόλος είναι η ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης κυρίως μέσω της φωσφορυλίωσης της s6 ριβοσωμικής πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη επάγει τη μετάφραση των 5' TOP mRNAs, δηλαδή mRNAs τα οποία περιέχουν μια αλληλουχία ολιγοπυριμιδίνης στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Τα 5' TOP mRNAs κωδικοποιούν συστατικά της μεταφραστικής μηχανής όπως είναι παράγοντες επιμήκυνσης, ριβοσωμικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που συνδέονται στην ουρά poly(A) του mRNA. Εκτός από την s6 πρωτεΐνη, η p70s6k ενεργοποιεί την πρωτεϊνοσύνθεση φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4B ο οποίος με αυτό τον τρόπο δημιουργεί σύμπλοκο με τον eIF4A. Επίσης, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τον ογκοκαταστολέα PDCD4, μια πρωτεΐνη η οποία παρεμποδίζει τη λειτουργία του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4A. Επίπροσθέτως, η p70s6k επάγει τη συνέχιση της πρωτεϊνοσύνθεσης φωσφορυλιώνοντας – απενεργοποιώντας την κινάση eEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) η οποία παρεμποδίζει τη δράση του παράγοντα επιμήκυνσης eEF2. Η κινάση p70s6k ελέγχει τη μεταγραφή φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη CREMt, η οποία είναι μια ισομορφή της πρωτεΐνης CREB (cAMP response element binding protein) καθώς και τη βιογένεση των ριβοσωμάτων φωσφορυλιώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα UBF-1 ο οποίος οδηγεί στην μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν rRNA μέσω της RNA πολυμεράσης I. Ακόμη, επάγει και το εναλλακτικό μάτισμα αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη SKAR (S6K1 Aly/REF-like target). Τέλος, η p70s6k επάγει την επιβίωση του κυττάρου φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη Mdm2, η οποία αποτελεί μια E3 λιγάση ουβικιτίνης του παράγοντα επιβίωσης p53 καθώς και την προαποπτωτική πρωτεΐνη BAD (Showkat et al., 2014).



Εικόνα 3.9: Κύριοι στόχοι και ρόλοι της p70S6k (Τροποποίηση από: Showkat et al., 2014).

- Άλλοι στόχοι του mTORC1. Εκτός από τους παραπάνω στόχους, το mTORC1 μπορεί να ενεργοποιήσει την πρωτεϊνοσύνθεση αναστέλλοντας τη δράση της πρωτεΐνης Maf1, η οποία είναι ένας αναστολέας της RNA πολυμεράσης III. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει την Maf1 με αποτέλεσμα να επάγεται η μεταγραφή του 5S rRNA και του tRNA. Ακόμη, το mTORC1 ελέγχει τη σύνθεση των λιπιδίων επάγοντας τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP1/2 (sterol regulatory element binding protein 1/2) ο οποίος ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπιδίων. Επίσης, επάγει την παραγωγή ATP και τον μεταβολισμό του κυττάρου ενεργοποιώντας τη μεταγραφή και τη μετάφραση του παράγοντα HIF1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ) ο οποίος ενεργοποιεί πολλά γλυκολυτικά γονίδια. Τέλος, το mTORC1 αναστέλλει την αυτοφαγία, μια ομοιοστατική διαδικασία κατά την οποία συστατικά του κυτταροπλάσματος όπως κατεστραμμένα οργανίδια αποικοδομούνται στα λυσοσώματα. Το mTORC1 επιτυγχάνει την παραπάνω διαδικασία, ελέγχοντας την έκφραση της πρωτεΐνης WIPI2 (ανάλογη της Atg18), η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος και την πρωτεΐνη DAP1 (death associated protein 1), η οποία αναστέλλει την αυτοφαγία. Ωστόσο, σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών ή παρουσία ραπαμυκίνης το σύμπλοκο mTORC1 αναστέλλεται επιτρέποντας τη διαδικασία της αυτοφαγίας (Showkat et al., 2014).

### **3.3.3 Ανάδρομη ρύθμιση του άξονα Ινσουλίνη-Akt-mTOR**

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί ανάδρομης ρύθμισης στο μονοπάτι mTOR. Για παράδειγμα η p70s6k φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS1) σε αρκετά κατάλοιπα (Ser302, Ser632, Ser1097) και τον απενεργοποιεί (Meyuhas et al., 2009). Ακόμη, το σύμπλοκο mTORC1 καταστέλλει τη δράση του mTORC2 μέσω της p70s6k η οποία φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη rictor στο κατάλοιπο Thr1135 με σκοπό την απενεργοποίησή της (εικόνα 3.5). Ωστόσο, η κινάση p70s6k συμμετέχει και σε ενεργοποιητικό ανάδρομο μηχανισμό στο μονοπάτι mTOR καθώς έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για τη ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της κινάσης mTOR στο κατάλοιπο Ser2448 (Chiang et al., 2006). Επίσης, η GTPραση Rheb από τη μια ενεργοποιεί το σύμπλοκο mTORC1 και από την άλλη παρεμποδίζει το mTORC2, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την κινάση TSC2 η οποία ενεργοποιεί το σύμπλοκο mTORC2 εις βάρος του mTORC1 με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο της δράσης του συμπλόκου TSC1/2 που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3 (Showkat et al., 2014). Δηλαδή, το κύτταρο έχει αναπτύξει αρκετούς μηχανισμούς ελέγχου της σηματοδότησης Ινσουλίνη – Akt – mTOR με σκοπό την παρεμπόδιση της υπερενεργοποίησής της που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ογκογένεση.

### **3.4 Ο ρόλος του μονοπατιού Ινσουλίνη/IGF1 – Akt – mTOR στην καρκινογένεση**

Διαταραχές στην ενεργοποίηση του άξονα Ινσουλίνη/IGF1 - Akt - mTOR έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη ασθενειών όπως είναι ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος (Hill et al., 2002). Όπως προαναφέρθηκε το συγκεκριμένο μονοπάτι επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον μεταβολισμό. Αυτός είναι και ο λόγος που η απορύθμιση του οδηγεί στην ογκογένεση. Μάλιστα η ενεργοποίηση του έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη όγκων, την εξέλιξη, την επιθετικότητα και τη μετάσταση. Η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR μπορεί να οφείλεται είτε σε αναστολή της δράσης ογκοκαταστολέων είτε σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση ογκογονιδίων που βρίσκονται ανοδικά ή καθοδικά του μονοπατιού. Αυτό το γεγονός αποτελεί χαρακτηριστικό διάφορων τύπων καρκίνου, όπως του νευρικού συστήματος, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του μαστού, του ήπατος, του μελανώματος κ.α. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του IGFR και του HER2 (human epidermal growth factor

receptor 2) καθώς και μεταλλάξεις στην PI3K οδηγούν σε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού Akt – mTOR με αποτέλεσμα της αύξηση της βιοσύνθεσης των ριβοσωμάτων και της πρωτεϊνοσύνθεσης, διαδικασίες που είναι απαραίτητες για τον έντονο πολλαπλασιασμό που παρατηρείται κατά την καρκινογένεση (Vivanco et al., 2002).

Επίσης, η απορύθμιση των στόχων του mTORC1 έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης 4E-BP1 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του παράγοντα eIF4E. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετάφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων που επάγουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τον μεταβολισμό και τη μετάσταση. Ακόμη, η p70s6k έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στον καρκίνο των ωοθηκών, του πνεύμονα και του νευρικού συστήματος (Ismail Heba M.S. 2012).

Εκτός των άλλων, έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται, σε διάφορους τύπους καρκίνου, η υπομονάδα Rictor του συμπλόκου mTORC2, η οποία αυξάνει την ενεργοποίηση του συμπλόκου και μετατρέπει τα καρκινικά κύτταρα σε πιο επιθετικά και μεταναστευτικά. Επίσης, η υπερέκφραση της υπομονάδας Deptor όπως και της GTPάσης Rheb έχει συνδεθεί με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως είναι του προστάτη και των ηπατοκυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k/Akt μπορεί να συνεισφέρει στην καρκινογένεση και μέσω της επαγωγής της βιοσύνθεσης των λιπιδίων καθώς η κινάση Akt ελέγχει τη σύνθεση του λιπιδιακού μεταγραφικού παράγοντα SREBP (sterol responsive element binding protein). Τέλος, μεταλλάξεις των αναστολέων του μονοπατιού PI3k – mTOR, TSC1/2 και PTEN αποτελούν έναν ακόμη τρόπο επαγωγής της ογκογένεσης. Μάλιστα η αναστολή τους έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών συνδρόμων όπως είναι το Tuberous Sclerosis στην περίπτωση του συμπλόκου TSC1/2 και το σύνδρομο Cowden's στην περίπτωση του PTEN (Showkat et al., 2014).

### **3.5 Η αναστολή του μονοπατιού PI3k/Akt – mTOR ως στόχος αντικαρκινικών θεραπειών**

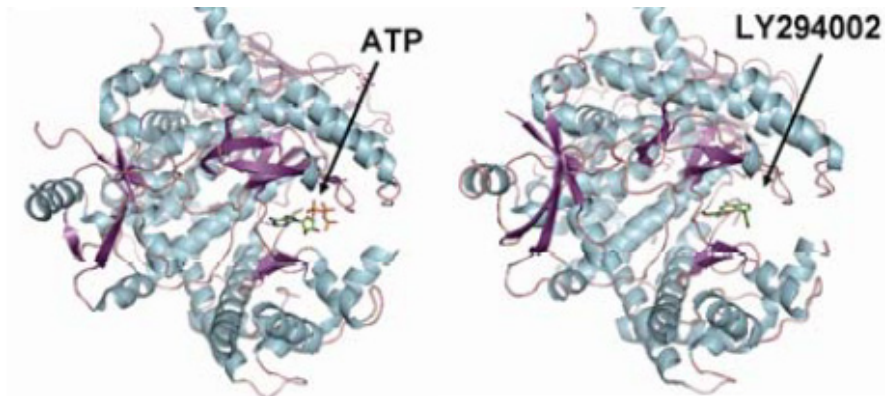
Η απορύθμιση του άξονα PI3k/Akt – mTOR στις διάφορες μορφές καρκίνου έχει καταστήσει το συγκεκριμένο μονοπάτι έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη εξειδικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών (West et al., 2002). Προς αυτή την κατεύθυνση έχει συνεισφέρει και το γεγονός ότι η θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα (όπως trastuzumab, tamoxifen, cisplatin ή doxorubicin) οδηγεί σε παράπλευρη ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης Akt σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Clark et al., 2002). Έχει παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός χημικών μορίων που αναστέλλουν τον άξονα PI3k – mTOR και έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές.

Οι πρώτης γενιάς αναστολείς της PI3k περιελάμβαναν μόρια όπως είναι οι Wortmannin και LY294002, οι οποίοι αναστέλλουν όλες τις ισομορφές της PI3k τάξης I και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε προ-κλινικές δοκιμές με σκοπό τον καλύτερο χαρακτηρισμό της δράσης του μονοπατιού PI3k στον καρκίνο (Martini et al., 2013). Ακόμη, η ραπαμυκίνη αποτέλεσε τον πρώτο αναστολέα της δράσης του μονοπατιού mTOR και επέδειξε έντονη αντικαρκινική δραστηριότητα σε προ-κλινικές δοκιμές (Khokhar et al., 2011).

#### **3.5.1 Η δράση του αναστολέα LY294002**

Ο LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4] ή LY αποτελεί ένας από τους πρώτους χημικούς αναστολείς της κινάσης PI3k που παρήχθησαν. Είναι ένα ανάλογο του φλαβονοειδούς quercetin το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως βάση για τη δημιουργία του. Η συγγένεια του LY με όλες τις τάξεις των PI3k (I, II & III) είναι 2,7 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της quercetin (Vlahos et al., 1994). Ο LY αναστέλλει αντιστρεπτά τη δράση της PI3k ως κινάση ( $IC_{50}=1,4\mu M$ ) ανταγωνίζοντας τη σύνδεση του ATP στο ενεργό της κέντρο όπως φαίνεται στην εικόνα 3.10 (Wu et al., 2012).





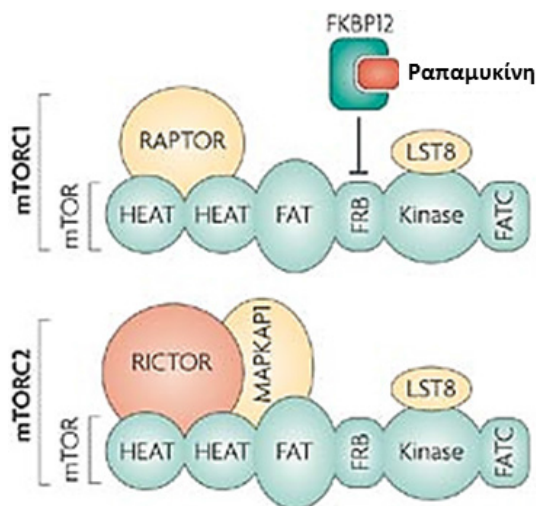
Εικόνα 3.10: Κρυσταλλική δομή της PI3k παρουσία ATP ή LY294002 (Wu et al., 2012).

Ενώ ο LY είναι εξειδικευμένος αναστολέας της PI3k σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε υψηλότερες (50μM και άνω) έχει βρεθεί ότι αναστέλλει κι άλλες ενεργότητες όπως των: PKC, PKA, MAPk, p70s6k, Gsk3, EGF receptor, Hsp90 και GAPDH (Vlahos et al., 1994, Gharbi et al., 2007). Επιπλέον, οι χαμηλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες του LY και η τοξικότητα που έχει επιφέρει σε κάποιες περιπτώσεις έχουν αποτρέψει τη χρήση του συγκεκριμένου αναστολέα ως φαρμακευτική ουσία σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Ωστόσο, η δομή και ο τρόπος σύνδεσης του LY στην PI3k αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη της δεύτερης γενιάς αναστολέων οι οποίοι έχουν βελτιωμένες φαρμακοδυναμικές ιδιότητες και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Ενδεικτικά αναφέρονται τα ακόλουθα φάρμακα τα οποία βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών: GDC-0941, BKM120, PX866, BAY 80-6946 και GDC-0032 (Martini et al., 2013).

### 3.5.2 Η δράση της ραπαμυκίνης

Η ραπαμυκίνη (sirolimus) ή RAPA ανακαλύφθηκε το 1972 από τον Suren Sehgal και τους συνεργάτες του σε δείγματα από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* στα νησιά του Πάσχα. Ονομάστηκε ραπαμυκίνη από το όνομα του νησιού στο οποίο ανακαλύφθηκε, το οποίο ονομάζεται νησί Rapa ή Rapa Nui (Vezina et al., 1975). Αν και στην αρχή θεωρήθηκε ότι είναι μια μυκητοκτόνος ουσία, η χρησιμότητά της αναθεωρήθηκε όταν ανακαλύφθηκε η ανοσοκατασταλτική της δράση (Saunders et al., 2001) και ο ρόλος της στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού εξαιτίας της ικανότητάς της να αναστέλλει το μονοπάτι mTOR (Sabatini et al., 1994).

Η RAPA αναστέλλει αλλοστερικά τη δράση του συμπλόκου mTOR χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο μηχανισμό: Συνδέεται με την πρωτεΐνη FKBP12 (FK506-binding protein 1A, 12 kDa) που διαμεσολαβεί στη σύνδεσή της στην περιοχή FRB (FKBP12–rapamycin-binding) της κινάσης mTOR (εικόνα 3.11). Έτσι, παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη raptor και τη δημιουργία του ενεργού συμπλόκου mTORC1 (Thomson et al., 2009).



**Εικόνα 3.11:** Σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους δομών των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 (Τροποποίηση από: Thomson et al., 2009).

Αντίθετα με το mTORC1, πιστευόταν μέχρι τελευταία ότι η RAPA δεν μπορεί να συνδεθεί στο σύμπλοκο mTORC2, το οποίο, όπως έχει προαναφερθεί, περιλαμβάνει την πρωτεΐνη rictor, αντί της raptor, η οποία δεν επηρεάζεται από τη RAPA και μπορεί να συνδέεται παρουσία της στην κινάση mTOR (Ma et al., 2009). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι σε κάποιες καρκινικές κυτταρικές σειρές, η μακροπρόθεσμη παρουσία RAPA αναστέλλει το σχηματισμό και του συμπλόκου mTORC2. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η διαδικασία αποκαλύφτηκε πρόσφατα. Όταν τα επίπεδα της πρωτεΐνης FKBP12 είναι υψηλά μέσα στο κύτταρο, σε σχέση με τις άλλες πρωτεΐνες FKBP, τότε η RAPA μπορεί να συνδεθεί και να αναστείλει τη δημιουργία του συμπλόκου mTORC2. Αντίθετα, δεν υπάρχει τέτοια απαίτηση για τη σύνδεση της RAPA στο σύμπλοκο mTORC1. Ακόμη, σημαντικό ρόλο στην αναστολή του mTORC2 από τη RAPA παίζουν και τα επίπεδα της

πρωτεΐνης FKBP51 καθώς όταν είναι πολύ χαμηλά αναστέλλεται έμμεσα η δημιουργία του συμπλόκου (Schreiber et al., 2015).

Η ιδιότητα της RAPA να αναστέλλει τη λειτουργία του μονοπατιού mTOR έχει οδηγήσει στη χρήση αυτού του αναστολέα για την καταπολέμηση του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως είναι το νευροβλαστωμα, το γλιοβλάστωμα, το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του παγκρέατος, του μαστού, του προστάτη, το μελάνωμα και το λέμφωμα των β-κυττάρων (Zhou et al., 2010). Η RAPA έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνου όπως είναι η Λεμφαγγειολειομυομάτωση (Lymphangiomyomatosis) και η οζώδη σκλήρυνση (tuberous sclerosis). Ωστόσο, η χαμηλή διαλυτότητα και σταθερότητά της καθώς και οι χαμηλές φαρμακοκινητικές της ιδιότητες κατέστησαν αυτό το φάρμακο μη αποτελεσματικό. Έτσι, έχουν παραχθεί διάφορες χημικές ουσίες που ονομάζονται rapalogs και έχουν ως βάση τη δομή και τη λειτουργία της RAPA. Τέτοιες ουσίες είναι οι temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, zotarolimus και deforolimus και έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνου όπως είναι καρκίνος του παγκρέατος και του νεφρού αλλά και σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία καρκίνων όπως του πνεύμονα και του νευροενδοκρινούς καρκινώματος (Li et al., 2014).

### **3.5.3 Προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση θεραπευτικών μορίων που στοχεύουν στο μονοπάτι PI3k - mTOR και τρόποι αντιμετώπισής τους**

Όπως προαναφέρθηκε, χημικές ουσίες που προσομοιάζουν στη δράση και στη δράση με τα μόρια LY και RAPA έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Ωστόσο, η συγκεκριμένη θεραπευτική στρατηγική δεν είναι αποτελεσματική καθώς οδηγεί μεν στην μείωση του όγκου αλλά όχι στην καταπολέμησή του, αφού μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας ο όγκος επανεμφανίζεται (Li et al., 2014).

Καταβάλλονται πολλές προσπάθειες για την κατανόηση αυτού του φαινομένου. Για παράδειγμα, για την μη αποτελεσματική αντιμετώπιση του όγκου έχουν ενοχοποιηθεί ανοδικοί ρυθμιστές, όπως η ινσουλίνη/IGF1, οι οποίοι ενεργοποιούν τον άξονα PI3k – mTOR και οδηγούν σε διατήρηση του πολλαπλασιασμού και παρεμπόδιση της απόπτωσης των νευροβλαστωματικών καρκινικών κυττάρων παρά την παρουσία των

αναστολέων (Opel et al., 2007). Επιπρόσθετα, η αναστολή του μονοπατιού mTOR παρεμποδίζει τους αρνητικούς ανάδρομους μηχανισμούς ελέγχου του μονοπατιού ινσουλίνη – PI3k – mTOR, όπως είναι η δράση της p70s6k στον IR και του mTORC1 στο mTORC2 (παράγραφο 3.3.3). Αυτό το γεγονός αποτελεί έναν ακόμη λόγο υπερενεργοποίησης της ινσουλίνης (και του μονοπατιού κάτωθεν) παρουσία των αναστολέων (Hartwich et al., 2013, Li et al., 2014). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η RAPA και τα rapalogs καταστέλλουν εν μέρει τους στόχους του συμπλόκου mTOR (π.χ. 4EBP1) και δεν οδηγούν σε πλήρη καταστολή του πολλαπλασιασμού (Edinger et al., 2003), ενώ η RAPA μπορεί να οδηγήσει παράπλευρα σε ενεργοποίηση αντι- αποπτωτικών μορίων όπως είναι η survivin (Samkari et al., 2012). Επιπλέον, η ενεργοποίηση άλλων κινασών AGC (π.χ. Erk) κατά την αναστολή του παραπάνω μονοπατιού αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό ενεργοποίησης του πολλαπλασιασμού (Mendoza et al., 2011).

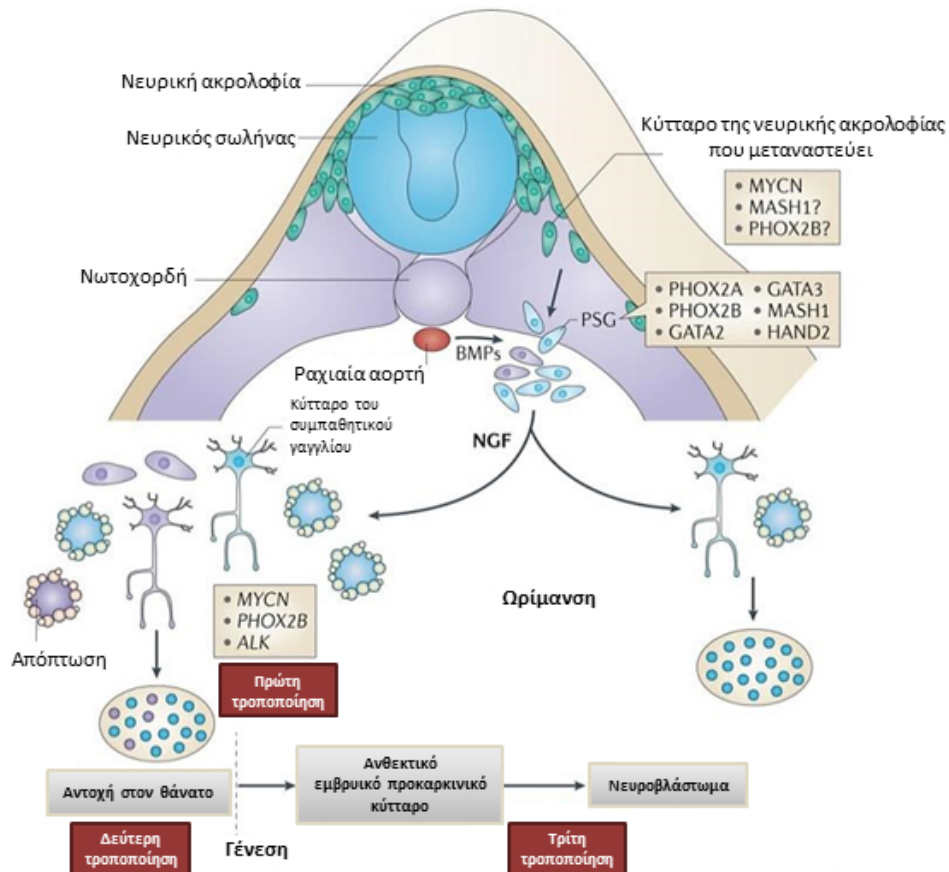
Ένα αινιγματικό χαρακτηριστικό της χρήσης αντικαρκινικών φαρμάκων για την αναστολή του μονοπατιού Akt είναι ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας με G0 - προσομοιάζοντα κύτταρα τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν στον πληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (cancer stem cells). Αυτά τα κύτταρα είναι ανθεκτικά στη θεραπεία, δεν πολλαπλασιάζονται παρουσία του αναστολέα αλλά διατηρούν τη βλαστικές τους ιδιότητες. Έτσι, πολλαπλασιάζονται με πιο επιθετικό τρόπο μετά την παύση της θεραπείας δημιουργώντας κύτταρα με νέες ιδιότητες οι οποίες ακόμα δεν έχουν μελετηθεί πλήρως (Dey-Guha et al., 2011, Mahller et al., 2009). (Ornelas et al., 2013).

Λόγω των μειονεκτημάτων της μονοθεραπείας έχουν ξεκινήσει να πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές συνδυαστικής θεραπείας σε πολλούς τύπους καρκίνου με τη χρήση ουσιών που αναστέλλουν σχετικά ψηλά στο μονοπάτι Ινσουλίνη – PI3k – mTOR και με μόρια που αναστέλλουν τόσο τη δράση του συμπλόκου mTORC1 όσο και του mTORC2. Τέτοιες χημικές ουσίες είναι οι XL-765, PI-103, NVPBEZ235, PKI-587, PF-04691502, WJD008, PKI-402 και GNE-477 (Martelli et al., 2012).

### **3.6 Το Νευροβλάστωμα**

Το Νευροβλάστωμα είναι μια σχετικά σπάνια μορφή καρκίνου του συμπαθητικού νευρικού συστήματος που εμφανίζεται συνήθως στη προνηπιακή και νηπιακή ηλικία και αποτελεί περίπου το 7% έως 10% των παιδικών κακοηθειών (Brodeur GM 2003).

Η απαρχή του νευροβλαστώματος εντοπίζεται κατά την εμβρυογένεση στο στάδιο των νευροβλαστών τα οποία είναι πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Η νευρική ακρολοφία (neural crest) δημιουργείται στα πρώτα στάδια του εμβρύου και δίνει γένεση σε διάφορους ιστούς όπως είναι οι περιφερικοί και εντερικοί νευρώνες (Huang et al., 2004). Οι νευροβλάστες της νευρικής ακρολοφίας ύστερα από την επίδραση του γονιδίου MYCN καθώς και των BMPs (bone morphogenetic proteins) μεταναστεύουν γύρω από τον νευρικό σωλήνα στην περιοχή πλευρικά της νωτοχορδής και της ραχιαίας αορτής (εικόνα 3.12). Σε αυτή την περιοχή τα πρόδρομα κύτταρα θα δώσουν γένεση στα κύτταρα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος όπως είναι ο μυελός των επινεφριδίων και τα συμπαθητικά γάγγλια. Μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν σε αυτά τα κύτταρα αλλά και στα πρόδρομα συμπαθητικά κύτταρα και πιθανότατα να σχετίζονται με υπερέκφραση του ογκογονιδίου MYCN αλλά και των άλλων ρυθμιστών της νευρογένεσης οδηγούν στην εμφάνιση του νευροβλαστώματος (Marshall et al., 2014).



Εικόνα 3.12: Απεικόνιση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και της σχέσης τους με το νευροβλάστωμα (Τροποποίηση από: Marshal et al., 2014).

### 3.6.1 Στάδια εξέλιξης του νευροβλαστώματος

Το νευροβλάστωμα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την κλινική του εικόνα σε τέσσερα στάδια (Brodeur et al., 1993). Η υπερέκφραση ή όχι του ογκογονιδίου MYCN αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό για την κατηγοριοποίησή του (Brodeur et al., 1984).

➤ **Στάδιο 1:** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι όγκοι που βρίσκονται σε πρωταρχικό στάδιο και δεν έχουν μεταναστεύσει σε άλλες περιοχές.

➤ **Στάδιο 2:** Ανήκουν οι όγκοι οι οποίοι έχουν εξαπλωθεί πέρα από το σημείο εμφάνισής τους αλλά δεν έχουν εισέλθει στους τοπικούς λεμφαδένες (και δεν έχουν περάσει την ενδιάμεση γραμμή του σώματος – midline). Οι όγκοι που βρίσκονται στο στάδιο 1 και 2 δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη αύξηση της έκφρασης του ογκογονιδίου MYCN.

- **Στάδιο 3:** Οι όγκοι του συγκεκριμένου σταδίου έχουν εισέλθει στους λεμφαδένες και έχουν μεταναστεύσει σε γειτονικές περιοχές.
- **Στάδιο 4:** Στο τελευταίο στάδιο τα καρκινικά κύτταρα έχουν εισέλθει σε απομακρυσμένους λεμφαδένες και έχουν μεταναστεύσει σε απομακρυσμένους ιστούς όπως τα οστά, το συκώτι και ο μυελός των οστών. Τα νευροβλαστώματα τύπου 3 και 4 χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του ογκογονιδίου MYCN, μεγάλη επιθετικότητα και μικρό προσδόκιμο ζωής.
- **Στάδιο 4S:** Αποτελεί μια ειδική κατηγορία νευροβλαστώματος που έχει διαγνωστεί σε παιδιά κάτω του ενός έτους και παρ' όλο που ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί και σε άλλα μέρη του σώματος (όπως συκώτι, δέρμα, μυελός των οστών) είναι ιάσιμος και μάλιστα υποχωρεί από μόνος του (Brodeur et al., 1993).

### **3.6.2 Θεραπεία του νευροβλαστώματος**

Ανάλογα με το στάδιο του νευροβλαστώματος χρησιμοποιούνται διαφορετικές θεραπευτικές στρατηγικές. Για τους καρκίνους των σταδίων 1 και 2 που χαρακτηρίζονται ως χαμηλού ρίσκου (low-risk) χρησιμοποιείται η χειρουργική προσέγγιση. Αντίθετα, για τα νευροβλαστώματα τύπου 3 και 4 ή αλλιώς υψηλού ρίσκου (high-risk) καρκινώματα καταπολεμούνται με χημειοθεραπεία, ακτινοβολία, χειρουργική επέμβαση καθώς και μεταμόσχευση μυελού των οστών και αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (National Cancer Institute 2008). Οι χημειοθεραπευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι οι cisplatin, carboplatin, etoposide (αναστολέας της τοποισομεράσης II) και doxorubicin (αντιβιοτικό με βάση την ανθρακυκλίνη).

Ωστόσο, η θεραπεία που ακολουθούνται μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί, σε αρκετές περιπτώσεις νευροβλαστώματος, ανεπαρκείς καθώς παρατηρείται υποτροπίαση του ασθενούς μετά την παύση της θεραπείας. Αυτό συμβαίνει κυρίως σε μεταστατικούς τύπους καρκίνου. Γι' αυτό το σκοπό βρίσκονται πλέον υπό κλινικές δοκιμές συνδυαστικές θεραπείες όπου, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες χημικές ουσίες που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια μαζί με αγγειογενετικούς παράγοντες ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

### 3.6.3 Στόχευση του μονοπατιού PI3k – mTOR για τη θεραπεία του νευροβλαστώματος

Τα τελευταία χρόνια καταβάλλονται προσπάθειες να κατανοηθούν καλύτερα οι λόγοι για τους οποίους εμφανίζεται το νευροβλάστωμα, πώς γίνεται πιο επιθετικό και γιατί τα καρκινικά κύτταρα ανακάμπτουν μετά τη θεραπεία. Όπως έχει προαναφερθεί, το μονοπάτι PI3k – mTOR είναι απορυθμισμένο στις διάφορες μορφές καρκίνου, όπως και στο νευροβλάστωμα και αυτή η απορύθμιση συμβάλλει στη δημιουργία και την εξέλιξη του καρκίνου (παράγραφος 3.4). Επίσης, έχει βρεθεί πως η υπερενεργοποίηση των κινασών Akt και mTOR σε διάφορες νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές είναι ένας από τους λόγους που τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία καθώς η συγκεκριμένη κινάση φαίνεται ότι, εκτός των άλλων, διαμεσολαβεί στην υπερενεργοποίηση του ογκογονιδίου MYCN (Opel et al., 2007, Johnsen et al., 2008). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των νευροβλαστωματικών κυττάρων είναι η υπερέκφραση των υπομονάδων p110δ και p85α της PI3k σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα των επινεφριδίων (Boller et al., 2008) και η μη φυσιολογική έκφραση των υποδοχέων των αναπτυξιακών παραγόντων όπως είναι ο IGF-1R, που οδηγεί σε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k – mTOR (Singleton et al., 1996).

Στα πλαίσια αυτά έχουν δοκιμαστεί διάφορες θεραπείες που στοχεύουν στο παραπάνω μονοπάτι για την καταπολέμηση του νευροβλαστώματος. Για παράδειγμα η RAPA και τα rapalogs καθώς και χημικοί αναστολείς όπως το LY, ο PI103 και ο NVP-BEZ235 που περιγράφηκαν παραπάνω έχουν δείξει αντικαρκινική συμπεριφορά και μερικοί από αυτούς έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές κατά του νευροβλαστώματος (Mei et al., 2013). Μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία που βρίσκεται στο στάδιο κλινικών δοκιμών είναι ο συνδυασμός αναστολέων της PI3k με χημειοθεραπευτικές ουσίες όπως είναι η Doxorubicin, Etoposide, Topotecan, Cisplatin, Vincristine και Taxol καθώς έχει βρεθεί ότι επάγουν την απόπτωση στα νευροβλαστωματικά κύτταρα (Bender et al., 2011). Επιπροσθέτως, ο συνδυασμός του αναστολέα της κινάσης Akt, MK-2206, μαζί με RAPA ή etoposide σε μοντέλα ποντικών μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και αυξάνει την επιβίωση τους (Li et al., 2012). Το ίδιο αποτέλεσμα έχει βρεθεί ότι επιφέρει η χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον του IGF-1R όπως είναι το SCH717454 το οποίο μειώνει το μέγεθος του όγκου και αυξάνει την



επιβίωση ποντικών στα οποία έχει μεταμοσχευτεί όγκος νευροβλαστώματος (xenografts) (Fulda 2009).

### **3.7 Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων**

Ο κυτταρικός κύκλος ή ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης αποτελεί μια ακολουθία γεγονότων κατά την οποία ένα ευκαρυωτικό κύτταρο διπλασιάζεται και χωρίζεται σε δυο θυγατρικά κύτταρα. Καθένα από τα κύτταρα περιέχει την απαραίτητη πληροφορία και τον μηχανισμό για να επαναλάβει την παραπάνω διαδικασία.

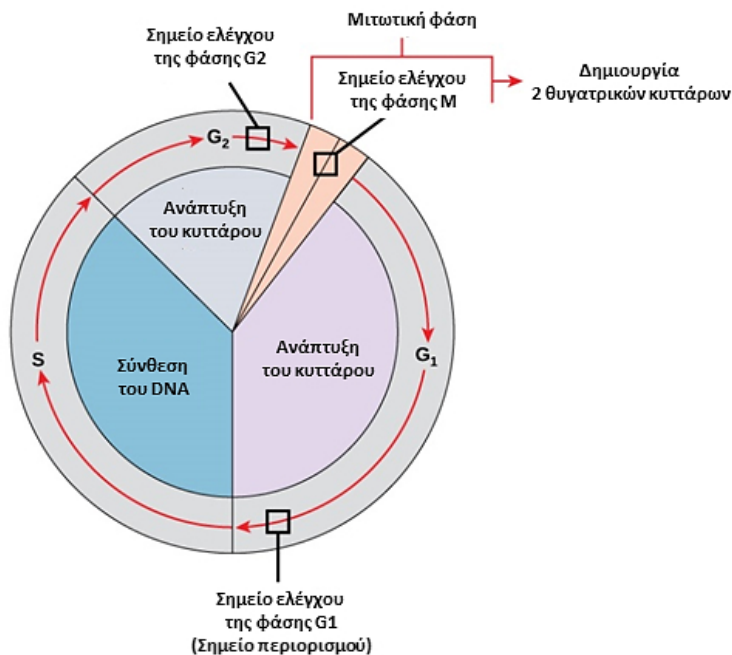
#### **3.7.1 Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου**

Ο κυτταρικός κύκλος διαιρείται σε δυο περιόδους: τη μεσόφαση και τη μίτωση. Η **μεσόφαση** απαρτίζεται από τις ακόλουθες φάσεις (εικόνα 3.13):

- **Φάση G1 (ή πρώτη φάση αύξησης):** Στη διάρκεια αυτής της φάσης το κύτταρο υπόκειται σε μεταβολικές διαδικασίες που το προετοιμάζουν για την είσοδο του στην επόμενη φάση, εκείνη της αντιγραφής του DNA. Κατά τη φάση G1 το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος (κυτταρόπλασμα, αριθμός οργανιδίων), συνθέτει RNA και πρωτεΐνες. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ενός διπλοειδούς κυττάρου στη φάση G1 είναι 2N, δηλαδή δυο αντίγραφα από κάθε χρωμόσωμα.
- **Φάση S (ή συνθετική φάση):** Το κύτταρο αντιγράφει το DNA των χρωμοσωμάτων του προκειμένου να είναι σε θέση να δημιουργήσει δυο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων έχει πλέον διπλασιαστεί και είναι 4N.
- **Φάση G2 (ή δεύτερη φάση αύξησης):** Σε αυτό το στάδιο το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνεται, να συνθέτει πρωτεΐνες και να μεταβολίζει, δημιουργώντας όλα τα απαραίτητα κυτταροπλασματικά αποθέματα που χρειάζονται για τη μίτωση (Κωλέττας, 2008).

Ακολουθεί η φάση της **μίτωσης (ή μείωση για τα γαμετικά κύτταρα) ή φάση M** όπου σταματά η αύξηση του κυττάρου και η σύνθεση RNA και πρωτεϊνών ώστε η ενέργειά του να διοχετευτεί στην πολύπλοκη διαδικασία της διαίρεσης σε δυο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Το κύτταρο διαχωρίζει τα χρωμοσώματα του έτσι ώστε καθένα από

τα δυο θυγατρικά κύτταρα να διαθέτει πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου και να έχει 2N αριθμό χρωμοσωμάτων.



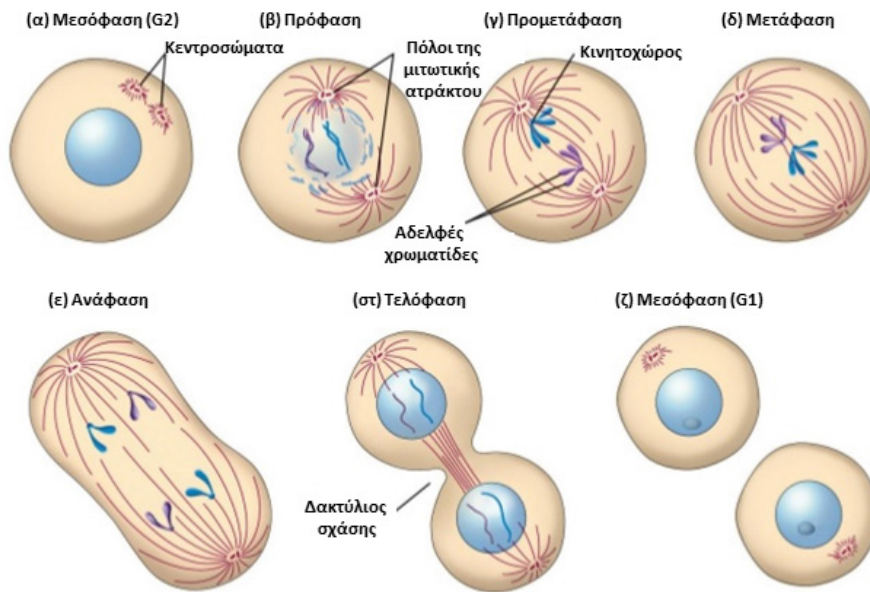
Εικόνα 3.13: Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και των σημείων ελέγχου του (Τροποποίηση από: Regulation of the Cell Cycle at Internal Checkpoints [www.boundless.com](http://www.boundless.com)).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.14, η μίτωση αποτελείται από πέντε στάδια: **πρόφαση**, **προμετάφαση** και **μετάφαση**, **ανάφαση**, **τελόφαση** και **κυτταροκίνηση** (Κωλέττας, 2008).

- **Πρόφαση:** Σε αυτό το στάδιο τα χρωμοσώματα που έχουν αντιγραφεί συμπυκνώνονται. Αρχίζει να σχηματίζεται η μιτωτική άτρακτος και γίνονται εμφανείς δυο βασικές περιοχές, μια σε κάθε πλευρά του πυρήνα που ονομάζονται κεντροσώματα και το καθένα αποτελείται από ένα ζεύγος κεντριολίων. Τα κεντροσώματα μετακινούνται στα αντίθετα άκρα του κυττάρου και αποτελούν το σημείο έναρξης του σχηματισμού ινών από μικροσωληνίσκους.
- **Προμετάφαση:** Αποτελεί την αρχή της μετάφασης όπου το πυρηνικό περίβλημα αποικοδομείται λόγω φωσφορυλίωσης των λαμινών που σταθεροποιούν την εσωτερική μεμβράνη του. Οι μικροσωληνίσκοι αρχίζουν να μετακινούνται προς τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων και τα κεντροσώματα κατευθύνονται προς

τους αντίθετους πόλους της ατράκτου. Τα χρωμοσώματα μετακινούνται προς το κέντρο της ατράκτου.

- **Μετάφαση:** Σε αυτό το σημείο τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται στην ισημερινή πλάκα στο μέσο του πυρήνα. Συγκρατούνται εκεί με τους μικροσωληνίσκους οι οποίοι προσκολλώνται στη μιτωτική άτρακτο και στα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων.
- **Ανάφαση:** Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης τα κεντρομερίδια διαιρούνται και οι αδελφές χρωματίδες αρχίζουν να διαχωρίζονται στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων και να μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου.
- **Τελόφαση:** Τα θυγατρικά χρωμοσώματα βρίσκονται πλέον στους αντίθετους πόλους της ατράκτου και οι μικροσωληνίσκοι αποικοδομούνται. Η χρωματίνη αποσυμπυκνώνεται, τα χρωμοσώματα διασκορπίζονται και το πυρηνικό περίβλημα επανασυντίθεται.
- **Κυτταροκίνηση:** Είναι το στάδιο όπου το κυτταρόπλασμα διαιρείται και η κυτταρική μεμβράνη συστέλλεται προς τα μέσα σχηματίζοντας δυο θυγατρικά κύτταρα. Ενώ η μίτωση αναφέρεται στη διαδικασία της διαίρεσης των χρωμοσωμάτων, η κυτταροκίνηση αναφέρεται στη διαδικασία διαίρεσης του κυτταροπλάσματος. Στα περισσότερα κύτταρα η κυτταροκίνηση διεξάγεται στα τελευταία στάδια της μίτωσης. Μόλις ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των θυγατρικών κυττάρων επανασυνθέτονται οι πυρηνικές μεμβράνες, εμφανίζονται οι πυρηνίσκοι και ξετυλίγονται τα χρωμοσώματα.



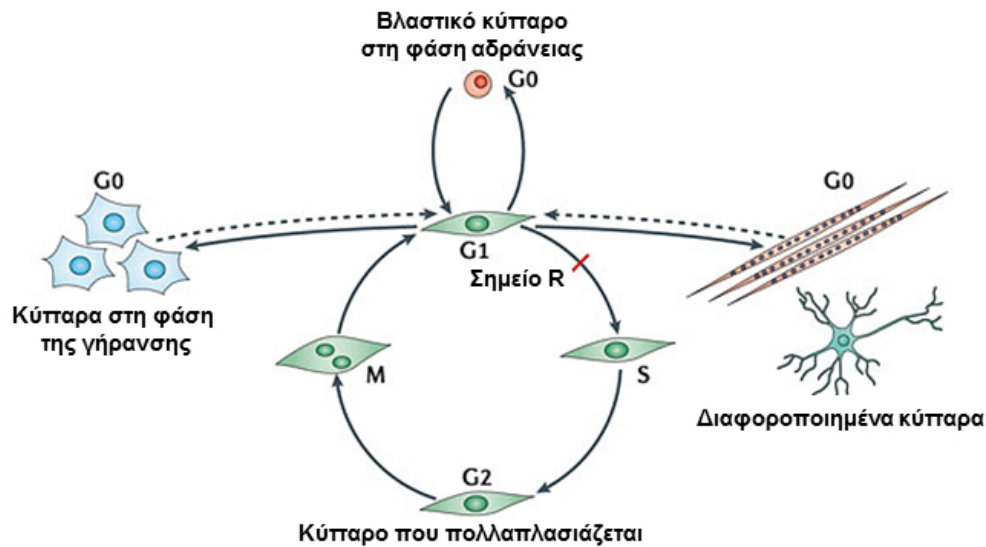
Εικόνα 3.14: Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε όλες τις φάσεις της μίτωσης (Τροποποίηση από: Paul's Biology Page).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο κυτταρικός κύκλος κυττάρων θηλαστικών που βρίσκονται σε καλλιέργεια διαρκεί περίπου 24 ώρες και η διάρκεια των επιμέρους φάσεων ορίζεται ως εξής: φάση G1  $\approx$  10 ώρες, φάση S  $\approx$  9 ώρες, φάση G2  $\approx$  4 ώρες και φάση M  $\approx$  1 ώρα (Κωλέττας, 2008).

### 3.7.2 Η φάση G0

Η φάση G0 αποτελεί μια κατάσταση ηρεμίας όπου το κύτταρο δεν διαιρείται. Πολλές φορές ένα κύτταρο σταματά να διαιρείται και εξέρχεται προσωρινά ή μόνιμα από τον κυτταρικό κύκλο όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του. Η φάση G0 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως η κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα έχουν εξέλθει μη αντιστρεπτά από τον κυτταρικό κύκλο όπως είναι τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (differentiated cells), π.χ. νευρώνες και καρδιομυοκύτταρα καθώς και κύτταρα στο στάδιο της γήρανσης (senescent cells). Τα συγκεκριμένα κύτταρα αδυνατούν να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο παρά μόνο υπο ειδικές συνθήκες όπως είναι η αναστολή των ογκοκαταστολέων p53 και Rb. Ωστόσο, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το 1951 και μετά οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας τρίτης κατηγορίας κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 και ονομάζονται quiescent

κύτταρα ή κύτταρα της φάσης αδράνειας (εικόνα 3.15). Τα κύτταρα της συγκεκριμένης φάσης χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να εισέρχονται ξανά στον κυτταρικό κύκλο όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν ευνοϊκές (Cheung et al., 2013).



Εικόνα 3.15: Οι κατηγορίες της φάσης G0 και η σχέση τους με τον κυτταρικό κύκλο (Τροποποίηση από: Cheung et al., 2013).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις της βιβλιογραφίας, η φάση G0 υποδηλώνει την πιο συνηθισμένη κατηγορία που είναι η κατάσταση αδράνειας ή quiescence. Πολλοί μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί όπως είναι οι ζυμομύκητες περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους στη φάση G0. Κύτταρα προκαρυωτικών αλλά και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών τα οποία βρίσκονται στην κατάσταση αδράνειας μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα – πολλές φορές και χρόνια – χωρίς θρεπτικά συστατικά (Gray et al., 2004).

Τα βλαστικά κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 και εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, π.χ. παρουσία αυξητικών παραγόντων. Τέτοιου είδους κύτταρα εντοπίζονται σε ιστούς όπως το έντερο, το συκώτι, οι μύες, το δέρμα και το νευρικό σύστημα. Τα κύτταρα της φάσης G0 χαρακτηρίζονται από πολύ αργό μεταβολικό ρυθμό, πολύ μικρή ποσότητα RNA και από την απουσία έκφρασης πρωτεϊνών - δεικτών του πολλαπλασιασμού, όπως είναι το Ki67, το BrdU και το PCNA. Ακόμη, η αύξηση της

έκφρασης των ογκοκαταστολέων p53 και Rb καθώς και των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21, p27 και p57 αποτελούν δείκτες της φάσης αδράνειας. Επίσης, η συγκεκριμένη φάση χαρακτηρίζεται από πολλά γονίδια τα οποία παρουσιάζουν επιγενετικές αλλαγές όπως είναι η τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στο κατάλοιπο Λυσίνη 4 (H3K4me3) και στη Λυσίνη 27 (H3 K27me3). Χρωματινικές περιοχές που περιέχουν τις συγκεκριμένες τροποποιήσεις βρίσκονται κοντά σε σημεία έναρξης της μεταγραφής, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία αυτών των μεθυλιώσεων για την μεταγραφή. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι στη φάση G0 η μεταγραφική δραστηριότητα είναι σχεδόν ανύπαρκτη, η παρουσία αυτών των τροποποιήσεων υποδηλώνει την ύπαρξη γονιδίων έτοιμων να μεταγραφούν όταν τα κύτταρα εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Τέλος, έχει βρεθεί ότι μικρά μόρια RNA, τα miRNA, παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο των κυττάρων στη φάση G0 καθώς σηματοδοτούν για την καταστολή διαφόρων μονοπατιών που επάγουν τον πολλαπλασιασμό όπως είναι η σηματοδότηση PI3k – Akt (Cheung et al., 2013).

### **3.7.3 Οι πρωτεΐνες - ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου**

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τη ρυθμιζόμενη έκφραση συγκεκριμένων κατηγοριών πρωτεϊνών όπως είναι οι κυκλίνες, οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου και σύμπλοκα προαγωγής των επιμέρους φάσεων.

**Φάση G1:** Η έναρξη του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 επάγεται από την αλληλεπίδραση των κυκλινών τύπου D (D1, D2 και D3) με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6. Οι κυκλίνες D συνδέονται στις παραπάνω κινάσες και οδηγούν στην ενεργοποίησή τους επάγοντας τη φωσφορυλίωση των CDKs από τη CDK-ενεργοποιούσα κινάση (CDK-Activating Kinase), CAK. Οι ενεργοποιημένες CDK4/6 μεταφέρονται ως σύμπλοκο με τις κυκλίνες D στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, Rb, στα κατάλοιπα Ser807/8110, η οποία είναι ένας αναστολέας του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb (pRb), η οποία συμβαίνει και από τα σύμπλοκα κυκλινών E-CDK2, προάγει την πρόοδο του κύκλου καθώς απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες E2Fs (1-6) οι οποίοι ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται και ρυθμίζουν τα επόμενα

στάδια του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι οι κυκλίνες E και A, η CDK1, το PCNA και η φωσφατάση cdc25A (Giacinti et al., 2006). Ο σχηματισμός του συμπλόκου κυκλίνης D – CDK4/6 επάγεται από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs), p21<sup>Cip1/Waf1</sup> και p27<sup>Kip1</sup> και μπορεί να ανασταλεί από άλλους CKIs όπως είναι οι p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> και p19<sup>INK4D</sup> (Κωλέττας, 2008).

**Μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S:** Η μετάβαση από τη φάση G1 στην S ελέγχεται από τα σύμπλοκα των κυκλινών E (E1 και E2) με την κινάση CDK2. Μετά το σχηματισμό τους τα σύμπλοκα μεταφέρονται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν τους αναστολείς p21<sup>Cip1/Waf1</sup> στο κατάλοιπο ser130 και p27<sup>Kip1</sup> στο κατάλοιπο Thr187, μια διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη για την αποδόμησή των αναστολέων από το πρωτεόσωμα και τη συνέχιση του κύκλου. Φαίνεται δηλαδή ότι οι συγκεκριμένοι CKIs λειτουργούν είτε ως θετικοί είτε ως αρνητικοί ρυθμιστές του κύκλου. Είναι ενεργοί κατά τη φάση G1, παρεμποδίζοντας την πρόωρη είσοδο στη φάση S, όμως πρέπει να αποικοδομηθούν στη συνέχεια για να συνεχιστεί ο κύκλος. Η υψηλή ενεργότητα του συμπλόκου της κυκλίνης E – CDK2 ενεργοποιεί εκτός των άλλων τη θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA, με τη δέσμευση στη θέση αυτή του συμπλόκου προ-αντιγραφής του DNA, Pre-Rc. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο περιλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες όπως είναι το σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής του DNA, *orc* και οι παράγοντες αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, CDC6 και Cdt1 (Κωλέττας, 2008).

**Φάση S:** Αφού πραγματοποιηθεί η μετάβαση στη φάση S η κυκλίνη E ουβικιτινιώνεται και αποικοδομείται και αυξάνονται τα επίπεδα των μιτωτικών κυκλινών A και B. Η κυκλίνη A (A1 και A2) συντίθεται κατά τη φάση G1, αλληλεπιδρά με τη CDK2 στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα. Πριν την είσοδο στη φάση S το σύμπλοκο κυκλίνης A – CDK2 είναι ανενεργό καθώς η CDK2 είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Tyr15 από τους αναστολείς p21 και p27. Η είσοδος στη φάση S προάγεται από την αποφωσφορυλίωση της CDK2 από τη φωσφατάση Cdc25A καθώς και από την αποικοδόμηση των αναστολέων p27 και p21 που διαμεσολαβείται από τα σύμπλοκα κυκλίνης E/A – CDK2. Η ενεργοποιημένη CDK2, ύστερα από τη δημιουργία συμπλόκου με την κυκλίνη A, φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA, όπως είναι η ORC1. Η ORC1 είναι ένας αναστολέας της αντιγραφής η οποία μέσω της φωσφορυλίωσης απομακρύνεται από την χρωματίνη,

ουβικιτινιώνεται και αποικοδομείται. Ακόμη, η κινάση CDK2 επάγει την αντιγραφή του DNA φωσφορυλιώνοντας την ανασταλτική πρωτεΐνη Cdc6 η οποία οδηγείται με αυτό τον τρόπο για αποδόμηση στα πρωτεοσώματα (Κωλέττας, 2008).

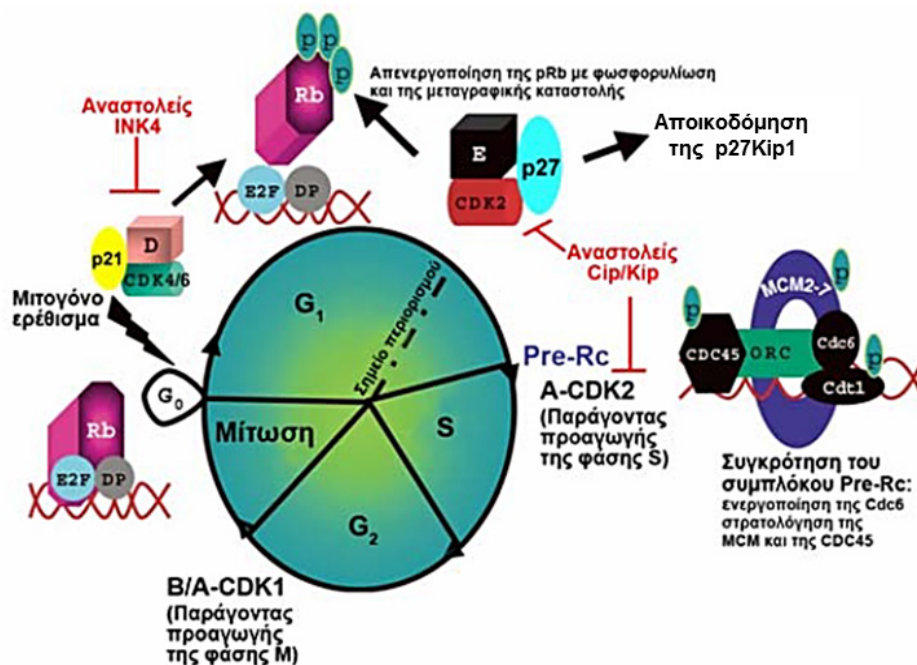
**Φάση G2:** Το σύμπλοκο κυκλίνη A – CDK2 είναι απαραίτητο, εκτός από τη φάση S και για την είσοδο των κυττάρων στη φάση G2. Απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο των κυττάρων στη συγκεκριμένη φάση είναι η φωσφορυλίωση – απενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων E2F1/E2F3 από το σύμπλοκο κυκλίνη A – CDK2.

**Μετάβαση από τη φάση G2 στην M:** Η κυκλίνη A σχηματίζει σύμπλοκο εκτός από τη CDK2 και με την κινάση CDK1, μια αλληλεπίδραση που πραγματοποιείται στο τέλος της φάσης G2 και είναι απαραίτητη για τη μετάβαση των κυττάρων στη φάση της μίτωσης. Εκτός από το σύμπλοκο κυκλίνη A - CDK1, η είσοδος των κυττάρων στη φάση M επάγεται και από τη δημιουργία του συμπλόκου της κυκλίνης B (B1 και B2) με την CDK1. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες της μίτωσης. Επίσης, η δραστηριότητα της κινάσης Polo (Plk1) είναι απαραίτητη για την είσοδο στη φάση M. Η Plk1 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες Aurora A και Bora, των οποίων η μέγιστη έκφραση παρατηρείται στο τέλος της φάσης G2 (Seki et al., 2008). Η Plk1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφατάση Cdc25C που με τη σειρά της αποφωσφορυλιώνει την κινάση Wee1A με αποτέλεσμα να αποικοδομείται. Η Plk1 φωσφορυλιώνει ακόμη την κινάση Myt1. Αποτέλεσμα αυτών των φωσφορυλίωσεων από την Plk1 είναι η διατήρηση και επαύξηση της ενεργότητας των συμπλόκων των κυκλινών A/B – CDK1 καθώς οι κινάσες Wee1 και Myt1 αναστέλλουν τη δράση της CDK1.

**Φάση M:** Για τη μετάβαση στη φάση M λειτουργεί πρώτα το σύμπλοκο κυκλίνη A – CDK1 το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα πριν από το σύμπλοκο κυκλίνη B – CDK1 και ενεργοποιεί μόρια απαραίτητα για τα αρχικά στάδια της πρόφασης. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο κυκλίνη B – CDK1 εισέρχεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με μιτωτικές δομές. Ακόμη, το συγκεκριμένο σύμπλοκο προάγει τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων καθώς και την αποδόμηση της συσκευής Golgi και του πυρηνικού περιβλήματος. Εκτός, από τα παραπάνω μόρια, απαραίτητος για την μίτωση είναι ο παράγοντας προαγωγής της φάσης M (MPF) που συγκροτείται στο τέλος της φάσης G2. Ο MPF είναι υπεύθυνος για την έναρξη της συγκρότησης της



μιτωτικής ατράκτου, την αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου και τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Η συμπύκνωση της χρωματίνης απαιτεί την παρουσία ATP και τη δράση του πρωτεϊνικού συμπλόκου των συμπυκτωτίνων (codensins). Όπως έχει προαναφερθεί (παράγραφος 3.7.1), με τις παραπάνω μεταβολές το κύτταρο οδηγείται στη μετάφαση όπου ο MPF ενεργοποιεί το σύμπλεγμα προαγωγής της ανάφασης APC/C. Το APC/C επιτρέπει το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στην ισημερινή πλάκα και τη μετακίνηση του στους πόλους της ατράκτου κατά την ανάφαση. Αυτό επιτυγχάνεται από την απενεργοποίηση της δράσης της σεκουρίνης (securin) η οποία αναστέλλει την πρωτεάση σεπαράση (separase). Η δράση της σεπαράσης είναι η πρωτεόλυση της υπομονάδας των συνεκτινών (cohesins), Scc1, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συγκράτηση των αδελφών χρωματίδων. Επίσης, το APC/C συμβάλλει στην αποδόμηση της κυκλίνης B από το πρωτεόσωμα και στη σύνθεση των κυκλινών G1 με σκοπό τα κύτταρα να είναι έτοιμα να ξεκινήσουν από την αρχή τον κυτταρικό κύκλο (Κωλέττας, 2008). Τα βασικά μόρια και οι αλληλεπιδράσεις που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου συνοψίζονται στην εικόνα 3.16.



Εικόνα 3.16: Σχηματική απεικόνιση των βασικών ρυθμιστών της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Τροποποίηση από: Κωλέττας, 2008).

### 3.7.4 Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Η διατήρηση της ακεραιότητας και της πιστότητας του γονιδιώματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Ωστόσο, λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA, η αστάθεια του ίδιου του DNA καθώς και η επίδραση εξωγενών παραγόντων στο DNA απειλούν τη διατήρηση των παραπάνω χαρακτηριστικών του γονιδιώματος. Στα πλαίσια αυτά, όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ο οποίος επιτρέπει την παύση του κύκλου σε συγκεκριμένα σημεία (cell cycle checkpoints) με σκοπό την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA και την αποφυγή της μεταφοράς τους στα θυγατρικά κύτταρα. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αντιλαμβάνονται τυχόν προβλήματα που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του DNA ή τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και επάγουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη. Εάν η βλάβη είναι μη διορθώσιμη τότε επάγεται η κυτταρική απόπτωση. Οι πρωτεΐνες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου λειτουργούν ρυθμίζοντας την έκφραση των κυκλινών και τη σύνδεσή τους με τις CDKs (Malumbres et al., 2009). Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι τρία: στη φάση G1 πριν τη μετάβαση στην S, πριν το τέλος της φάσης G2 και στη μίτωση στο στάδιο της μετάφασης (εικόνα 3.13).

**Σημείο ελέγχου της φάσης G1 (G1 restriction point):** Αποτελεί το σημείο όπου το κύτταρο αποφασίζει (ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες) εάν θα σταματήσει στη φάση G1 ή θα εισέλθει στη φάση G0 ή θα προχωρήσει στη φάση S. Για να προχωρήσει ο κύκλος στη φάση S θα πρέπει να ενεργοποιηθούν τα σύμπλοκα των κυκλινών – CDKs όπως συζητήθηκαν στην παράγραφο 3.7.3. Ωστόσο, ερεθίσματα όπως τα χαμηλά επίπεδα ενέργειας ή μέγεθος του κυττάρου μικρότερο από το φυσιολογικό ή ακόμη η παρουσία βλάβης στο DNA οδηγούν σε παύση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου της φάσης G1. Αυτή η διαδικασία διαμεσολαβείται από τη γρήγορη ενεργοποίηση των κινασών ATM (Ataxia telangiectasia mutated) και ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) οι οποίες αντιλαμβάνονται τη βλάβη και φωσφορυλιώνουν – ενεργοποιούν τις κινάσες Chk2 and Chk1 αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες κινάσες φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους τη φωσφατάση Cdc25A με σκοπό την ουβικιτινίωση και την αποδόμησή της. Όπως έχει προαναφερθεί (παράγραφος 3.7.3) η Cdc25A όταν είναι ενεργή απομακρύνει

τις ανασταλτικές φωσφορικές ομάδες από την κινάση CDK2 και επάγει τη λειτουργία του συμπλόκου της κυκλίνης E – CDK2. Απουσία της Cdc25A, το σύμπλοκο κυκλίνης E – CDK2 παραμένει ανενεργό και το κύτταρο παραμένει στη φάση G1. Εκτός από την Cdc25A, οι κινάσες Chk1 και Chk2 φωσφορυλιώνουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Έτσι, η πρωτεΐνη σταθεροποιείται καθώς αποτρέπεται η σύνδεση της με τη λιγάση ουβικιτίνης, Mdm2, η οποία οδηγεί την πρωτεΐνη p53 για αποικοδόμηση. Η σταθεροποιημένη πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων όπως τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p21 που εμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου κυκλίνης E – CDK2. Η πρωτεΐνη p21 ενεργοποιείται και από τον αναστολέα p16 όταν υπάρχει βλάβη στο DNA. Ο αναστολέας p16 αποδεσμεύει το σύμπλοκο κυκλίνης D – CDK4 οδηγώντας σε απελευθέρωση του p21, γεγονός το οποίο είναι απαραίτητο για την αποφωσφορλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rb. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Rb συνδέεται με αυτόν τον τρόπο στους E2F1-3 και αναστέλλει τη δράση τους παρεμποδίζοντας το κύτταρο να μεταβεί στη φάση S (Bertoli et al., 2014).

**Σημείο ελέγχου της φάσης G2 (DNA damage checkpoint):** Μετά τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S, την αντιγραφή του DNA και τη συνέχιση του κύκλου στη φάση G2, το κύτταρο διέρχεται από το σημείο ελέγχου της φάσης G2 το οποίο επιβεβαιώνει ότι όλες οι διαδικασίες έχουν εξελιχθεί ομαλά και δεν έχει δημιουργηθεί κάποια βλάβη στο DNA. Με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο είναι έτοιμο να ξεκινήσει το διαχωρισμό του. Ωστόσο, εάν υπάρχει βλάβη στο DNA τότε ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες ελέγχου της φάσης G2 και ο κύκλος σταματάει μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη. Ο μηχανισμός ελέγχου της φάσης G2 είναι παρόμοιος με εκείνον της φάσης G1 καθώς στηρίζεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού ATM/ATR. Όπως προαναφέρθηκε, το μονοπάτι ATM/ATR οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών Chk1/Chk2 οι οποίες οδηγούν τη φωσφατάση Cdc25A για αποικοδόμηση που έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία ενεργοποίησης της κινάσης CDK1. Ακόμη, η συνάθροιση του συμπλόκου της κυκλίνης B – CDK1 παρεμποδίζεται από τη δράση του αναστολέα p21 και των πρωτεϊνών 14-3-3 (που ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη p53) οι οποίες συνδέονται με την κινάση CDK1 και την μεταφέρουν στο κυτταρόπλασμα (Löbrich et al., 2007). Τέλος, οι κινάσες ATM/ATR αναστέλλουν (μέσω αναστολής της Aurora A) τη δράση της Plk1, γεγονός που οδηγεί στη σταθεροποίηση των κινασών Wee1 and Myt1 οι οποίες φωσφορυλιώνουν και

απενεργοποιούν την CDK1 με αποτέλεσμα το κύτταρο να παραμένει στη φάση G2 μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη (Harper et al., 2007).

**Σημείο ελέγχου της μεταφάσης (mitotic spindle checkpoint):** Το σημείο ελέγχου της μίτωσης λαμβάνει χώρα στο στάδιο της μετάφασης για να διασφαλίσει ότι όλα τα χρωμοσώματα έχουν ευθυγραμμιστεί στον ισημερινό της μιτωτικής ατράκτου, όλοι οι κινητοχώροι φέρνουν δίπολες συνδέσεις με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου, ότι υπάρχουν αρκετοί μικροσωληνίσκοι στους κινητοχώρους και επαρκής μηχανική τάση μεταξύ των πρωτεϊνών του κινητοχώρου και των μικροσωληνίσκων. Αν κάτι από τα παραπάνω δεν συμβαίνει ενεργοποιείται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών ελέγχου της μετάφασης που εντοπίζεται στα κεντροσώματα και σηματοδοτεί πορείες που αποτρέπουν το κύτταρο να προχωρήσει στο στάδιο της ανάφασης. Πιο συγκεκριμένα ενεργοποιούνται πρωτεΐνες όπως οι Mad1 και Mad2 καθώς και οι κινάσες hBUBR1, hBUB1 και hMPS1. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η αναστολή του συμπλόκου APC/C και η δράση του συμπλόκου της σεκουρίνης που παρεμποδίζει τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.7.3 (Κωλέττας, 2008).

### **3.7.5 Η σχέση του άξονα PI3k - mTOR - p70s6k με τον κυτταρικό κύκλο**

Όπως έχει προαναφερθεί, το μονοπάτι PI3k – mTOR αποτελεί μια βασική σηματοδότηση που προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η απορύθμιση του οδηγεί σε υπερενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού που οφείλεται σε μη φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου και καταλήγει σε ογκογένεση.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που συνδέουν το μονοπάτι PI3k – mTOR με την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η κινάση Akt είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του DNA καθώς η αναστολή της παρεμποδίζει την αντιγραφή του DNA και συνεπώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Choudhury 2001). Επίσης, η κινάση Akt φωσφορυλιώνει τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21 στα κατάλοιπα Thr145 και Ser146. Η φωσφορυλίωση στη Thr145 οδηγεί στην αποδέσμευση του p21 από την πρωτεΐνη PCNA με αποτέλεσμα το PCNA να ενεργοποιείται και να συνδέεται με την DNA πολυμεράση οδηγώντας στη σύνθεση του DNA (Ulrich et al., 2013). Ακόμη, η φωσφορυλίωση στη Thr145 επάγει την αποδέσμευση του p21 από την

κινάση CDK2 γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση του p21 στη Ser146 από την Akt αυξάνει τη σταθερότητα του μορίου. Όπως έχει προαναφερθεί, η πρωτεΐνη p21 εκτός από αναστολέας είναι και θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου καθώς επάγει τη δημιουργία των συμπλόκων κυκλίνη D – CDK4/6 (παράγραφος 3.7.3). Η φωσφορυλίωση του p21 στη Ser146 είναι απαραίτητη για τη συνάθροιση των παραπάνω συμπλόκων (Chang et al., 2003).

Ένας ακόμη τρόπος προώθησης του κυτταρικού κύκλου από το μονοπάτι PI3k – mTOR είναι η φωσφορυλίωση - αναστολή της κινάσης GSK3. Η συγκεκριμένη κινάση φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κυκλίνη D1 (στο κατάλοιπο Thr286) και το ογκογονίδιο c-myc παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ακόμη, η κινάση GSK3 επηρεάζει τη σταθερότητα του αναστολέα p21 καθώς όταν είναι ενεργή επάγει την αποικοδόμηση του p21. Εκτός, από τον αναστολέα p21, η κινάση Akt φωσφορυλιώνει τον αναστολέα p27 στο κατάλοιπο Thr157, διατηρώντας τον στο κυτταρόπλασμα και παρεμποδίζοντας την ανασταλτική του δράση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η Akt παρεμποδίζει και με έναν ακόμη τρόπο τη δράση του αναστολέα p27, φωσφορυλιώνοντας – απενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO. Οι παράγοντες FOXO όταν είναι ενεργοί επάγουν τη μεταγραφή αναστολέων του κυτταρικού κύκλου όπως είναι η πρωτεΐνη p27 (Chang et al., 2003).

Εκτός από την κινάση Akt, η δράση της κινάσης p70s6k ως επαγωγέας της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καθώς επάγει, εκτός των άλλων, τη σύνθεση των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Αυτή η αλληλεπίδραση αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι περισσότερες κυκλίνες και κινάσες περιέχουν την αλληλουχία TOP στο 5' άκρο του mRNA τους (Yamashita et al., 2008). Ακόμη, η κινάση p70s6k2 έχειδειχτεί ότι εντοπίζεται στα κεντροσώματα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Αν και ο ρόλος της στα κεντροσώματα δεν έχει αποσαφηνιστεί, πιστεύεται ότι η παρουσία της σε αυτό το οργανίδιο βοηθάει στη σηματοδότηση της p70s6k από τα κεντροσώματα και την αλληλεπίδραση της με τον κυτταροσκελετό με σκοπό την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου (Rossi et al., 2007).

Επίσης, η ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 έχει συνδεθεί πρόσφατα με την επαγωγή της δημιουργίας της μιτωτικής ατράκτου. Το mTORC1 εντοπίζεται στα κεντροσώματα κατά τη φάση της μίτωσης και έχει βρεθεί ότι η αναστολή της δράσης του παρεμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου Aurora A – Plk1 με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου (Platani et al., 2015).

Τέλος, η απορύθμιση του μονοπατιού PI3k – mTOR στις διάφορες μορφές καρκίνου έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των κυκλινών και την παρεμπόδιση της λειτουργίας των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p21 και p27.

Οι παραπάνω τροποποιήσεις σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση της δράσης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb, είναι υπεύθυνες για την υπερ-ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου κατά την καρκινογένεση (Κωλέττας 2008).

### **3.8 Μονοπάτια/μόρια που αλληλεπιδρούν με τον άξονα Ινσουλίνη - PI3k – mTOR**

Όπως προαναφέρθηκε, το μονοπάτι PI3k – mTOR είναι απαραίτητο για όλες σχεδόν τις λειτουργίες του κυττάρου, από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση έως την αυτοφαγία και την απόπτωση. Η δυνατότητα του να ελέγχει τόσο διαφορετικές βιολογικές διεργασίες οφείλεται στο γεγονός ότι αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μόρια και συντονίζει πολλαπλά κυτταρικά σήματα. Τέτοια μόρια είναι συστατικά αναπτυξιακών μονοπατιών, όπως του Wnt και του Sonic-Hedgehog, των μονοπατιών MAPKs καθώς και συνοδά μόρια όπως η Hsp90.

#### **3.8.1 Ο ρόλος της πρωτεΐνης Hsp90 για τη λειτουργία του κυττάρου και η σχέση της με τη σηματοδότηση Akt**

Η πρωτεΐνη Hsp90 ανήκει στην κατηγορία των Heat Shock πρωτεϊνών (Hsps). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούνται σε συνθήκες στρες όπως είναι αλλαγές της θερμοκρασίας, παρουσία UV ή λόγω έλλειψης οξυγόνου. Λειτουργούν ως συνοδά μόρια κάποιων πρωτεϊνών βοηθώντας στη σταθεροποίησή τους και στη σωστή διαμόρφωσή τους, στην ενδοκυτταρική τους μεταφορά και στην αποικοδόμησή τους κάτω από στρεσογόνες συνθήκες. Ωστόσο, πολλά μέλη της οικογένειας των Hsps εκφράζονται και σε φυσιολογικές συνθήκες συνδεδεμένα με πρωτεΐνες στόχους και συμβάλλουν κυρίως

στη σταθεροποίησή τους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το συνοδό μόριο Hsp90 (Crevel et al., 2001).

Η πρωτεΐνη Hsp90 ενεργοποιείται παρουσία ATP και δημιουργεί σύμπλοκο με άλλα συνοδά μόρια όπως είναι τα Hsp70 (ή Hsc70), Hsp40, p23, Hop και Cdc37 με σκοπό τη σύνδεση των πρωτεϊνών στόχων. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου αυξάνει την ενεργότητα της Hsp90 ως ATPάση, δηλαδή την υδρόλυση του ATP σε ADP για την παραγωγή ενέργειας και τη λειτουργία της Hsp90 ως συνοδό μόριο (Workman 2004). Έχουν χαρακτηριστεί αρκετές πρωτεΐνες – στόχοι της Hsp90, όπως είναι οι υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (π.χ. η οικογένεια των υποδοχέων HER), κυτταροπλασματικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες, π.χ. Akt, Raf-1 και IKK καθώς και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως είναι αρκετές κυκλίνες (B, D και E), κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDK2,4,6) και πρωτεΐνες όπως η Aurora B, Plk1, Wee1 και Myt1 (Burrows et al., 2004).

Ο Sato και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη Hsp90 είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση της κινάσης Akt και συνεπώς τη δράση της. Η παρεμπόδιση της δημιουργίας του συμπλόκου Akt – Hsp90 οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της Akt στο κατάλοιπο Thr308 από τη φωσφατάση PP2A, τη μείωση της ενεργότητας της ως κινάση και την επαγωγή της απόπτωσης (Sato et al., 2000). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η αναστολή της Hsp90 παρεμποδίζει εκτός των άλλων και την ενεργοποίηση της κινάσης p70s6k, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο για περαιτέρω μελέτη της υπόθεσης ότι η Hsp90 μπορεί να αποτελεί συνοδό μόριο και για την p70s6k (Mitsiades et al., 2006).

Η αλληλεπίδραση της Hsp90 με τις πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν οι οποίες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, έχουν μετατρέψει την Hsp90 σε έναν ελκυστικό στόχο για τη δημιουργία στοχευμένων θεραπευτικών στρατηγικών εναντίον διαφόρων ασθενειών και ειδικά του καρκίνου. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μόρια που είτε αναστέλλουν τη δράση της Hsp90 ως ATPάση παρεμποδίζοντας τη σύνδεση του ATP είτε αναστέλλουν τη σύνδεση με τα άλλα συνοδά μόρια. Και στις δυο περιπτώσεις η Hsp90 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες στόχους γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών και αποδόμηση τους στα πρωτεοσώματα. Ο πιο βασικός αναστολέας της Hsp90 που έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δράσης της είναι το μόριο 17AAG (ή

αλλιώς tanespimycin). Ο αναστολέας 17AAG δρα μέσω δυο μηχανισμών. Πρώτον, συνδέεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP παρεμποδίζοντας τη δράση της ως ATPάση και δεύτερον αναστέλλει την αλληλεπίδραση της Hsp90 με τον μεταγραφικό παράγοντα HSF1 (Heat shock Factor-1) ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή των συνοδών μορίων Hsp70 και Hsp40. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η δημιουργία του ενεργού συμπλόκου των συνοδών μορίων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι ο αναστολέας 17AAG βρίσκεται πλέον σε στάδιο κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου καθώς και νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος Alzheimer (Ho et al., 2013).

### **3.8.2 Το μονοπάτι P38MAPK**

Η κινάση p38 ανήκει στην κατηγορία των MAPKs (mitogen-activated protein kinases) οι οποίες ενεργοποιούνται όταν παρατηρούνται αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος, όπως είναι μεταβολές στη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, των αναπτυξιακών παραγόντων και των κυτταροκινών καθώς και παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, ακτινοβολίας UV, οξειδωτικού στρες και χαμηλής οσμωτικότητας του περιβάλλοντος. Επειδή οι συγκεκριμένες κινάσες ενεργοποιούνται σε συνθήκες στρες ονομάζονται αλλιώς και SAPKs (Stress Activated Protein Kinases). Η ενεργοποίηση των MAPKs οδηγεί στη σηματοδότηση μορίων που σχετίζονται με την επιβίωση του κυττάρου, το δυναμικό πολλαπλασιασμού, τον μεταβολισμό, την αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα και γενικά διαδικασίες που διατηρούν την ομοιότητα του κυττάρου (Kuma et al., 2005)

Οι MAPKs ενεργοποιούνται ύστερα από διπλή φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr) που εντοπίζονται στην καταλυτική περιοχή της κινάσης με το μοτίβο Thr-Χαα-Tyr (όπου Χαα οποιοδήποτε αμινοξύ). Η φωσφορυλίωση γίνεται από τις κινάσες των MAPKs (MKKs) οι οποίες ενεργοποιούνται από τις MKKKs (MAPK kinase kinases). Στην κατηγορία των MAPKs ανήκουν οι οικογένειες των κινασών ERK1/2, JNK και p38. Στα θηλαστικά υπάρχουν τέσσερις ισομορφές της κινάσης p38: α, β, γ και δ, από τις οποίες η p38α είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη και εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Οι πιο γνωστές κινάσες που φωσφορυλιώνουν όλες τις



ισομορφές της p38MAPK στα κατάλοιπα Thr180/Tyr182 και τις ενεργοποιούν είναι οι MKK3 και MKK6 (Cuenda et al., 2007).

Έχουν χαρακτηριστεί πολλοί στόχοι των p38MAPKs οι οποίοι ονομάζονται MAPKAPs (MAPK Activating Proteins) και βρίσκονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία των στόχων των ισομορφών p38α και p38β ανήκουν μεταγραφικοί παράγοντες (όπως οι ATF2 και MEF2), πρωτεϊνικές κινάσες (όπως οι Mnk και MAPKAP-K2), κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, συστατικά της μεταφραστικής μηχανής, αποπτωτικά μόρια (π.χ. Bcl2 και κασπάσες), μεταβολικά ένζυμα και πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου (όπως η κυκλίνη D1). Οι p38MAPKs ελέγχουν μέσω των παραπάνω μορίων την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και επάγουν διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση των κυττάρων καθώς και η απόπτωση, ανάλογα με το ερέθισμα (Wood et al., 2009).

### **3.8.2.A Η σχέση του μονοπατιού P38MAPK με τον κυτταρικό κύκλο**

Ένας από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους ρόλους του μονοπατιού p38MAPK είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Η κινάση p38MAPK βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub>, αλλά μετά την ενεργοποίησή τους μεταβαίνει στον πυρήνα, υποδηλώνοντας μια συσχέτιση της δράσης της p38MAPK με την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (Wood et al., 2009).

Η p38MAPK αλληλεπιδρά με μόρια των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που επιτρέπουν τη μετάβαση στη φάση S και στη φάση της μίτωσης. Ανάλογα με το ερέθισμα, η p38MAPK μπορεί να προάγει είτε την πρόοδο είτε την αναστολή του κύκλου στο σημείο ελέγχου της φάσης G<sub>1</sub>, ελέγχοντας την έκφραση των κυκλινών D1 και A και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb, ή επάγοντας τη φωσφορυλίωση του ογκοκαταστολέα p53 στα κατάλοιπα Ser33 και Ser46. Επίσης, οι p38MAPKs ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις που παρουσιάζονται διαταραχές στον κυτταροσκελετό, κατά την αναστολή των απακετυλασών των ιστονών, παρουσία ακτινοβολίας UV που οδηγεί σε βλάβη στο DNA, ή παρουσία γενικά οποιασδήποτε βλάβης στο DNA και παρεμποδίζουν την είσοδο των κυττάρων στη φάση της μίτωσης σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο ελέγχου της φάσης G<sub>2</sub>. Οι p38MAPKs επάγουν τις

παραπάνω λειτουργίες καθώς εισέρχονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν στόχους όπως είναι η κινάση MAPK-K2 η οποία φωσφορυλιώνει τις φωσφατάσες Cdc25B και Cdc25C οι οποίες στη συνέχεια αναγνωρίζονται από τις πρωτεΐνες 14-3-3 που τις οδηγούν στο κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου καθώς, όπως έχει προαναφερθεί (παράγραφος 3.7.3), οι φωσφατάσες Cdc25 ενεργοποιούν τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες που επάγουν την είσοδο των κυττάρων στις φάσεις S και M (Cuenda et al., 2007, Wood et al., 2009).

Ένας ακόμη τρόπος με τον οποίο η κινάση p38 συνδέεται με τον κυτταρικό κύκλο είναι η αλληλεπίδρασή της με το σημείο ελέγχου της μετάφασης με σκοπό τη σωστή και ελεγχόμενη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου. Η κινάση p38 εντοπίζεται στα κεντροσώματα στη φάση της μίτωσης και έχει δειχθεί πως η παρουσία της σε αυτό το οργανίδιο είναι απαραίτητη για την έγκαιρη και ορθή σύνδεση των κινητοχώρων των αδελφών χρωματίδων στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου (Lee et al., 2010).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύπτεται η σημασία της ενεργής σηματοδότησης p38MAPK στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην παρεμπόδιση της καρκινογένεσης, επάγοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου η οποία μπορεί να οδηγήσει και σε απόπτωση. Εκτός, όμως από τον ρόλο της κινάσης p38 ως ογκοκαταστολέα, υπάρχουν και κάποιες μελέτες που συνδέουν τη σηματοδότηση p38MAPK με την ανάπτυξη και την μετάσταση του όγκου. Γνωρίζουμε ότι η ανάπτυξη του όγκου οδηγεί συνήθως σε καταστάσεις υποξίας και απαιτείται η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων για την περαιτέρω αύξηση του. Η κινάση p38 ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας και επάγει την παραγωγή μορίων υπεύθυνων για την αγγειογένεση όπως είναι ο αναπτυξιακός παράγοντας VEGF και μόρια στόχοι του (Rousseau et al., 2000, Houle et al., 2006).

Ο ενεργοποιητικός ρόλος του μονοπατιού p38 στην καρκινογένεση κατέστησε απαραίτητη την ανάπτυξη μορίων που αναστέλλουν τη συγκεκριμένη σηματοδότηση και παρεμποδίζουν τον ογκογενετικό της ρόλο. Ανάμεσα στους αναστολείς που έχουν χρησιμοποιηθεί, οι οποίοι έχουν συμβάλει εκτός των άλλων και στη μελέτη της δράσης των p38MAPKs, κυρίαρχη θέση κατέχει ο αναστολέας BIRB796. Το συγκεκριμένο μόριο αναστέλλει τη δράση και των τεσσάρων ισομορφών της p38MAPK σε αντίθεση με

άλλους γνωστούς αναστολείς, όπως ο SB203580, ο οποίος αναστέλλει μόνο τις ισομορφές p38α και p38β. Ο αναστολέας BIRB796 συνδέεται στην περιοχή σύνδεσης του ATP πάνω στην κινάση αλλάζοντας τη διαμόρφωση της ενεργοποιητικής της περιοχής γεγονός το οποίο παρεμποδίζει τη σύνδεση του ATP και τη λειτουργία της κινάσης. Τέλος, ο αναστολέας BIRB796 έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την καταπολέμηση διαφόρων φλεγμονωδών ασθενειών όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Kuma et al., 2005).

### **3.8.2.B Η αλληλεπίδραση της κινάσης p38 με τη σηματοδότηση PI3k/Akt - mTOR**

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι PI3k – Akt ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες όπως είναι η παρουσία φλεγμονής ή παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA (Rane et al., 2001, Tchaikovski et al., 2007, Lee et al., 2006). Η σηματοδότηση στην κινάση Akt έχει αποδειχθεί ότι διαμεσολαβείται από το μονοπάτι p38MAPK στις παραπάνω συνθήκες. Η κινάση p38 ενεργοποιείται διαμέσου της κινάσης PI3k και σχηματίζει σύμπλοκο με τους στόχους της: MAPKAP-K2 και Hsp27 που βοηθούν στην αλληλεπίδρασή της με την Akt. Με αυτόν τον τρόπο επάγεται η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt στη θέση Ser473 και η ενεργοποίησή της (Rane et al., 2001). Μάλιστα, η ενεργοποίηση των μονοπατιών PI3k/Akt και p38MAPK παρουσία αντικαρκινικών φαρμάκων όπως είναι η δοξορουβικίνη (doxorubicin) που δρα προκαλώντας βλάβες στο DNA των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε απόπτωση, παρεμποδίζει την ανασταλτική δράση του φαρμάκου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντίθετα, η χρησιμοποίηση αναστολέων των μονοπατιών PI3k και p38MAPK όπως είναι τα μόρια LY294002 και SB203580 ενισχύουν την αποπτωτική δράση της doxorubicin (Lee et al., 2006).

Εκτός την ενεργοποίηση της κινάσης Akt, η σηματοδότηση p38MAPK ενεργοποιεί την κινάση mTOR σε συνθήκες στρες μέσω ενός μηχανισμού που είναι ανεξάρτητος από τη σηματοδότηση PI3k. Έχει βρεθεί ότι η κινάση MAPKAP-K2 η οποία ενεργοποιείται από την p38MAPK φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη TSC2 στο κατάλοιπο Ser1210 και παρεμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου TSC1/TSC2. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται η κινάση mTOR και φωσφορυλιώνει τους στόχους της: p70s6k και 4EBP1. Η ενεργοποίηση της δράσης της κινάσης mTOR μέσω της σηματοδότησης p38 έχει ως αποτέλεσμα π.χ. την παραγωγή ιντερλευκινών από κύτταρα του ανοσοποιητικού

συστήματος, ως απόκριση σε περιπτώσεις φλεγμονής (Katholnig et al., 2013). Τέλος, υπάρχουν άλλες μελέτες που υποστηρίζουν ότι παρουσία θρεπτικών συστατικών, όπως αμινοξέων, η κινάση p38 επάγει την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της p70s6k σε διαφορετικά κατάλοιπα από ότι το mTORC1, όπως είναι οι θέσεις: Thr421 και Ser424 (Terradellas et al., 2008).

#### 4. ΣΚΟΠΟΣ ΑΥΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω παρατηρήσεις από τη βιβλιογραφία, δηλαδή ότι:

- διαταραχές στην ενεργοποίηση του άξονα ινσουλίνη – PI3k – mTOR συνδέονται με την ανάπτυξη του καρκίνου,
- η θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα οδηγεί σε υπερ-ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης Akt σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως και στα νευροβλαστώματα και,
- η απενεργοποίηση των μονοπατιών PI3k/Akt – mTOR με εξειδικευμένους αναστολείς (αντικαρκινικά φάρμακα που στηρίζονται στον τρόπο δράσης του LY294002 και της ραπαμυκίνης αντίστοιχα) χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνων αλλά η θεραπεία δεν είναι αποτελεσματική, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε στο σύστημά μας:
  - ποιές αλλαγές συμβαίνουν στη βιολογία των κυττάρων νευρικής προέλευσης παρουσία τέτοιου είδους φαρμάκων αλλά και μετά την απομάκρυνση τους και,
  - ποιά μονοπάτια μπορεί να σχετίζονται με την ανάκαμψη των καρκινικών κυττάρων μετά τη θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα που στοχεύουν στο μονοπάτι PI3k – mTOR.



## 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 ΥΛΙΚΑ

#### 5.1.1 Αναλώσιμα

- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon 50ml και 15ml (Sarstedt)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου erpendorf 1,5ml (Sarstedt)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 2ml (Cryo tube vials, Kisker)
- Τρυβλία 100mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 60mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 6 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 24 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Κρυοφιαλίδια για πάγωμα κυττάρων στους -196°C (Kisker)
- Πιπέτες 25 ml, 10ml, 5ml και 2ml αποστειρωμένες, για χρήση σε κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur 3ml, πλαστικές, μη αποστειρωμένες (Sarstedt)
- Μικροπιπέτες 0,2 – 1μl, 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Gilson)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 0,2 – 1μl (Greiner Bio one)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (HBG)
- Cell Scraper για τη συγκομιδή των κυττάρων από τα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας
- Γυάλινες καλυπτρίδες στρόγγυλες Ø 11mm (Thermo Scientific, Cat. No.: 12688116)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες 26 x 76mm (Deltalab)
- Φίλτρα 0,45μm (Sarstedt)

#### 5.1.2 Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά

Όλα τα διαλύματα, τα χημικά αντιδραστήρια και τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από τις εταιρίες: Sigma-Aldrich, Applichem, Panreac, Merck, Riedel-de Haen, Carl Roth, Regilait, HT-Biotechnology, Fluka, Biorad, MRC, Cell signaling, Nippon Genetics, Polysciences, Calbiochem, Roche, GE Healthcare, KAPA Biosystems, ThermoFisher Scientific, Kisker, Promega, Biosera, Axon Medchem, Cayman, Santa cruz, Selleckchem.com.

### 5.1.2.A Διαλύματα μοριακής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο

- Διάλυμα γάλακτος (5%) για την επαναιώρηση των δευτερογενών αντισωμάτων  
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 25gr σκόνης γάλακτος (Regilait) διαλύονται σε 480ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS - PAGE (10x)  
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 30gr Tris (Sigma – Aldrich, T1503), 144gr γλυκίνης (Appllichem, A1067) και 10gr SDS (Appllichem, A1502) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,3 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μια φορά.
- Διάλυμα υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών 10x  
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 24,32gr Tris (Sigma – Aldrich, T1503) και 111,66gr γλυκίνης (Appllichem, A1067) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Στο 1lt διαλύματος 1x προστίθενται 200ml MeOH (Merck, M/4056/17) λίγο πριν τη χρήση. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλες δυο φορές.
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%  
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr APS (Sigma-Aldrich, A3678) διαλύεται σε 10ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4x (Laemmli)  
Για την παρασκευή 12ml διαλύματος, 2,2ml Tris 1M, pH: 6,8 αναμειγνύονται με 4,4ml γλυκερόλης 100%, 4,4ml SDS 10%, 0,5ml της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,5ml β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα BSA (5%) για την επαναιώρηση των πρωτογενών αντισωμάτων  
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr BSA (Sigma – Aldrich, A9647) διαλύεται σε 10ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).



➤ Διάλυμα HBS 2x (HEPES-buffered saline solution)

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος HBS 2x, 1,6gr NaCl (Applichem, A2942), 0,074gr KCl (Sigma-Aldrich, P9541), 0,0402gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac, 141679.124), 0,2gr γλυκόζη (Roth, 6887.1) και 1gr HEPES (Biosera, PM-B2093) διαλύονται σε 80ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,05 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148) και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με υπερκίθαρο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο, διαμοίραση σε μερίδια του 1ml και φύλαξη τους στους -20°C.

➤ Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x

Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (Applichem, A2942), 4gr KCl (Sigma-Aldrich, P9541), 28,8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac, 141679.124) και 4,8gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 1.04873) διαλύονται σε 800ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με NaOH (Riedel-de Haen, 30620) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα SDS 10%

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος, 10gr SDS (Applichem, A1502) διαλύονται σε 80ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS) 20x

Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (Applichem, A2942), 4gr KCl (Sigma-Aldrich, P9541) και 60gr Tris base (Sigma – Adrich, T1503) διαλύονται σε 800ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα Tris – HCl 1,5M, pH: 8,8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 20,85gr Tris (Sigma – Adrich, T1503) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tris – HCl 1M, pH: 6,8  
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 60,56gr Tris (Sigma – Aldrich, T1503) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα TBS – Tween-20 0,1%  
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος TBS – Tween-20 0,1%, 5ml Tween-20 10% [αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (Sigma-Aldrich, P2287) σε υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O] προστίθενται σε 495ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)  
Για την παρασκευή 100μl μείγματος, 25μl από το καθένα dNTP (dATP, dTTP, dGTP και dCTP - HT Biotechnology, SB23) αναμειγνύονται και το μείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

#### **5.1.2.B Διαλύματα μοριακής βιολογίας του εμπορίου**

- Αιθανόλη (EtOH) υπερκάθαρη (Fluka E/0650DF/17 )
- Αντιδραστήριο Bradford 5x (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5000006)
- Αντιδραστήριο TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine - Carl Roth, 2367)
- Αντιδραστήριο Trizol (MRC, RT-111)
- Διάλυμα Acrylamide/Bis-Acrylamide 30 % (29:1) (Carl Roth, 3029.1)
- Διάλυμα RIPA 10x (Cell signaling, 9806)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (HT Biotechnology, MK05b)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Nippon Genetics, MWP04)
- Μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitor cocktail, Sigma - Aldrich, P8340)
- Νερό για PCR (Calbiochem, 9601)
- Προπανόλη-2 (Merck, 109634)

- Υπόστρωμα ECL για την εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση (Lumilight western blotting Substrate, Roche, 1201520001)
- Χλωροφόρμιο - CHCl<sub>3</sub> (Fluka, C/4960/17)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών (GE Healthcare, 10600002)
- Dimethyl Sulfoxide – DMSO (Sigma – Aldrich, D8418)
- DNA πολυμεράση (kit) (KAPA Biosystems, KK1510)
- KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, KK4601)
- Oligo(dT)18 primer – εκκινητής ολιγο-dT (Thermo Scientific, SO131)
- PCR-Plate 96-well (Kisker, GK96LOW)
- RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase - Αντίστροφη μεταγραφάση (Thermo Scientific, EP0733)
- RiboLock RNase Inhibitor – αναστολέας των ριβονουκλεασών (Thermo Scientific, EO0381)
- RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega, M6101)

#### **5.1.2.Γ Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο**

- Διάλυμα ανοσοφθορισμού  
Για την παρασκευή 50ml διαλύματος ανοσοφθορισμού, 500μl Donkey serum και 500μl Triton X-100 10% [αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (Carl Roth, 3051) σε υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O] προστίθενται σε 49ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού Νατρίου (NaCitrate)  
Για την παρασκευή 20ml διαλύματος 1M, 5,88gr NaCitrate (M.B. 294,1g/mol) διαλύονται σε 18ml υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH στο 7,4 με κιτρικό οξύ και ο όγκος συμπληρώνεται στο 20ml με υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο 0,45μm και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (Propidium Iodide - PI)  
Για την παρασκευή 300μl διαλύματος, 13,8μl (ή 69μM) Ιωδιούχου προπιδίου (Sigma-Aldrich, P4864) προστίθενται σε 283,2μl Κιτρικού Νατρίου (38mM). Ακολουθεί ανάμειξη και στο μείγμα προστίθενται 3μl RNase (10mg/ml, Sigma-Aldrich, R4875). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4oC σε σκοτεινό μέρος.

#### 5.1.2.Δ Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας του εμπορίου

- Μέσο στερέωσης των καλυπτρίδων στην αντικειμενοφόρο πλάκα: Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium (Polysciences, 18606 - 20)

#### 5.1.2.Ε Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών

- Donkey Serum (Biosera, AS-228/500)
- Fetal Bovine Serum - FBS [Biosera, FB-1001/500(B11636)]
- Antibiotic-Antimycotic 100x (ThermoFisher Scientific, 15240062)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (ThermoFisher Scientific, 41966029)
- DMEM, με συμπλήρωμα GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific, 10566-016 )
- Συμπλήρωμα B-27® (50X) (ThermoFisher Scientific, 17504-044)
- Διάλυμα θρυψίνης 0,05% με 0,53mM EDTA σε PBS (Biosera, LM-T1706/500)
- Phosphate Buffered Saline – PBS για κυτταροκαλλιέργεια (Biosera, LM-S2041/500)

#### 5.1.3 Χημικοί αναστολείς – επαγωγείς

- BIRB 796 (Axon Medchem, 1358)
- LY294002 (Cayman, 70920)
- Ραπαμυκίνη – RAPA (Santa Cruz, sc-3504)
- Ρετινοϊκό οξύ – RA (Sigma – Aldrich, R2625)
- Tanespimycin – 17AAG (Selleckchem.com, S1141)

#### 5.1.4 Αντισώματα

- **Αντισώματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western**

##### **Πρωτογενή αντισώματα**

- Anti-Akt (Cell signaling, 4691), αραίωση 1:2000
- Anti-Aurora B (Abcam, ab2254), αραίωση 1:2000
- Anti-b-actin (Millipore, MAB1501), αραίωση 1:10000
- Anti-cyclin A (Santa cruz, sc-751), αραίωση 1:500
- Anti-cyclin D1 (Santa cruz, sc-718), αραίωση 1:500
- Anti-c-Myc (Santa cruz, sc-789), αραίωση 1:500
- Anti-DCX (Abcam, ab18723), αραίωση 1:1000

- Anti-Hsp40 (Abcam, ab69402), αραιώση 1:5000
- Anti-Hsp90 (Millipore, 386041), αραιώση 1:1000
- Anti-Hsc70 (Stressgen, SPA-815B), αραιώση 1:5000
- Anti-p-Akt(Ser473) (Cell signaling, 4060), αραιώση 1:1000
- Anti-p-Akt(Thr308) (Cell signaling, 2965), αραιώση 1:1000
- Anti-p-p38(Thr180/Tyr182) (Cell signaling, 9211), αραιώση 1:500
- Anti-p-p70s6k(Ser371) (Cell signaling, 9208), αραιώση 1:1000
- Anti-p-p70s6k(Thr389) (Cell signaling, 9234), αραιώση 1:1000
- Anti-p-4EBP1(Thr37/46) (Cell signaling, 2855), αραιώση 1:2000
- Anti-PCNA (Santa cruz, sc-56), αραιώση 1:500
- Anti-p-Rb(Ser807/811) (Cell signaling, 9308), αραιώση 1:500
- Anti-p27 (Cell signaling, 3686), αραιώση 1:500
- Anti-p38 (Cell signaling, 9212), αραιώση 1:500
- Anti-p53 (Santa cruz, sc-6243), αραιώση 1:500

#### **Δευτερογενή αντισώματα**

- Αντίσωμα κασίικας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με HRP (goat anti-rabbit, Thermo Scientific, 31460), αραιώση 1:2500 – 1:5000
- Αντίσωμα κασίικας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με HRP (goat anti-mouse, Jackson immunoresearch, 115-035-146), αραιώση 1:5000
- Αντίσωμα κασίικας έναντι IgG (H+L) αρουραίου συζευγμένο με HRP (goat anti-rat, Jackson immunoresearch, 112-035-003), αραιώση 1:5000

#### ➤ **Ανοσοφθορισμός**

##### **Πρωτογενή αντισώματα**

- Anti-acetylated tubulin (Lys40) (Sigma, T6793), αραιώση 1:1000
- Anti-BrdU, αραιώση 1:50
- Anti-Ki67 (Abcam, ab15580), αραιώση 1:500
- Anti-pH3(ser10) (Upstate, 06-570), αραιώση 1:500

### **Δευτερογενή αντισώματα**

- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF555 goat anti-rabbit , Biotium, 20033), αραίωση 1:1000
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική Alexa fluor που εκπέμπει στα 488nm, δίνοντας πράσινο χρώμα (Alexa fluor 488 goat anti-mouse, Invitrogen, A-11001), αραίωση 1:1000

### **Χρώση του πυρήνα**

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI (Sigma-Aldrich, D9542), η οποία εκπέμπει στα 460nm δίνοντας μπλέ χρώμα.

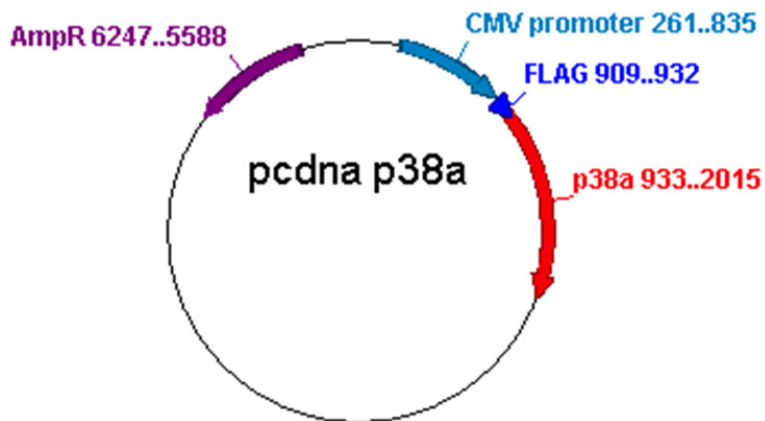
#### **5.1.5 Κυτταρικές σειρές**

- Neuro2A: Καρκινικά κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού προερχόμενα από την νευρική ακρολοφία του περιφερικού νευρικού συστήματος
- SH-SY5Y: Καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος προερχόμενα από την νευρική ακρολοφία του περιφερικού νευρικού συστήματος, απομονωμένα από μυελό των οστών ασθενούς με νευροβλάστωμα
- HCN: Νευρικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από περιοχές νευρογένεσης του ενήλικου εγκεφάλου αρουραίου.

#### **5.1.6 Πλασμίδια**

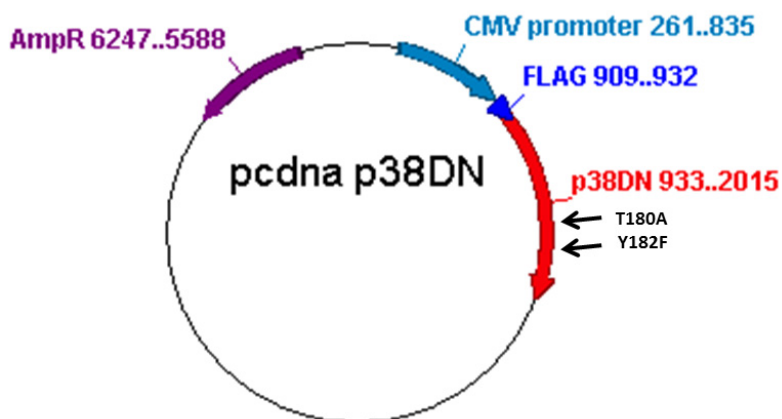
Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παραχωρήθηκαν από τον Δρ. Θυφρονίτη Γεώργιο, ο οποίος είναι υπεύθυνος του εργαστηρίου Ανοσολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και είναι τα ακόλουθα:

1. Πλασμιδιακός φορέας pCDNA στον οποίο έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη p38α (wt).



Εικόνα 5.1: Κυκλικός χάρτης του πλασμιδίου PCDNA το οποίο περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση p38α ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)).

2. Πλασμιδιακός φορέας PCDNA στον οποίο έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την αδρανή μορφή της πρωτεΐνης p38α (Dominant Negative - DN)



Εικόνα 5.2: Κυκλικός χάρτης του πλασμιδίου PCDNA το οποίο περιέχει το μεταλλαγμένο γονίδιο της αδρανούς μορφής της κινάσης p38 ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)).

Η αδρανής μορφή της πρωτεΐνης p38 έχει προκύψει ύστερα από αντικατάσταση του καταλοίπου της θρεονίνης (T) στη θέση 180 από αλανίνη (A) και της τυροσίνης (Y) στη θέση 182 από φαινυλαλανίνη (F). Αυτές οι αντικαταστάσεις απενεργοποιούν τη δράση της κινάσης p38 καθώς παρεμποδίζεται η φωσφορυλίωση – ενεργοποίησή της στα κατάλοιπα Thr180/Tyr182 (Winzen et al 1999).

### 5.1.7 Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και οι θέσεις των νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί. Η αλληλουχία του γονιδιώματος καταγράφεται στη βάση δεδομένων NCBI.

**Πίνακας 5.1: Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές**

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' έως 3')	Θέσεις αναγνώρισης πάνω στο γονίδιο	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
DCXs	ACCCCAAGTCTAAGCAGTCTC	1148 - 1169	133
DCXa	CTCCCCTCCTTTACATGGAATC	1280 - 1259	
SRP14s	CAGCGTGTTTCATCACCCCTCAA	154 - 174	109
SRP14a	GGCTCTCAACAGACACTTGTTTT	262 - 240	

Η σύνθεση των συγκεκριμένων εκκινητών έγινε από την εταιρία: VbC BIOTECH.

### 5.1.8 Λογισμικό

Για την ανάλυση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά:

- Excel, όπου η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Paired t-TEST
- Bio-Rad CFX Manager, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της QPCR
- FlowJo, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής
- LAS AF Lite, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού

### 5.1.9 Εξοπλισμός

- Αναδευτήρας για ανάδευση των μεμβρανών (Kisker, mini Rocker, MR-1)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για eppendorfs (KUBOTA 3300)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για σωληνάρια τύπου falcon (Heraeus, Megafuge 1R)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Telstar, Bio II Advance)
- Θερμοκυκλοποιητής για συμβατική PCR (Applied Biosystems, PCR system 8700)



- Θερμοκυκλοποιητής για QPCR (Biorad, CFX96 system)
- Κλίβανος κυττάρων (FORMA SCIENTIFIC)
- Κυτταρομετρητής ροής (BD Biosciences FACSCalibur Flow Cytometer)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LABINCO L34)
- Μηχάνημα εμφάνισης φιλμ (Amersham Hyperprocessor)
- Μικροσκόπιο TIRF (Leica)
- Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS, Axiovert25)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών μικρής κλίμακας (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD)
- Συσκευή μέτρησης του pH (ORION 410A)
- Συσκευή υπερήχων (BRANSON 250-D)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (Hitachi, U-2001)

## 5.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων ([www.abcam.com](http://www.abcam.com))

Όλες οι διαδικασίες που σχετίζονται με την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών σε θάλαμο νηματικής ροής, υπο ασηπτικές συνθήκες.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic)

Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM – Glutamax
- 2% B27
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic)
- 20ng/ml bFGF και EGF

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανσή του στους 56°C για 30min με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση και η αδρανοποίησή τους θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή τυχόν λανθασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων από το κύτταρο (Q&A, 2012). Ακόμη, η θέρμανση του ορού έχει συνδεθεί με την αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως το μυκόπλασμα (BIOCHROM AG, 2005).

Η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες στις ακόλουθες συνθήκες:

- Θερμοκρασία: 37°C
- Περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>: 5%

### **5.2.2 Ανακαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης (www.abcam.com)**

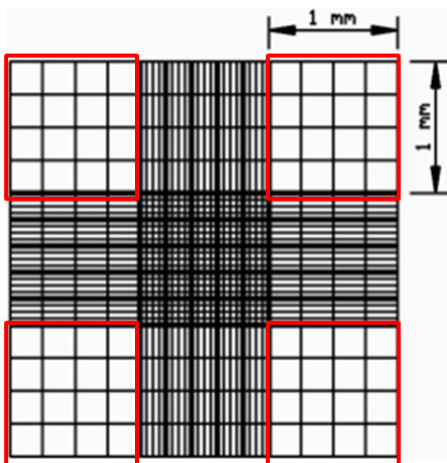
Για να διατηρηθεί η κυτταροκαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων (Neuro2A και SH-SY5Y), όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν το 80% - 90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (ή passage) σε καινούριο τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης, που είναι μια πρωτεάση η οποία προκαλεί διάσπαση των αμινοξικών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και την αποκόλληση τους από την επιφάνεια του πιάτου. Πραγματοποιούνται συνήθως μέχρι 25 ανακαλλιέργειες περίπου καθώς από το σημείο αυτό κι έπειτα αρχίζει να φθίνει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας έχει ως εξής:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το πιάτο κυτταροκαλλιέργειας.
2. Απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού μέσω μιας πλύσης με διάλυμα PBS.
3. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 min και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του πιάτου με ελαφρά χτυπήματα.
4. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και ανάδευση των κυττάρων, με πιπέτα μιας χρήσεως, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα μεταξύ τους.

5. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
6. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο πιάτο με θρεπτικό υλικό.
7. Επώαση των κυττάρων στους 37°C, όπου προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του πιάτου.

### 5.2.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται με την πλάκα Neubauer. Προστίθενται 10μl κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα και μετράται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκεται εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά βρίσκονται στις τέσσερις γωνίες της πλάκας και αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα (εικόνα 3.3). Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει από το άθροισμα του αριθμού των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα και διαιρείται δια του 4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται  $\times 10^4$  και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml ([www.celeromics.com](http://www.celeromics.com)).



Εικόνα 5.3: Χώρος μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer

#### 5.2.4 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά κρυοφιαλίδια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) με την παρακάτω διαδικασία:

1. Θρυψινοποίηση του πιάτου.
2. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min, στα 900rpm.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου (900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
4. Προσθήκη 900μl διαλύματος κατάψυξης (freezing mix) το οποίο περιλαμβάνει: 50% FBS, 20% DMSO και 30% θρεπτικού υλικού (χωρίς FBS).
5. Μεταφορά 1,8 ml αυτού του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης.
6. Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι αυτό τα κρυοφιαλίδια πρέπει να ψύχονται κατευθείαν μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό εναιώρημα.
7. Μετά από 12-24 ώρες, το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

#### 5.2.5 Απόψυξη των κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει:

1. Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους  $37^{\circ}\text{C}$ , αφού πρώτα καθαριστεί με 70% αιθανόλη.
2. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου falcon που περιέχει 8,2ml πλήρους θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρηση στα 900rpm για 5min.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο και ανάδευση με πιπέτα μιας χρήσεως.
4. Μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας και τοποθέτηση στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

### 5.2.6 Νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A

Η διαφοροποίηση των νευροβλαστωματικών κυττάρων, Neuro2A, πραγματοποιείται με τη χρήση ρετινοϊκού οξέος (RA). Το ρετινοϊκό οξύ επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που καταστέλλουν την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης N-Myc, η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων και παρεμποδίζουν τη δημιουργία του συμπλόκου N-Myc/Max (Cetinkaya et al., 2007). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι το ρετινοϊκό οξύ επάγει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενεργοποιώντας μόρια, όπως είναι οι p21<sup>Cip1</sup> και p27<sup>Kip1</sup> οι οποίοι αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G0/G1 (Dimberg et al., 2002). Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι οι ακόλουθες:

- 10μM RA
- DMEM
- 1% FBS
- 1% Antibiotic – Antimycotic

Η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων έχει ως εξής:

1. Αφού έχει προηγηθεί θρυψινοποίηση, μεταφέρεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων σε νέο πιάτο (π.χ. 35000 κύτταρα σε πιάτο 6-well). Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί καλή ανάδευση των κυττάρων, πριν τη μεταφορά στο καινούριο πιάτο, γιατί να κύτταρα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μονήρη.
2. Την επόμενη ημέρα, όπου η πυκνότητα του πιάτου είναι περίπου 20%-30%, προστίθεται το RA στην καλλιέργεια.
3. Το RA ανανεώνεται ανά δυο ημέρες στην καλλιέργεια με την ακόλουθη διαδικασία: αφαιρείται η μισή ποσότητα του θρεπτικού μέσου και προστίθεται άλλη τόση που περιέχει τη διπλάσια ποσότητα RA.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 4 ή 5 ημέρες παρουσίας του RA και είτε χρησιμοποιούνται κατευθείαν, είτε τα πιάτα καταψύχονται στους -80°C.

Ένα κύτταρο Neuro2A για να θεωρηθεί διαφοροποιημένο θα πρέπει να περιέχει αντιδιαμετρικά 2 νευρίτες και το μήκος τους να είναι τουλάχιστον διπλάσιο από τη διάμετρο του σώματος (Cowley et al., 1994).

### 5.2.7 Μεταχείριση των κυττάρων με τους χημικούς αναστολείς

1. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων και μεταφορά του κατάλληλου αριθμού σε νέο πιάτο (π.χ. 90000 κύτταρα σε πιάτο 6-well).
2. Οι χημικοί αναστολείς LY και RAPA, προστίθενται την επόμενη ημέρα όπου η πυκνότητα των κυττάρων στο πιάτο είναι 50% - 60% περίπου.
3. Οι αναστολείς ανανεώνονται ανά 2 ημέρες με αφαίρεση ολόκληρης της ποσότητας του θρεπτικού μέσου και προσθήκη άλλης τόσης με την ίδια ποσότητα των αναστολέων.

Κατά τον ίδιο τρόπο γίνεται και η προσθήκη των αναστολέων BIRB796 και 17AAG σε καλλιέργεια στην οποία δεν έχει προστεθεί LY ή RAPA πιο πριν.

### 5.2.8 Διαμόλυνση των κυττάρων (Transfection)

Η είσοδος εξωγενούς DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα (διαμόλυνση) μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χημικούς τρόπους (όπως  $\text{CaCl}_2$ , λιποσώματα, κατιονικά πολυμερή), είτε με μη χημικές μεθόδους (όπως ηλεκτροδιάτρηση, υψηλή πίεση, νανοσωματίδια) καθώς και παρουσία ιων. Από τις χημικές μεθόδους, η διαμόλυνση με  $\text{CaCl}_2$  παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αποδοτικότητα (διαμόλυνση 70% - 80% των κυττάρων) σε σχέση με τη μέθοδο των λιποσωμάτων (όπως λιποφεκταμίνη) και των κατιονικών πολυμερών (όπως πολυαιθυλαμίνη - PEI) όπου το ποσοστό επιτυχίας μειώνεται δραματικά στα 20% - 30% στα κύτταρα Neuro2A. Για αυτόν τον λόγο, η μέθοδος του  $\text{CaCl}_2$  επικράτησε να χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας για τη διαμόλυνση των κυττάρων Neuro2A με εξωγενές DNA το οποίο έχει εισαχθεί σε πλασμίδια.

Η διαμόλυνση των κυττάρων με τη χρήση  $\text{CaCl}_2$  αποτελεί μια από τις πιο φθηνές μεθόδους διαμόλυνσης και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των φωσφορικών ιόντων του διαλύματος HBS με το  $\text{CaCl}_2$  το οποίο έχει συνδεθεί με το μεταφερόμενο DNA. Όταν αυτές οι δυο ενώσεις έρθουν σε επαφή, τότε δημιουργείται ιοντικός δεσμός μεταξύ του θετικά φορτισμένου  $\text{Ca}_2$  και της αρνητικά φορτισμένης φωσφορικής ομάδας του HBS με αποτέλεσμα το DNA να μεταφέρεται στην επιφάνεια αυτού του δεσμού. Το διάλυμα, στη συνέχεια, μεταφέρεται στα κύτταρα όπου το DNA, με έναν όχι και τόσο καλά χαρακτηρισμένο μηχανισμό, εισέρχεται στο εσωτερικό τους (Kriegler M. 1991).

Η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με τη μέθοδο του  $\text{CaCl}_2$ , όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well, έχει ως εξής:

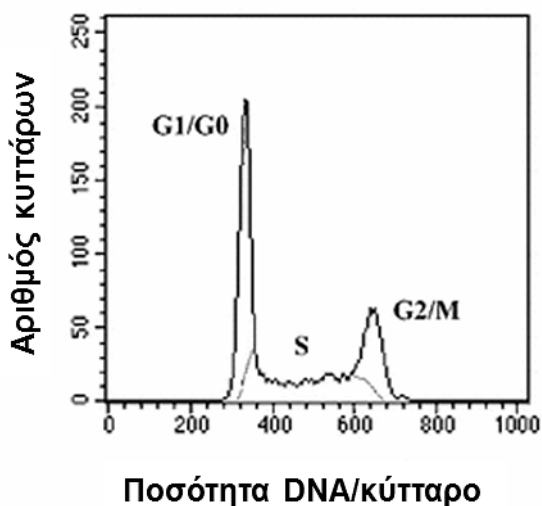
1. 1μg – 3μg πλασμιδιακού φορέα, στο οποίο έχει εισαχθεί το εξωγενές DNA, αναμειγνύονται με τόσο όγκο  $\text{H}_2\text{O}$  έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 39,5μl.
2. Στο μείγμα προστίθενται 5,5μl  $\text{CaCl}_2$  (2M) και 45μl HBS 2x.
3. Αμέσως ακολουθεί ανάδευση με έντονο vortex (15sec).
4. Το διάλυμα με το DNA προστίθεται στα κύτταρα στάγδην καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του πιάτου και στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C. Ύψιστης σημασίας σε αυτό το στάδιο είναι η αποφυγή της ανάδευσης των θρεπτικού υλικού καθώς υπάρχει κίνδυνος να σπάσουν οι δεσμοί του συμπλέγματος HBS -  $\text{CaCl}_2$ .
5. Μετά από 4 – 6 ώρες ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας του ασύνδετου συμπλέγματος, καθώς η υψηλή συγκέντρωση αλάτων είναι τοξική για τα κύτταρα.
6. Τα κύτταρα συλλέγονται συνήθως μετά από 1 ή 2 ημέρες, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος.

### 5.2.9 Πρωτόκολλο προετοιμασίας των κυττάρων για ανάλυση FACS

Η ανάλυση FACS (Fluorescence-activated cell sorting) αποτελεί μια εξειδικευμένη μορφή κυτταρομετρίας ροής. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη μελέτη ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών όπου η ανάλυση γίνεται κύτταρο προς κύτταρο, με βάση κάποια χαρακτηριστικά του κάθε κυττάρου, όπως είναι η σκέδαση και ο φθορισμός. Παρέχει μια γρήγορη, αντικειμενική και ποσοτική καταγραφή των σημάτων φθορισμού από μεμονωμένα κύτταρα, καθώς και τη δυνατότητα φυσικού διαχωρισμού και απομόνωσης των κυττάρων (Julius et al., 1972).

Στην παρούσα μελέτη, η μεθοδολογία FACS χρησιμοποιήθηκε για τη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων στις διάφορες συνθήκες του πειράματος. Ο κυτταρικός κύκλος των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων μιας καλλιέργειας παρουσιάζει 2 κορυφές (εικόνα 3.4): μια αριστερά (πλησιέστερα στον άξονα των γ) που αντιστοιχεί στις φάσεις G0/G1 και μια δεξιά που αντιστοιχεί στις φάσεις G2/M. Η περιοχή που βρίσκεται ενδιάμεσα απ' τις δυο κορυφές και επικαλύπτεται με την ώριμη G1 και την πρώιμη G2, αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όπου

αντιγράφεται το γενετικό υλικό (Hang et al., 2004). Τα κύτταρα των φάσεων G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ενός διπλοειδούς οργανισμού έχουν δυο αντίγραφα DNA, ενώ όταν βρίσκονται στις φάσεις G<sub>2</sub>/M έχουν τέσσερα αντίγραφα. Η ανίχνευση της ποσότητας του DNA των κυττάρων και ο διαχωρισμός στις επιμέρους φάσεις γίνεται με τη χρήση της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο η οποία είναι ένα φθορίζον μόριο που συνδέεται στις βάσεις του DNA (ή RNA).



Εικόνα 5.4: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής (Τροποποίηση από: Hang et al., 2004)

Η προετοιμασία των κυττάρων για ανάλυση FACS περιγράφεται παρακάτω ([www.flemingtonlab.com](http://www.flemingtonlab.com)):

1.  $10^6$  κύτταρα φυγοκεντρώνται στα 900rpm για 5 min.
2. Ακολουθεί μια πλύση των κυττάρων με 3ml - 5ml PBS.
3. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl διαλύματος PBS με 0,1% γλυκόζη (αυτό το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C).
4. Αμέσως προστίθενται 5ml παγωμένης 70% EtOH (φυλάσσεται στους -20°C) στάγδην καθώς πραγματοποιείται ήπια ανάδευση των κυττάρων μέσω vortex.
5. Το μείγμα ανακατεύεται και φυλάσσεται στους 4°C για 1 ώρα έως 1 εβδομάδα, με σκοπό τη μονιμοποίηση των κυττάρων παρουσία της EtOH.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 900rpm για 5min.
7. Πλύση των κυττάρων μια φορά με 1ml PBS.



8. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση του PBS. Δεύτερη φυγοκέντρηση και αφαίρεση του εναπομείναντος PBS.
9. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 300μl διαλύματος ιωδιούχου προπιδίου το οποίο περιέχει RNase για τον κατακερματισμό του RNA και την πρόσδεση του ιωδιούχου προπιδίου μόνο στο DNA (φυλάσσεται στους 4°C).
10. Ανάδευση και επώαση στους 37°C για 30 – 45min.
11. Ανάλυση των δεδομένων στο κυτταρόμετρο.

Η συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο μηχάνημα που περιγράφεται στην παράγραφο 5.1.9.

#### **5.2.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός**

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Τα φθοριοχρώματα, ή φθορίζουσες χρωστικές, εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες με την περιοχή Fc των αντισωμάτων, ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικές από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) που εκπέμπει πράσινο χρώμα, η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC) που εκπέμπει κόκκινο χρώμα και η φυκοερυθρίνη (RE) που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντι-ισοτυπικό αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική.

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιούνται χρωστικές που δεσμεύονται στο DNA, όπως είναι οι DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), PI (ιωδιούχο προπίδιο) και TO-PRO-3, οι οποίες εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Το φως που εκπέμπεται από τις φθορίζουσες χρωστικές μπορεί να γίνει ορατό με απλό μικροσκόπιο το οποίο είναι εξοπλισμένο με λάμπα φθορισμού ή με συνεστιακό μικροσκόπιο.

Το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που ακολουθείται στο εργαστήριο μας είναι το ακόλουθο:

1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well στο οποίο έχει προηγηθεί η επίστρωση με γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 11mm.
2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με 500μl PBS.
3. Τα κύτταρα επί των καλυπτρίδων μονιμοποιούνται σε 200μl διαλύματος PFA 4% (παραφολμαδεΐδης) για 10min, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl PBS, από 5min η καθεμία. Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C.
5. Οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα μεταφέρονται σε μια κατασκευή που τους παρέχει υγρασία και περιέχει τα εξής: ένα πιάτο κυτταροκαλλιεργειών μεγάλης διαμέτρου με 3 χαρτιά whatman στο μέγεθος του πιάτου, τα οποία διαβρέχονται με νερό και πάνω τους τοποθετείται πλαστική μεμβράνη τύπου parafilm. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται πάνω στην μεμβράνη με την πλευρά των κυττάρων προς τα πάνω.
6. Τα κύτταρα επωάζονται με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων και τη διευκόλυνση της εισόδου των αντισωμάτων.
7. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4°C.
8. Ακολουθούν δυο πλύσεις με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού, από 5min η καθεμία και μια ακόμη που διαρκεί 30min.
9. Αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραιώση καθώς και η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα γίνονται σε σκοτεινό μέρος.
10. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
11. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα η χρωστική DAPI, αραιωμένη σε PBS (50μl) για 2min.
12. Πραγματοποιούνται τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
13. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο ακριβώς όπου πριν έχει τοποθετηθεί μικρή

ποσότητα (6-7μl) του μέσου στερέωσης των καλυπτρίδων (mounting medium).

14. Οι καλυπτρίδες αφήνονται να στεγνώσουν ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος και στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C (σε σκοτεινό μέρος) μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανιχνεύτηκαν μέσω μικροσκοπίας TIRF.

Σημείωση: Οι αραιώσεις του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος γίνονται σε 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού.

### **5.2.11 Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη χρήση 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU)**

Ένας τρόπος μέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων είναι μέσω της χρήσης 5'-βρώμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU). Η BrdU είναι ένα συνθετικό νουκλεοτίδιο ανάλογο της θυμιδίνης και χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων σε ζωντανούς ιστούς. Η BrdU μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA των κυττάρων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενετικού υλικού, στη φάση S, αντικαθιστώντας τη θυμιδίνη (Lehner et al., 2011). Η ενσωμάτωση της BrdU μπορεί να ανιχνευτεί με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον του συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα που έχουν αναπαραγάγει ενεργά το DNA τους (BrdU<sup>+</sup> κύτταρα).

#### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενσωμάτωση της BrdU στα κύτταρα περιγράφεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα, παράγραφος 4.2.2. Η μεθοδολογία της ανίχνευσης των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων στηρίζεται στη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.9, με μόνη διαφορά την επώαση των κυττάρων με HCl 2N για 10min που ακολουθείται από 5 πλύσεις με PBS πριν τη διαδικασία διαπεράτωσης των κυττάρων (Βήμα 6). Η προσθήκη του HCl είναι απαραίτητη για τη μετουσίωση του DNA με σκοπό την πρόσδεση του αντισώματος έναντι της BrdU (Tischler 1995).

### 5.2.12 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Κοινό χαρακτηριστικό για όλες τις μεθόδους είναι η ιδιαίτερη προσοχή που θα πρέπει να διατηρηθεί προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με αποδιατακτικά ένζυμα, όπως είναι οι ριβονουκλεάσες (RNases) τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης αλλά και μετά το πέρας αυτής. Γι' αυτό το λόγο όλη η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον όπου ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές και χρησιμοποιείται ειδικός πλαστικός εξοπλισμός που είναι απαλλαγμένος από RNases. Η απομόνωση του RNA στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εκχύλισης μέσω του συνδυασμού: θειοκυανικό γουανιδίνιο – φαινόλη – χλωροφόρμιο. Το θειοκυανικό γουανιδίνιο και η φαινόλη περιέχονται στο διάλυμα Trizol. Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με τη μέθοδο Trizol, από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 10cm, είναι το ακόλουθο (<https://tools.thermofisher.com>):

1. 1ml διαλύματος Trizol προστίθεται στα κύτταρα του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας (αφού έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό) ή στο ίζημα των κυττάρων (αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση).
2. Τα κύτταρα με το Trizol συλλέγονται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και σε αυτό το στάδιο μπορούν να φυλαχθούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ειδάλλως, ακολουθεί θραύση των κυτταρικών μεμβρανών μέσω έντονης ανάδευσης (15 φορές) με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης (1ml).
3. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προστίθενται 200μl χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
5. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα  $12000g$  για 15min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει ένα μείγμα τριών φάσεων: η πάνω φάση (υδατική) περιλαμβάνει τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), η μεσόφαση περικλείει κυρίως πρωτεΐνες και η κάτω φάση (οργανική) περιέχει μεμβρανικά θραύσματα, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και θραύσματα οργανιδίων.

7. Η πάνω φάση, που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο, προστίθενται 200μl ισοπροπανόλης και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
  8. Ακολουθεί επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το RNA κατακρημνίζεται λόγω βαρύτητας και αδιαλυτότητας στην ισοπροπανόλη.
  9. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 12000g για 10min στους 4°C.
  10. Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 75% υπερκάθαρης αιθανόλης. Το ίζημα σε αυτό το στάδιο παραμένει ορατό καθώς δεν διαλυτοποιείται παρουσία αιθανόλης.
  11. Το RNA φυγοκεντρείται στα 7500g για 5min στους 4°C.
  12. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί ακόμα μια φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αιθανόλης.
  13. Τα φιαλίδια με το RNA αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά τα καπάκια για 5 - 10min. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται προσοχή καθώς πρώτον, το RNA θα πρέπει να παραμείνει σε περιβάλλον καθαρό από RNases και δεύτερον, δεν θα πρέπει να ξεπεραστεί το διάστημα των 10min καθώς υπάρχει κίνδυνος να ξεραθεί το RNA και να μην επαναδιαλύεται στη συνέχεια.
  14. Τέλος, το RNA επαναδιαλύεται σε 30μl H<sub>2</sub>O και φυλάσσεται στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.
- Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα πιάτα διαφορετικής διαμέτρου οι ποσότητες των αντιδραστηρίων προσαρμόζονται ανάλογα.

### **5.2.13 Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από το DNA**

Μια διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της καθαρότητας του απομονωμένου RNA είναι η απομάκρυνση τυχόν επιμολύνσεων με γενωμικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την κατεργασία του RNA με δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ένα ένζυμο το οποίο αποικοδομεί το DNA καθώς καταλύει τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit της εταιρίας Promega και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Αναμειγνύονται τα συστατικά της αντίδρασης:

Αντιδραστήριο	Όγκος
RNA	1-8μl (1,5μg)
Ρυθμιστικό διάλυμα της DNase, 10x(απαλλαγμένο από RNases)	1μl
DNase (απαλλαγμένη από RNases)	1μl
H <sub>2</sub> O (απαλλαγμένο από RNases)	0-7μl
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>10μl</b>

2. Ακολουθεί επώαση του μείγματος στους 37°C για 30min, όπου δρα η DNase.
3. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1μl διαλύματος STOP, το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της DNase.
4. Επώαση του μείγματος στους 65°C για 10min, όπου δρα το διάλυμα STOP και αποθήκευση του RNA προσωρινά στους -20°C ή απευθείας μετατροπή σε cDNA

#### 5.2.14 Αντίστροφη Μεταγραφή (Sambrook et al., 2006)

Κατά την αντίδραση της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription), ένα μονόκλωνο RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA (complementary DNA - cDNA), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μια αλυσίδα RNA συνθέτει τη συμπληρωματική της αλυσίδα cDNA. Παρουσία ενός εκκινητή που περιέχει την αλληλουχία ολιγο-dT, η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να συνθέσει ειδικό cDNA, από mRNA, καθώς ο εκκινητής αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία πολύ-A που βρίσκεται στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Το 3' άκρο που σχηματίστηκε δημιουργεί μια δομή φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της εταιρίας Thermo Scientific. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη των τριών πρώτων συστατικών για κάθε δείγμα (Τελικός όγκος 13μl).
  - dH<sub>2</sub>O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες) 0-8μl
  - Εκκινητής (primer) OligodT (5μM) 1μl

- RNA (0.75 µg/αντίδραση) 1-12µl
2. Ανάδευση (8-10 φορές) και μεταφορά σε πάγο.
  3. Επώαση των αντιδράσεων για 5min στους 65°C και 2min στον πάγο.
  4. Προετοιμασία του Master Mix της αντίδρασης στον πάγο (Τελικός όγκος 7µl/αντίδραση).
    - dH<sub>2</sub>O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες) 1µl
    - Μείγμα dNTPs (10mM το καθένα) 1µl
    - Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Reaction Buffer buffer) 4µl
    - Αναστολέας των RNases (RiboLock RNase Inhibitor - 20U) 0.5µl
    - Αντίστροφη μεταγραφάση (RevertAid RT - 100U) 0.5µl
  5. Ανάδευση 12-15 φορές.
  6. Από το Master Mix μεταφέρονται 7µl σε κάθε αντίδραση.
  7. Επώαση των αντιδράσεων στους 50°C για 30min.
  8. Απενεργοποίηση των ενζύμων με επώαση στους 85°C για 5min και άμεση μεταφορά σε πάγο.
  9. Φύλαξη στους -20°C.

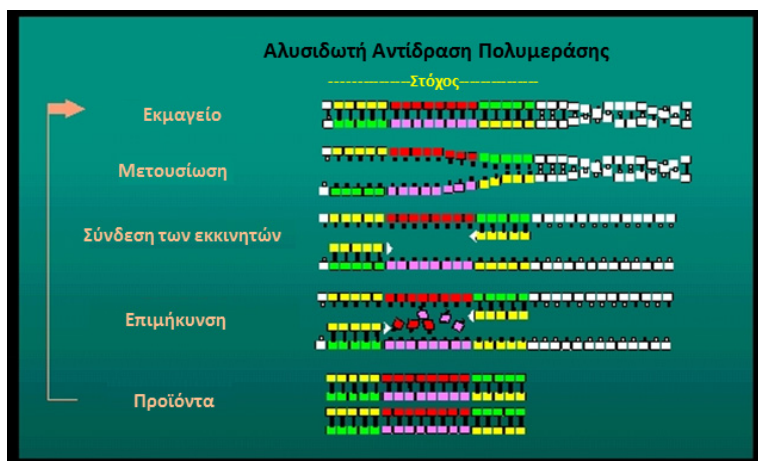
Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αντιδράσεις μετατροπής του RNA σε cDNA έγιναν εις διπλούν για το κάθε δείγμα. Η μια ήταν η κανονική και η άλλη που ονομάζεται no RT ή -RT περιελάμβανε όλα τα συστατικά της αντίδρασης (μαζί με το RNA), χωρίς όμως την αντίστροφη μεταγραφάση. Αυτό το δείγμα αποτελεί το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής καθώς εάν υπάρχει χρωμοσωμικό DNA στο RNA θα φανεί και εκεί προϊόν μετά την αντίδραση PCR.

### 5.2.15 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis και τους συνεργάτες του στα μέσα του 1980, για την οποία ο Kary Mullis βραβεύτηκε το 1993 με το βραβείο Nobel στη Χημεία (Kubista et al., 2006).

Με την απλή PCR, μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύεται με συγκεκριμένα πριμοδοτικά μόρια και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση DNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο τα πριμοδοτικά μόρια (εκκινητές) ενώνονται με τις

μονόκλωνες συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA (την νοηματική και την αντινοηματική αλυσίδα) και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει μια καινούργια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 5.5: Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR (Τροποποίηση από Lee 2009).

Η σύνθεση γίνεται προς την κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Θεωρητικά, το DNA ενισχύεται μέσω PCR 2 $\nu$  φορές μετά από  $\nu$  κύκλους (Saiki et al., 1998). Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το DNA εκμαγείο, τους εκκινητές, dNTPs, DNA πολυμεράση, MgCl<sub>2</sub> και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

#### 5.2.15.A Σχεδιασμός εκκινητών

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το γονίδιο DCX και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το SRP14, καθώς η έκφρασή του δεν μεταβάλλεται στις συνθήκες του πειράματός μας. Σχεδιάστηκαν τέσσερα ζεύγη εκκινητών: α) DCXs (sense), β) DCXa (antisense), γ) SRP14s και δ) SRP14a. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του κάθε γονιδίου και οι περιοχές που ενισχύθηκαν βρίσκονται εντός της κωδικής περιοχής των γονιδίων και περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα ιντρόνιο. Οι εκκινητές sense έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία με την νοηματική αλυσίδα και είναι συμπληρωματικοί της αντινοηματικής αλυσίδας, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους εκκινητές antisense. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θέσεις που προσδένονται πάνω στο γονίδιο περιγράφονται στην παράγραφο 5.1.7.



### 5.2.15.B Σύσταση μίγματος αντίδρασης και πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή για τα διάφορα ζεύγη εκκινητών

Το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Αρχική μετουσίωση του DNA στους 94°C για 3min.
2. 30 κύκλους αποτελούμενους από τρία βήματα ο καθένας:
  - i. μετουσίωση στους 94°C για 20sec
  - ii. πρόσδεση των εκκινητών στους 60°C για 20sec
  - iii. επιμήκυνση στους 72°C για 45sec
3. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2min.

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR περιγράφεται στον πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2: Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR**

Αντιδραστήριο	Όγκος
Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	33,4μl
5x buffer με MgCl <sub>2</sub> (1x)	13μl
dNTPs (0,2 mM)	0,4μl
Εκκινητής Sense (s) (0,4μM)	1μl
Εκκινητής Antisense (a) (0,4μM)	1μl
Υπόστρωμα DNA	1μl *
Taq DNA Polymerase (1U)	0,2μl
Τελικός όγκος	50μl

\* Οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι αντιστοιχούν σε ποσότητα 37,5ng.

### 5.2.16 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Q-PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου, μπορεί να ονομαστεί και ποσοτική PCR (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR). Οι περιορισμοί που έθετε η απλή PCR κάμφθηκαν το 1992 με την ανάπτυξη της Q-PCR από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Από την ανακάλυψή της μέχρι και σήμερα, η PCR έχει γνωρίσει μεγάλη άνθιση αλλά και βελτίωση με την Q-PCR.

Στην απλή PCR μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην Q-PCR όμως, η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της πορείας της αντίδρασης. Πρόκειται δηλαδή για μια τεχνική στην οποία γίνεται συλλογή πληροφοριών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της PCR, και έτσι συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση σε ένα στάδιο. Οι πραγματικού χρόνου αντιδράσεις εκτελούνται σε θερμοκυκλοποιητή ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού ενός μορίου-ανιχνευτή. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση ειδικών χημικών αντιδραστηρίων τα οποία φθορίζουν ανάλογα με τη συγκέντρωση του PCR προϊόντος.

Επειδή οι επιθυμητές αλληλουχίες ανιχνεύονται καθώς πολλαπλασιάζονται δεν χρειάζεται να αφαιρεθούν ποσότητες του προϊόντος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντί για αυτό, το μηχάνημα απεικονίζει το ρυθμό της συσσώρευσης του πολλαπλασιαζόμενου DNA καθώς η αντίδραση εξελίσσεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση των προς πολλαπλασιασμό αλληλουχιών στο μίγμα της αντίδρασης τόσο λιγότεροι είναι οι κύκλοι που απαιτούνται για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη παραγωγή του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος (Sambrook et al., 2001).

Για την κατανόηση της τεχνικής Q-PCR πρέπει να γίνει αναφορά στην τιμή Ct και στις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται.

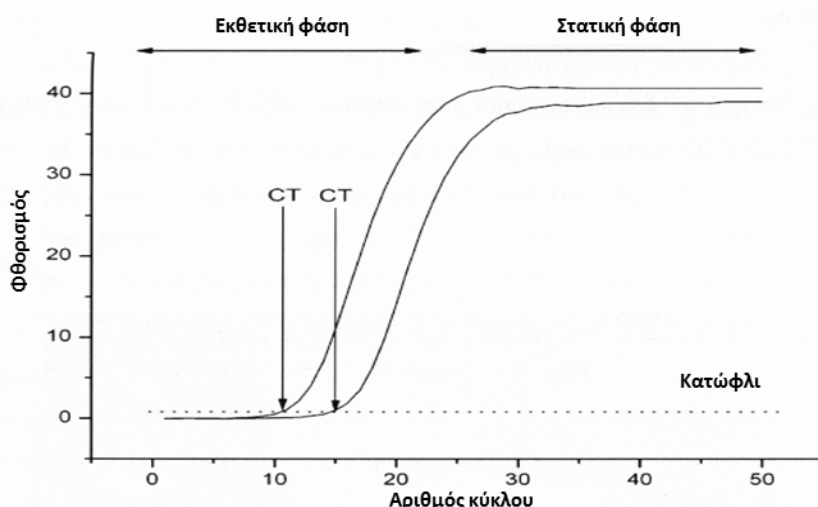
#### 5.2.16.A Η τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου)

Η βασική πορεία σε μια PCR μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική φάση: Συμβαίνει ο διπλασιασμός του προϊόντος σε κάθε κύκλο (υποθέτουμε 100% απόδοση σε κάθε προϊόν). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής.

- Γραμμική φάση (Υψηλή Μεταβλητότητα): Τα αντιδρώντα συστατικά αρχίζουν να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται, πλησιάζοντας στη φάση κορεσμού και δεν λαμβάνονται πλέον τα επιθυμητά προϊόντα.
- Στατική φάση (Τελικό-Σημείο): Χρήση της πηκτικής αναρόζης για παραδοσιακές μεθόδους): Η αντίδραση έχει παύσει και δεν παράγονται άλλα προϊόντα.

Στα αρχικά στάδια των κύκλων το σήμα είναι ασθενές και δεν μπορεί να καταγραφεί (είναι μικρότερο του υποβάθρου, δηλαδή του ορίου ανίχνευσης). Καθώς η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται, η ανίχνευση του σήματος εξελίσσεται εκθετικά. Σταδιακά όμως, παύει να αυξάνεται άλλο και έτσι έχουμε κορεσμό (εικόνα 3.6). Σε ένα τυπικό πείραμα Q-PCR όλες οι καμπύλες φτάνουν σε κορεσμό στο ίδιο επίπεδο. Έτσι, οι μετρήσεις στο τελικό σημείο (στατική φάση) δεν μας πληροφορούν για τις αρχικές ποσότητες των μορίων cDNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και τα οποία αντιστοιχούν στα επίπεδα RNA που περιέχονται στα δείγματα. Το μόνο που διαχωρίζουν είναι το αρνητικό από το θετικό δείγμα. Ωστόσο, οι καμπύλες των αντιστοιχών δειγμάτων διαχωρίζονται στη φάση ανάπτυξης της αντίδρασης, γεγονός που αντανακλά τις διαφορετικές αρχικές ποσότητες (Kubista et al., 2006). Το σημείο του χρόνου ή ο κύκλος όπου ανιχνεύεται για πρώτη φορά το τμήμα που ενισχύεται, ονομάζεται τιμή Ct (threshold cycle). Είναι ο χρόνος στον οποίο η ένταση του φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό του υποβάθρου. Συνεπώς, όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί μια σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, που σημαίνει ένα χαμηλό Ct (Εικόνα 3.6) (Wong et al., 2005).



Εικόνα 5.6: Γραφικές παραστάσεις στις οποίες φαίνεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης.

#### **5.2.16.B Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR**

Οι μεταβολές στην συγκέντρωση του DNA ανιχνεύονται με τη χρήση ειδικών μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτό και έχουν ιδιότητες φθορισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές που εισχωρούν στη διπλή έλικα του DNA. Αυτές οι χρωστικές φθορίζουν λίγο όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα του δείγματος (μη δεσμευμένες), ενώ αρχίζουν να φθορίζουν έντονα όταν συνδέονται σε διπλή έλικα DNA και εκτίθενται σε ένα κατάλληλο μήκος κύματος φωτός. Έτσι, όσο ο αριθμός των αντιγράφων του DNA αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός (Wong et al., 2005, Kubista et al, 2006).

Υπάρχουν διάφορες φθορίζουσες ουσίες όπως BEBO, BOXTO, Eva Green® με πιο γνωστή τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων μας.

### 5.2.16.Γ Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR έχουν τελικό όγκο 10 μl και περιέχουν: το προς πολλαπλασιασμό DNA, τους εκκινητές και ποσότητα έτοιμου μίγματος του εμπορίου (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit) που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την τέλεση της αντίδρασης (KAPA SYBR® DNA Polymerase, χρωστική SYBR® Green I, MgCl<sub>2</sub> και dNTPs). Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O. Η σύσταση του μίγματος και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή αναφέρονται στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3: Σύσταση μίγματος Q-PCR και πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

A/A	Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή	Σύσταση μίγματος αντίδρασης
1	95°C για 3min	1 – 4,8μl DNA (<10 ng)
2	95°C για 10sec (αποδιάταξη του DNA)	0,1 μl απ' τον εκκινητή Sense (200 nM)
3	60°C για 1min (υβριδισμός των εκκινητών στο DNA)	0,1 μl απ' τον εκκινητή Antisense (200 nM)
4	Ανάγνωση της πλακέτας	5 μl του έτοιμου μίγματος αντιδραστηρίων που περιέχουν και τη χρωστική SYBR Green I
5	Επανάληψη των σταδίων 2 έως 4 για 40 κύκλους	0 – 3,8μl ddH <sub>2</sub> O
6	Δημιουργία καμπύλης τήξης από 50°C έως 90°C με ανάγνωση 0,5°C κάθε 5sec	Τελικός όγκος: 10 μl

Για την ανωτέρω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ειδικός θερμοκυκλοποιητής για QPCR, ο οποίος περιγράφεται στην παράγραφο 5.1.9.

### **5.2.17 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα**

Η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα RIPA της εταιρίας Cell Signaling. Η συγκεκριμένη διαδικασία συνίσταται απ' τα ακόλουθα στάδια:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων στο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας μια φορά με PBS.
2. Προσθήκη 400μl διαλύματος RIPA 1x (για πιάτο 10cm) στο οποίο έχει προστεθεί μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (1:100).
3. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (cell scraper) σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.
5. Πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 4sec, με εναλλάξ 0,5sec θραύση και 0,5sec παγόλουτρο και ένταση 30%.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g για 10min, στους 4°C.
7. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιλαμβάνει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και αποθηκεύεται στους -20°C.

### **5.2.18 Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (διάλυμα Bradford) που περιέχει την παραπάνω χρωστική και με το οποίο ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Πραγματοποιείται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2.5ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25μg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60sec και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα έως 40μl δείγματος επαναιωρείται σε 2.5ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60sec και φωτομετρείται στα 595nm.

### **5.2.19 Ανοσοαποτύπωση (Western blot)**

Η ανοσοαποτύπωση (ή αλλιώς Western blot) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

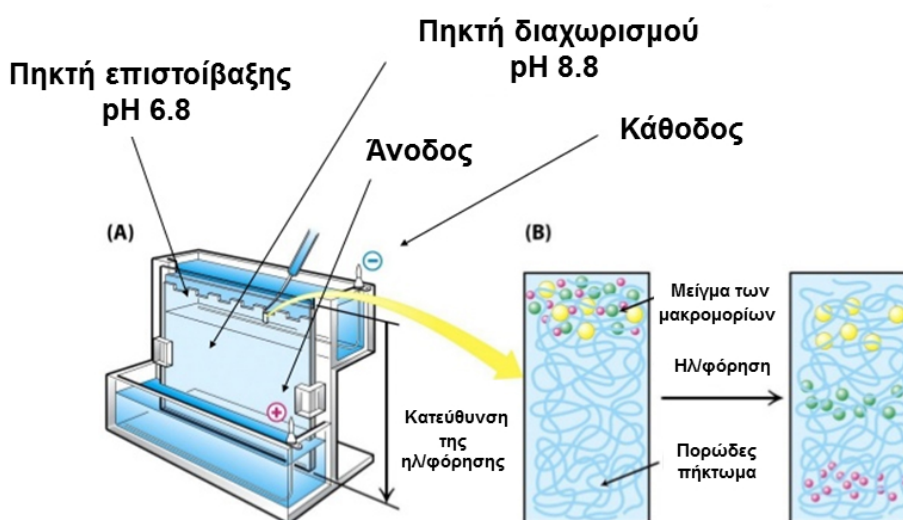
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου.
- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα.
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών.

#### **5.2.19.A Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου (Sambrook et al., 2001)**

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως Π.χ. N- ή O-γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί η πηκτή. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω της πηκτής επιστοίβαξης (stacking) η οποία είναι αρκετά πορώδης, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού (separating).

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στην πηκτή επιστοίβαξης σχηματίζουν ένα προπορευμένο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπίδια στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH της πηκτής ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στην πηκτή διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στην πηκτή διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος τους (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 5.7: Τα βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE (Τροποποίηση από [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)).



Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine) κατά την παρασκευή των πηκτών επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το APS (Υπερθειικό αμμώνιο), Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηκτών εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

1. Στήνεται κατάλληλα η συσκευή γυάλινων πλακών που θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή.
2. Κατασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού στην κατάλληλη πυκνότητα (Βλέπε πίνακα 3.4).
3. Το μείγμα τοποθετείται πολύ γρήγορα στο σύστημα των γυάλινων πλακών και στην επιφάνεια του προστίθεται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμιση του υγρού.
4. Το πήκτωμα αφήνεται περίπου 20min για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του.
5. Κατασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4%.
6. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με H<sub>2</sub>O και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης στο σύστημα των γυάλινων πλακών.
7. Τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών και αφήνεται 15min να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του. Σε αυτό το στάδιο, το πήκτωμα μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C ή να χρησιμοποιηθεί την ίδια ημέρα μετά το πέρας τουλάχιστον 45min.
8. Η συσκευή με το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
9. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
10. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρησή τους σε διάλυμα 1x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Laemmli)

11. Αφαιρείται το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοίβαξης και φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτή, με τελικό όγκο 24μl.
  12. Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (μάρτυρας μοριακών βαρών), έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.
  13. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 - 150Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος την πηκτή.
- Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για τις πηκτές διαχωρισμού και επιστοίβαξης περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 5.4: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE**

<b>Πηκτή διαχωρισμού (separating)</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%</b>
Acryl:bis (29:1)	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml	0.67ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	
1M Tris pH 6.8					0,5ml
H <sub>2</sub> O (υπερκάθαρο)	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml	2.7ml
10 % SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
10 % APS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
TEMED	6μl	4μl	4μl	4μl	4 μl
<b>Τελικός όγκος</b>	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

#### **5.2.19.B Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση και αρχίζει η διαδικασία της υγρής μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) H<sub>2</sub>O.

2. 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 διηθητικά χαρτιά Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.
3. Τοποθετούνται στη συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω τα εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αλλά 2 χαρτιά Whatman και τέλος ακόμη 1 «σφουγγαράκι».
4. Η συσκευή συναρμολογείται, μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου διαλύματος υγρής μεταφοράς.
5. Ξεκινά η μεταφορά των πρωτεϊνών, σε χαμηλή θερμοκρασία, στα 200mA για  $1^{1/2}$  –  $4^{1/2}$  ώρες, ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς μεταφορά πρωτεϊνών.

#### **5.2.19.Γ Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών**

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται με εκείνα τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (Blocking). Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει στη μεμβράνη όλες τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης των αντισωμάτων αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο αυτές στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
2. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
3. Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα TBS-T + BSA, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4oC (Binding).
4. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
5. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα γάλακτος, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (Binding).
6. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το kit: Lumilight western blotting Substrate, της εταιρίας Roche. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Επώαση της μεμβράνης με 700μl από το κάθε διάλυμα εμφάνισης του kit για 5min, μακριά απ' το πολύ φως.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα στην κασέτα εμφάνισης.
3. Μετάβαση στο σκοτεινό θάλαμο και τοποθέτηση ενός φωτογραφικού φιλμ πάνω στην μεμβράνη για 1-15 min.
4. Εμφάνιση του φιλμ σε ειδικό μηχάνημα.
5. Μετά το πέρας της διαδικασίας η μεμβράνη στεγνώνεται και διατηρείται στους -20°C.

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

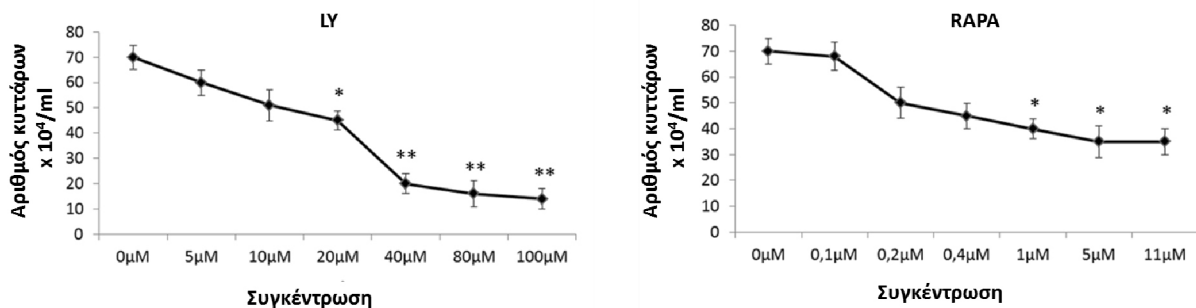
### 6.1 Επιλογή του κυτταρικού μοντέλου

Ως κύριο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε η νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά ποντικού, Neuro2A η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την μελέτη βασικών χαρακτηριστικών τόσο των καρκινικών κυττάρων όσο και των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Τέτοιου είδους χαρακτηριστικά είναι η νευρική διαφοροποίηση, η ανάπτυξη του νευρικού άξονα, ο πολλαπλασιασμός των νευροβλαστωματικών κυττάρων καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες (Van der Valk 1991, Bamberger et al., 1995, Tremblay et al., 2010).

Αρκετά από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα Neuro2A πραγματοποιήθηκαν παράλληλα και στην αντίστοιχη ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y καθώς και στα νευρικά βλαστικά κύτταρα HCN (παράγραφος 5.1.5). Αξίζει να σημειωθεί τα κύτταρα Neuro2A όπως και τα SH-SY5Y χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση N-MYC (Weisburger 1989), ανήκουν δηλαδή στα νευροβλαστώματα σταδίου 1 ή 2.

### 6.2 Επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης των αναστολέων και έλεγχος της επίδρασής τους στο μονοπάτι PI3k – mTOR

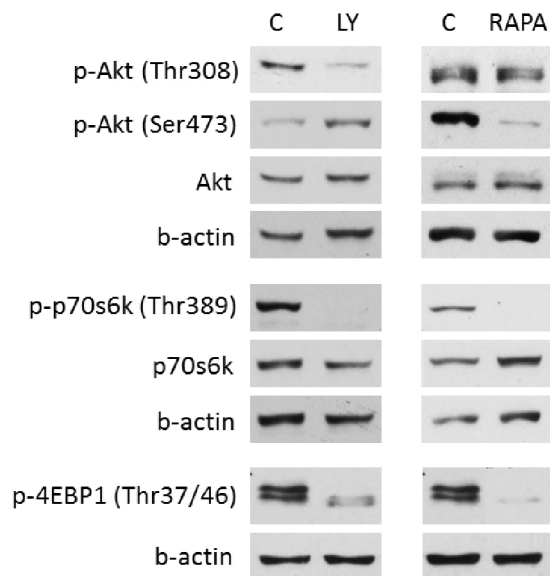
Για την αναστολή του μονοπατιού PI3k – mTOR – p70s6k χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι αναστολείς LY294002 και RAPA. Αρχικά έπρεπε να επιλεγθεί η κατάλληλη συγκέντρωση για κάθε έναν από τους αναστολείς στο πειραματικό μας μοντέλο. Το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν καθορίστηκε από τη βιβλιογραφία (Ertmer et al., 2007, Graham et al., 2006, Reiske et al., 2010, Zeng et al., 2008). Η κατάλληλη συγκέντρωση κάθε φαρμάκου επιλέχτηκε με βάση την αναστολή που προκαλεί στον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 6.1) χωρίς να επάγει κυτταρικό θάνατο. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 40μM LY και 1μM RAPA.



**Εικόνα 6.1: Απεικόνιση του αριθμού των κυττάρων Neuro2A παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων LY και RAPA για 3 ημέρες.** Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για τα επόμενα πειράματα είναι 40μM LY και 1μM RAPA. Έχουν πραγματοποιηθεί τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και στην ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά, SH-SY5Y.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση που έχει η παρουσία των παραπάνω αναστολέων για 3 ημέρες στα μονοπάτια PI3k και mTOR. Γι αυτό το σκοπό μελετήθηκαν οι μεταβολές των επιπέδων φωσφορυλίωσης βασικών μορίων – στόχων της PI3k, όπως της κινάσης Akt στα κατάλοιπα Thr308 και Ser473, καθώς και των κοινών στόχων της PI3k και του mTOR όπως είναι οι πρωτεΐνες p70s6k και 4EBP1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.2, το LY, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση, αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k καθώς εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της Akt στη Thr308, καθώς και τους στόχους του mTORC1: p70s6k και 4EBP1. Επίσης, παρατηρείται αύξηση στη p-Akt (Ser473) λόγω καταστολής του συμπλόκου mTORC1, το οποίο, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.3, όταν είναι ενεργό παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της Akt στη Ser473 καθώς διατηρεί σε χαμηλά επίπεδα τη δημιουργία του συμπλόκου mTORC2. Το ίδιο κατασταλτική είναι και η επίδραση της RAPA στο μονοπάτι mTOR καθώς αποτρέπει την φωσφορυλίωση των στόχων του mTORC1: p70s6k και 4EBP1 και τη φωσφορυλίωση της Akt στη Ser473 η οποία διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο mTORC2. Όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή, Παράγραφος 3.5.2, η παρουσία RAPA για μικρό χρονικό διάστημα αναστέλλει τη δημιουργία και τη δράση μόνο του συμπλόκου mTORC1, το οποίο είναι πιο ευαίσθητο στη RAPA. Η χορήγησή της όμως για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όπως στο σύστημά μας, καταστέλλει τη δράση και του συμπλόκου mTORC2. Επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο η RAPA δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308, καθώς η συγκεκριμένη τροποποίηση πραγματοποιείται από την PDK1 και

ελέγχεται από την PI3k, μόρια που πιθανότατα δεν επηρεάζονται από τη RAPA στο σύστημά.



**Εικόνα 6.2:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου παρουσιάζονται οι μεταβολές στη φωσφορυλίωση μορίων – στόχων των μονοπατιών PI3k – mTOR παρουσία των αναστολέων LY και RAPA για 3 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Απεικονίζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

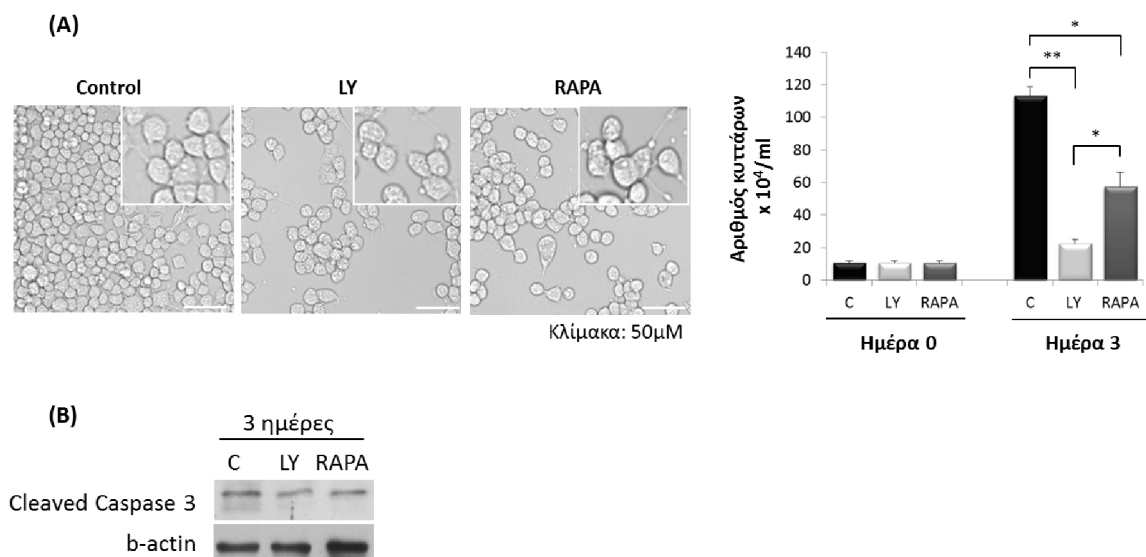
### 6.3 Η παρουσία LY και RAPA μειώνει τον αριθμό των κυττάρων Neuro2A, επηρεάζοντας με διαφορετικό τρόπο τον πολλαπλασιασμό και την μορφολογία τους

#### 6.3.1 Επίδραση των αναστολέων στον πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία των κυττάρων

Επόμενο βήμα ήταν να συγκριθεί ο βαθμός αναστολής του πολλαπλασιασμού που επάγεται από τα δυο φάρμακα και η επίδρασή τους στη μορφολογία των κυττάρων. Γι αυτό το σκοπό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο παρουσία ή απουσία των αναστολέων αρχικά για αρκετά διαστήματα παρακολούθησης (3, 5, 7 και 10 ημέρες). Για την περιγραφή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται μόνο τα διαστήματα των 3 και 5 ημερών καθώς ήδη από τις 3 ημέρες η επίδραση των φαρμάκων στον πολλαπλασιασμό είναι ξεκάθαρη και σταθερή και στις 5 ημέρες παίρνουν την μέγιστη τιμή συγκεκριμένες επιδράσεις των φαρμάκων που συζητούνται στα επόμενα κεφάλαια.

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έδειξε ότι το LY αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από ότι η ραπαμυκίνη καθώς 3 ημέρες μετά τη χορήγησή του ο αριθμός των κυττάρων είναι υπο-πενταπλάσιος σε σχέση με το δείγμα

ελέγχου (control), ενώ παρουσία ραπαμυκίνης ο αριθμός των κυττάρων είναι υποδιπλάσιος (Εικόνα 6.3.A). Η μικροσκοπική παρατήρηση αποκάλυψε ότι παρουσία LY αλλάζει η μορφολογία των κυττάρων Neuro2A καθώς δεν σχηματίζουν πλέον νευρίτες, γεγονός που σημαίνει ότι αποκόπτεται η επικοινωνία τους με τα γειτονικά κύτταρα. Αντιθέτως, η ραπαμυκίνη δεν οδηγεί σε κάποια μορφολογική μεταβολή και αποτελεί την πρώτη διαφορά μεταξύ των δύο φαρμάκων (Εικόνα 6.3.A).



**Εικόνα 6.3: Και οι δυο αναστολείς ασκούν ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να οδηγούν σε απόπτωση.** (A) (Αριστερά) Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων Neuro2A παρουσία ή απουσία των αναστολέων για 3 ημέρες. Στις μεγεθυμένες εικόνες απεικονίζεται η απουσία νευριτών μετά από LY. (Δεξιά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων στις διαφορετικές συνθήκες του μέρους A.. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 (cleaved caspase 3) παρουσία των αναστολέων για 3 ημέρες. Η ενεργότητά της ανιχνεύεται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και στην ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά, SH-SY5Y καθώς και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

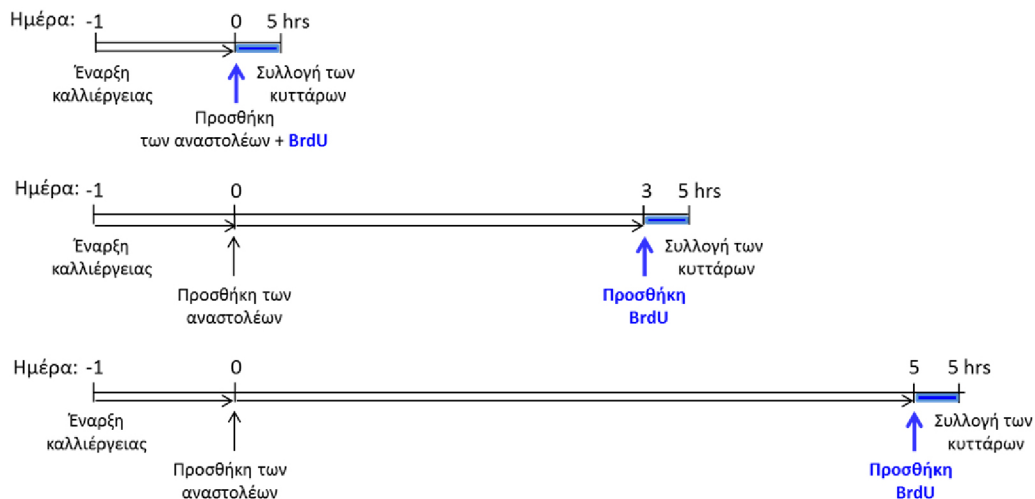
Η αναστολή του πολλαπλασιασμού δεν συνοδεύτηκε από απόπτωση σε καμία από τις δυο περιπτώσεις αφού δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της ενεργοποιημένης προαποπτωτικής πρωτεΐνης κασπάσης 3 (cleaved caspase 3) όπως φαίνεται στην εικόνα 6.3.B. Η κασπάση 3 αποτελεί ένα από τα βασικά μόρια της απόπτωσης καθώς απ' τη μια ενεργοποιεί κι άλλες κασπάσες κι απ' την άλλη επάγει την πρωτεολυτική αποικοδόμηση διαφόρων πρωτεϊνών (Fernandes-Alnemri et al. 1994).

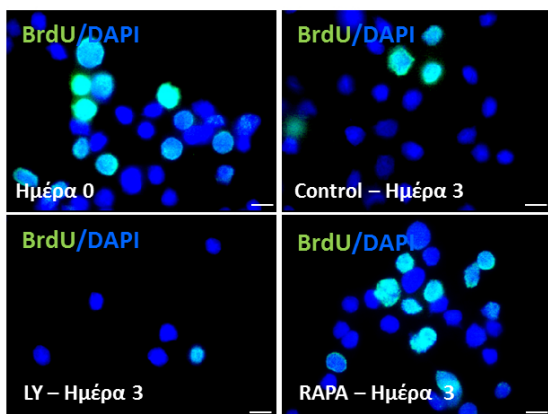


### 6.3.2 Το ποσοστό των κυττάρων που ενσωματώνουν BrdU διαφέρει μεταξύ των αναστολέων

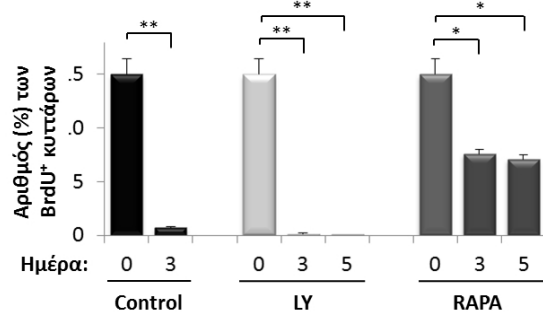
Όπως έχει προαναφερθεί (Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 5.2.11), ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μιας καλλιέργειας μπορεί να μελετηθεί με τη χρήση της 5'-βρωμο-2' δεοξουριδίνης (BrdU).

Η προσθήκη του BrdU πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα: ταυτόχρονα με τους αναστολείς, καθώς και 3 ή 5 ημέρες μετά την προσθήκη των αναστολέων, και διήρκησε για 5 ώρες, όπως παρουσιάζεται στο σχεδιάγραμμα της εικόνας 6.4. Το ποσοστό των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων είναι 15% την ημέρα που προστίθενται οι αναστολείς και μετά από 3 ημέρες μειώνεται στο 0,7% στην καλλιέργεια ελέγχου (λόγω της αύξησης του αριθμού των κυττάρων και κάλυψης της επιφάνειας του πιάτου) και στο 0,1% στην καλλιέργεια με το LY, επιβεβαιώνοντας την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ωστόσο παρουσία ραπαμυκίνης ο αριθμός των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων μειώνεται στο 7,6% 5 ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας, δηλαδή 10 φορές λιγότερο από την καλλιέργεια ελέγχου και 70 φορές λιγότερο από το LY (Εικόνα 6.4). Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τον μειωμένο αριθμό των κυττάρων παρουσία ραπαμυκίνης υποδηλώνει ότι η ραπαμυκίνη καθυστερεί τα κύτταρα στη φάση S ενώ δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο παρουσία LY.





Κλίμακα: 10µM

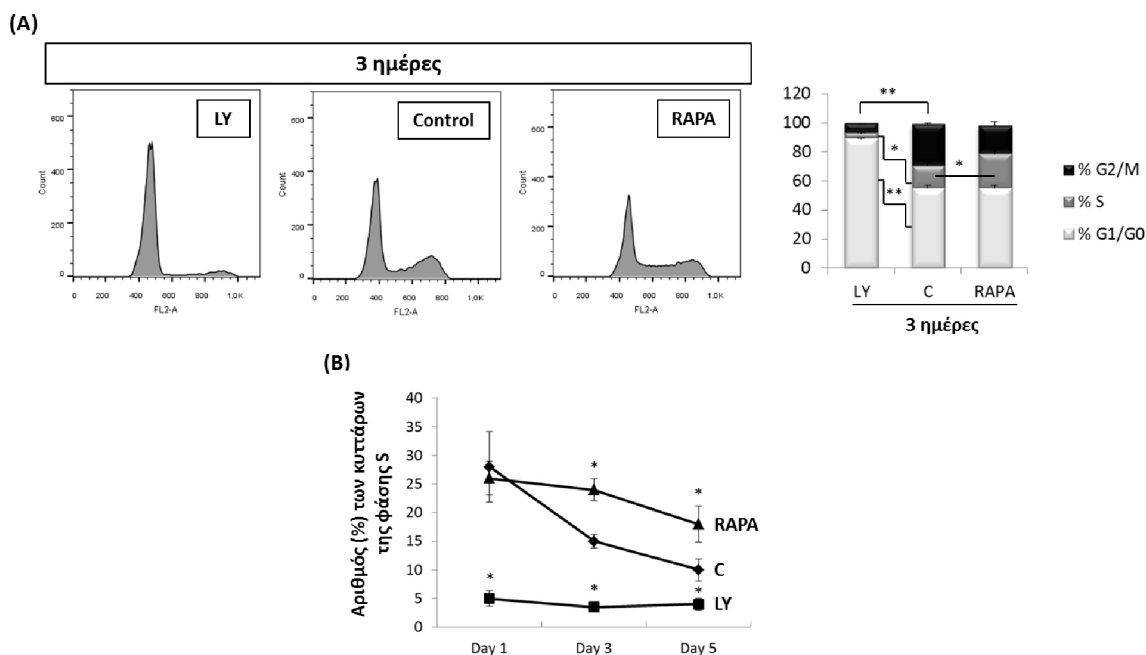


**Εικόνα 6.4:** Τα κύτταρα εξακολουθούν να ενσωματώνουν BrdU παρουσία RAPA. (Πάνω) Σχηματική απεικόνιση του τρόπου χρήσης του BrdU (40µM) και (κάτω αριστερά) απεικόνιση της έκφρασης της πρωτεΐνης BrdU παρουσία και απουσία των αναστολέων μέσω μικροσκοπίας TIRF. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 100x. (Κάτω δεξιά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις συνθήκες που περιγράφονται στο σχεδιάγραμμα. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

#### 6.4 Οι αναστολείς LY και RAPA επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τον κυτταρικό κύκλο των νευροβλαστωματικών κυττάρων

Αφού είδαμε ότι ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται παρουσία και των δυο αναστολέων (σε διαφορετικό βαθμό) αλλά στη RAPA αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που ενσωματώνουν BrdU ελέγξαμε εάν τα συγκεκριμένα φάρμακα οδηγούν σε αναστολή σε κάποια επιμέρους φάση του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής (ή ανάλυση FACS), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 5.2.9.

Η συγκεκριμένη ανάλυση αποκάλυψε ότι το LY αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G0/G1 (κύτταρα φάσης G0/G1: από 55% γίνονται 90%), ενώ παρουσία RAPA τα κύτταρα της φάσης S από 15% γίνονται 24%. Η αύξηση των κυττάρων στη φάση S σε συνδυασμό με την αύξηση του αριθμού των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων και τη μείωση του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρείται παρουσία RAPA αποτελούν ένδειξη ότι το συγκεκριμένο φάρμακο καθυστερεί τον κύκλο στη φάση S (ή και στην πρώιμη G2 η οποία επικαλύπτεται με την S στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής) (εικόνα 6.5.A).



**Εικόνα 6.5: Απεικόνιση των μεταβολών στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρουσία των αναστολέων LY και RAPA.** (A) Αριστερά: Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής παρουσία των αναστολέων LY και RAPA για 3 ημέρες στα κύτταρα Neuro2A και (δεξιά) ποσοτικοποίηση των διαγραμμάτων. (B) Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S παρουσία των αναστολέων για 1, 3, 5 ημέρες. (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Τα διαγράμματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

Η καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S γίνεται προοδευτικά παρουσία ραπαμυκίνης, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 6.5.B. Την πρώτη ημέρα το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S είναι κατά 7% μικρότερο σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου, ενώ την 3 ημέρα η σχέση αντιστρέφεται καθώς παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων της φάσης S παρουσία ραπαμυκίνης στις 9 ποσοστιαίες μονάδες παραπάνω από την καλλιέργεια ελέγχου (control), μια διαφορά που διατηρείται και στις 5 ημέρες.

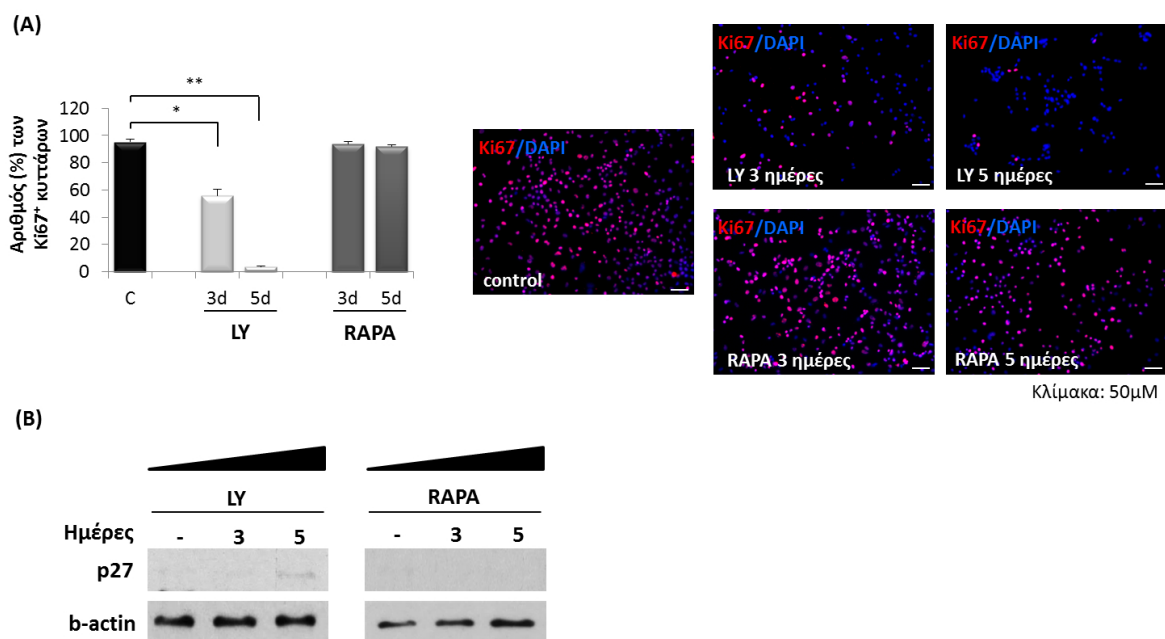
## 6.5 Η παρουσία του LY οδηγεί τα κύτταρα σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0 (G0-like)

Παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα παρουσία LY σταματούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1, ενώ παρουσία ραπαμυκίνης αυξάνονται τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S (1,6 φορές) και μειώνονται εκείνα της μίτωσης. Για να χαρακτηρίσουμε καλύτερα

τη φάση στην οποία σταματούν τα κύτταρα παρουσία των αναστολέων ελέγξαμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια μόρια – κλειδιά του κυτταρικού κύκλου.

Για να διαπιστώσουμε εάν το LY οδηγεί τα κύτταρα εκτός του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0 ή αναστέλλει τον κύκλο στη φάση G1, ελέγξαμε την έκφραση δυο πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη φάση G0. Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο Εισαγωγή, Παράγραφος 3.7.2, η πρωτεΐνη Ki67 αποτελεί ένα μόριο – δείκτη του πολλαπλασιασμού καθώς εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη φάση G0 (Gerdes, et al., 1991). Είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη και η κατανομή της αλλάζει ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου (Scholzen et al., 2000). Η πρωτεΐνη p27 ανήκει στην οικογένεια των Cip/Kip αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Αναστέλλει τη μετάβαση στη φάση G1 και αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού (Coqueret 2003). Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του επάγεται στη φάση αδράνειας (quiescence ή G0) και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση αυτής της φάσης (Oesterle et al., 2011).

Η χρήση ειδικών αντισωμάτων για τις παραπάνω πρωτεΐνες αποκάλυψε ότι παρουσία LY μειώνεται προοδευτικά ο αριθμός των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων καθώς υποδιπλασιάζεται στις 3 ημέρες και μειώνεται πάνω από 25 φορές στις 5 ημέρες σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου (εικόνα 6.6.A). Αξίζει να σημειωθεί ότι η προοδευτική μείωση στον αριθμό των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων παρουσία LY δεν συνοδεύεται από περαιτέρω μείωση του αριθμού των συνολικών κυττάρων καθώς ο πολλαπλασιασμός έχει σταματήσει από την πρώτη ημέρα παρουσίας του LY και στη συνέχεια παραμένει σταθερός, χωρίς να παρατηρείται κυτταρικός θάνατος. Δηλαδή, παρουσία LY τα κύτταρα εξέρχονται ασυγχρόνιστα εκτός του κυτταρικού κύκλου. Η προοδευτική είσοδος στη φάση G0 κατά την παρουσία LY επιβεβαιώθηκε από την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p27, καθώς δεν εκφράζεται στην καλλιέργεια ελέγχου και στο δείγμα με LY για 3 ημέρες αλλά αρχίζει να φαίνεται στις 5 ημέρες παρουσίας του LY (εικόνα 6.6.B).

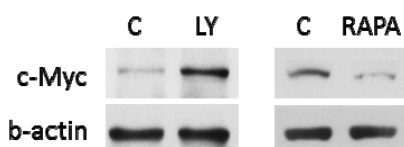


**Εικόνα 6.6:** Ο αναστολέας LY μεταβάλλει τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ki67 και p27, ενώ η RAPA δεν τα επηρεάζει. (A) Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης – δείκτη του πολλαπλασιασμού, Ki67. (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των Ki67+ κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων παρουσία των αναστολέων για 3 και 5 ημέρες (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της έκφρασης της πρωτεΐνης Ki67 παρουσία των αναστολέων. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 20x. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). (B) Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης – αναστολέα του πολλαπλασιασμού, p27. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 παρουσία των αναστολέων για 3 και 5 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Αντίθετα, η παρουσία RAPA δεν επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 (εικόνα 6.6.A) ούτε επάγει την έκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p27 (εικόνα 6.6.B). Αυτή η παρατήρηση αποτελεί ακόμη μια διαφορά μεταξύ των δυο φαρμάκων, καθώς το LY αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό οδηγώντας σταδιακά τα κύτταρα εκτός του κυτταρικού κύκλου, στη φάση G0, σε αντίθεση με τη RAPA όπου επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων διατηρώντας τον πληθυσμό εντός του κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης c-Myc, η οποία, όπως έχει προαναφερθεί στην Εισαγωγή, Παράγραφος 3.6, αποτελεί μια ογκοπρωτεΐνη η οποία επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη σε

καρκινικά κύτταρα. Έχει, συνδεθεί με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καθώς επάγει την έκφραση της κυκλίνης D1 και καταστέλλει την έκφραση την κυκλίνης A (Dang 1999). Η πτώση της έκφρασής της παρουσία ραπαμυκίνης (εικόνα 6.7) αντανακλά την επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού και πιθανότατα μπορεί να οδηγεί στην μείωση των επιπέδων κάποιων κυκλινών. Συμφωνεί με τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει πως η RAPA μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης c-myc καταστέλλοντας τη μετάφραση του mRNA της (Wall et al., 2008).



**Εικόνα 6.7: Ο LY και η RAPA επηρεάζουν με αντίθετο τρόπο την πρωτεϊνική έκφραση του ογκογονιδίου C-MYC.** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης c-Myc παρουσία και απουσία των αναστολέων για 5 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Παρουσιάζεται το ένα από τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Ωστόσο αντίθετα είναι τα αποτελέσματα στην περίπτωση του LY (εικόνα 6.7) καθώς παρατηρείται έντονη αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης c-Myc γεγονός που από τη μια έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία σε σχέση με την επίδραση του LY στην πρωτεΐνη c-Myc σε άλλες κυτταρικές σειρές (Tsai et al., 2012, Helbing et al., 1998), από την άλλη όμως υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Myc είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών βλαστικών κύτταρων τα όποια βρίσκονται στη φάση G0. Βοηθάει τα κύτταρα να εισέλθουν γρήγορα στον κυτταρικό κύκλο όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές, ενεργοποιώντας άμεσους στόχους όπως σύμπλοκα κυκλινών – κινασών και αναστέλλοντας τη δράση σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Wang et al., 2008, Tansey 2014). Αξίζει να σημειωθεί το γονίδιο c-MYC αποτελεί έναν από τους 4 παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων σε πρόδρομα πολυδύναμα κύτταρα - IPS (Wernig et al., 2007). Επιβεβαιώνεται δηλαδή ότι η παρουσία του LY οδηγεί προοδευτικά τα κύτταρα σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0.

## 6.6 Η παρουσία της RAPA επιβραδύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

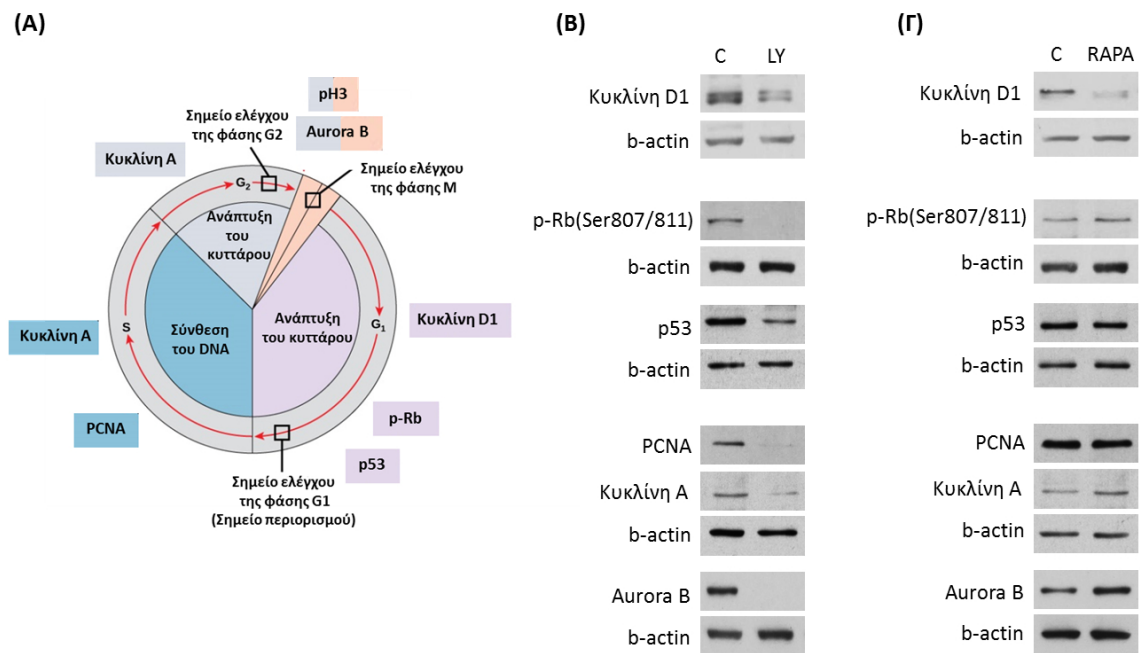
Λαμβάνοντας υπ' όψιν την καθυστέρηση στη φάση S και πιθανόν στη φάση G2, που προκαλεί η RAPA, επόμενος στόχος ήταν να χαρακτηριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια αυτή η επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου καθώς και η έξοδος απ τον κύκλο παρουσία LY μελετώντας την έκφραση μορίων ρυθμιστών της φάσης G1 (Cyclin D1, pRb, p53), της φάσης S (Cyclin A & PCNA) και της φάσης G2 /M (Aurora B).

Καταρχήν, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1 τόσο παρουσία LY όσο και παρουσία ραπαμυκίνης (εικόνα 6.8.B). Η μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1 παρουσία LY επιβεβαιώνει την παύση του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη, όπως έχει προαναφερθεί (Εισαγωγή, παράγραφος 3.7.3) ένας απ τους στόχους της κυκλίνης D1 είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, Rb, την οποία φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί. Η καταστολή της κυκλίνης D1 αποφωσφορυλιώνει και επάγει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rb, γεγονός που αποτελεί ακόμη ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων της φάσης G0 (Cobrinik 2005). Αυτός είναι και ο λόγος που η πρωτεΐνη Rb είναι αποφωσφορυλιωμένη παρουσία LY (εικόνα 6.8.B).

Επίσης, παρατηρήθηκε πτώση της έκφρασης του ογκοκαταστολέα p53, μια πρωτεΐνη που αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Γενικά, βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στο κύτταρο αλλά όταν ενεργοποιείται, ενεργοποιεί τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p21, για να σταματήσει τον κύκλο μετά τη φάση G1 δηλαδή πριν την αντιγραφή του DNA (Dolezalova et al., 2012). Η μείωση της έκφρασής αυτού του μορίου παρουσία LY είναι πιθανό να αντανακλάται στο γεγονός ότι στη φάση G0 το συγκεκριμένο μόριο δεν είναι απαραίτητο, έτσι το κύτταρο προσπαθώντας να αποταμιεύσει ενέργεια σταματά την γενική μεταφραστική δραστηριότητα ή/και αποικοδομεί μόρια όπως το p53.

Ακόμη, μελετήθηκε η έκφραση τριών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις φάσεις S και G2 όπως είναι το PCNA, η κυκλίνη A και η Aurora B. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο της Εισαγωγής, 3.7.5, το PCNA είναι απαραίτητο μόριο για την αντιγραφή του DNA καθώς αποτελεί συμπαράγοντα της DNA πολυμεράσης και διευκολύνει την επαφή της πολυμεράσης με την αλληλουχία-εκμαγείο. Εκφράζεται κυρίως στη φάση S, λιγότερο στις φάσεις G2 – M ενώ ελάχιστη είναι η έκφρασή του στη φάση G1 (Bolton et al., 1992). Η κυκλίνη A, όπως έχει προαναφερθεί (Εισαγωγή, παράγραφος 3.7.3), επάγει

την είσοδο στη φάση S (ως σύμπλοκο με την CDK2) και τη μετάβαση από τη G2 στην M (ως σύμπλοκο με τη CDK1). Η Aurora B είναι μια κινάση που ξεκινάει να εκφράζεται στο τέλος της φάσης G2, αυξάνεται στην πρόφαση με απόγειο της έκφρασής της στη μετάφαση όπου μετά αρχίζει να μειώνεται η έκφρασή της και καταλήγει στο ενδιάμεσο σώμα του διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων κατά την τελόφαση. Η συγκεκριμένη κινάση φωσφορυλιώνοντας στόχους όπως η ιστόνη H3 και η κινάση Plk1 ενεργοποιεί τη μετάβαση στην μίτωση (Adams et al., 2001). Όπως έχει προαναφερθεί (Εισαγωγή, παράγραφος 3.7.3), η Aurora αποτελεί εκτός των άλλων ένα από τα βασικά μόρια του σημείου ελέγχου της φάσης G2. Η μείωση της έκφρασής και των τριών πρωτεϊνών παρουσία LY επιβεβαιώνει το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού και την παύση του κυτταρικού κύκλου πριν τη φάση S (εικόνα 6.8.B).



**Εικόνα 6.8: Επίδραση των αναστολέων σε μόρια – κλειδιά του κυτταρικού κύκλου.** (A) Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και των βασικών ρυθμιστών του που περιγράφονται στο συγκεκριμένο πείραμα. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η έκφραση κυκλινών των φάσεων G1 (Cyclin D1) και S (Cyclin A) καθώς και μορίων που επάγουν την πρόοδο του κύκλου όπως PCNA, Aurora B αλλά και αρνητικών ρυθμιστών του κύκλου όπως Rb & p53, παρουσία των αναστολέων LY και (C) RAPA για 3 ημέρες. Ο συγκεκριμένος έλεγχος πραγματοποιήθηκε και στις 5 ημέρες και τα αποτελέσματα ήταν ίδια με εκείνα των 3 ημερών. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Παρουσιάζεται ένα από τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα. Η έκφραση των περισσότερων πρωτεϊνών ελέγχθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.



Σε αντίθεση με το LY, η RAPA αυξάνει ελαφρώς την έκφραση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Rb και δεν επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 (εικόνα 6.8.Γ). Ωστόσο, παρατηρείται μείωση στα επίπεδα της κυκλίνης D1. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκφραση της κυκλίνης D1 αυξάνεται στη φάση G1 αλλά πρέπει να μειωθεί στη φάση S για να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του DNA καθώς καταστέλλει τη λειτουργία μορίων όπως το PCNA. Στη συνέχεια αυξάνεται προς το τέλος της φάσης G2 και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της μίτωσης για να διασφαλιστεί η πρόοδος του κύκλου (Yang et al., 2006). Αφού ο κύκλος προχωρά παρουσία ραπαμυκίνης και δεν αναστέλλεται στη φάση G1, τα χαμηλά επίπεδα της κυκλίνης D1 αντανακλούν την επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου πριν ή και κατά τη διάρκεια της φάσης G2.

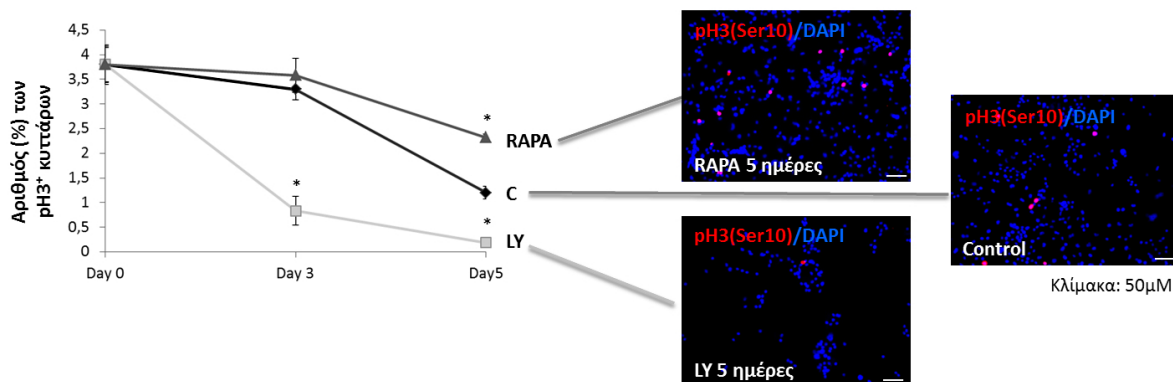
Σε αυτή την υπόθεση συνηγορεί και το γεγονός ότι τα επίπεδα του PCNA παραμένουν υψηλά παρουσία RAPA (δηλαδή η αντιγραφή του DNA προχωράει) και αυξάνεται η έκφραση της κυκλίνης A και της κινάσης Aurora, μορίων, που όπως προείπαμε, η έκφρασή τους είναι αυξημένη στη φάση G2 (εικόνα 6.8.Γ). Όπως προαναφέρθηκε η κυκλίνη A καταστέλλεται από την πρωτεΐνη c-Myc η οποία επάγει την έκφραση της κυκλίνης D1. Γι αυτό το λόγο είναι πιθανό η αναστολή της έκφρασης του ογκογονιδίου C-MYC παρουσία RAPA (παράγραφος 6.5) να συνδέεται με τα αυξημένα επίπεδα της κυκλίνης A και τη μειωμένη έκφραση της κυκλίνης D1.

## **6.7 Η RAPA καθυστερεί τα κύτταρα να περάσουν το σημείο ελέγχου της μίτωσης και να ολοκληρώσουν τον κυτταρικό κύκλο**

Ενώ για το LY το αποτέλεσμα είναι ξεκάθαρο ότι οδηγεί σε μια κατάσταση G0-like, για τη RAPA διαπιστώθηκε ότι μπλοκάρει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε τουλάχιστον δύο σημεία: κατά τη φάση S και στο τέλος της φάσης G2, όπως αυτό φαίνεται από τους αντίστοιχους δείκτες. Ακόμη, τα αντίθετα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για την Aurora B (αύξηση παρουσία RAPA και μείωση παρουσία LY) οδήγησαν σε μια πιο λεπτομερή ανάλυση της συμπεριφοράς της μελετώντας τους στόχους της όπως είναι η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 και ο αριθμός των ενδιάμεσων σωμάτων, βασικό συστατικό των οποίων είναι η Aurora B (Hu et al., 2012).

Η Aurora B φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στο κατάλοιπο Ser10, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και την έναρξη της

μίτωσης (Hsu et al., 2000). Η μελέτη της έκφρασης της pH3(Ser10) αποκάλυψε καταρχήν ότι ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων μειώνεται με το πέρασμα των ημερών στην καλλιέργεια ελέγχου (Εικόνα 6.9 αριστερά). Ωστόσο, η παρουσία RAPA καθυστερεί προοδευτικά αυτή τη μείωση, καθώς 5 ημέρες μετά τη χορήγησή της ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων είναι 2 φορές μεγαλύτερος από την καλλιέργεια ελέγχου (RAPA: 2,3% vs Control: 1,2%).



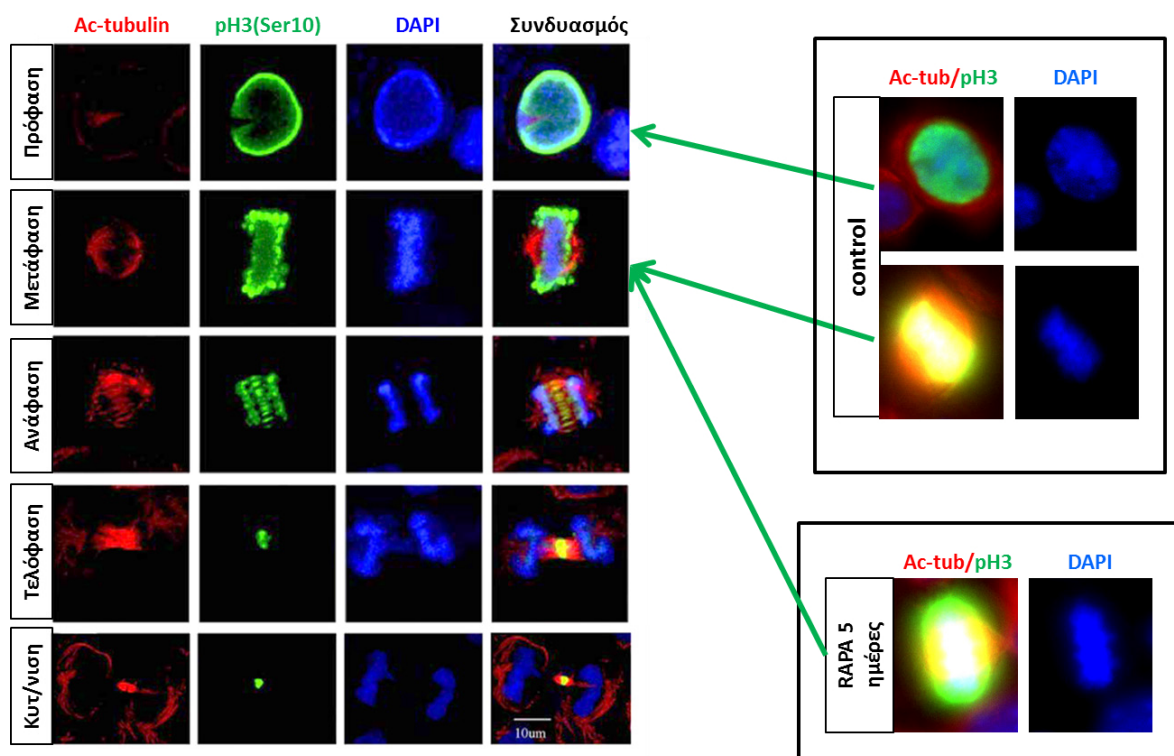
**Εικόνα 6.9: Μελέτη της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης H3 στη Ser10 η οποία χαρακτηρίζει την όψιμη φάση G2 και την έναρξη της μίτωσης.** (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των pH3<sup>+</sup> κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων πριν την προσθήκη των αναστολέων LY και RAPA καθώς και παρουσία των αναστολέων για 3 και 5 ημέρες (\* p < 0,05). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της έκφρασης της πρωτεΐνης pH3 παρουσία των αναστολέων από πειράματα ανοσοφθορισμού. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 20x. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Τα αποτελέσματα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Η συγκεκριμένη παρατήρηση θυμίζει την επίδραση της RAPA στην έκφραση της πρωτεΐνης BrdU (Εικόνα 6.5). Έτσι, η αύξηση των BrdU και pH3 γεγονότων σε συνδυασμό με την αύξηση της έκφρασης της κινάσης Aurora B (Εικόνα 6.8.B) οδηγεί στην υπόθεση ότι η RAPA καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο και σε ένα ακόμη σημείο, πριν την ολοκλήρωση της μετάφασης.

Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, πραγματοποιήθηκε μια πιο λεπτομερής μικροσκοπική παρατήρηση της έκφρασης της pH3(Ser10), σε συνδυασμό με την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη A (acetylated tubulin A) που είναι δείκτης της διαμόρφωσης του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της Aurora B και όπως φαίνεται στην εικόνα 6.10, η pH3 (ser10) αρχίζει να γίνεται αντιληπτή στο τέλος της φάσης G2 και στην

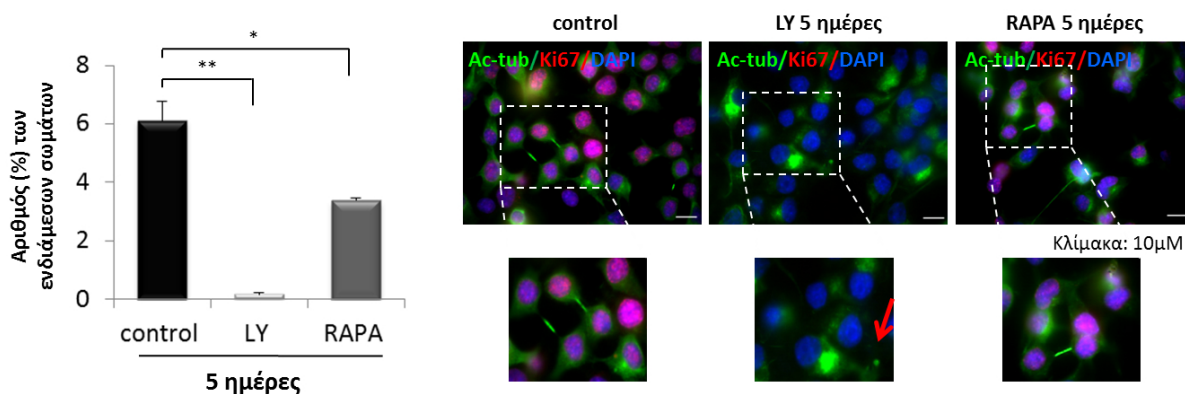
αρχή της πρόφασης. Στην μετάφαση όπου έχει σχηματιστεί η μιτωτική άτρακτος, παίρνει την μέγιστη της τιμή και βρίσκεται κυρίως στα άκρα της ενδιάμεσης πλάκας όπου συμπυκνώνονται τα χρωμοσώματα. Στην ανάφαση, όπου οι αδελφές χρωματίδες έχουν διαχωριστεί σε δυο πόλους, η pH3(Ser10) βρίσκεται ενδιάμεσα στους πόλους και στην τελόφαση εντοπίζεται πάνω στο ενδιάμεσο σώμα (midbody) που δημιουργεί η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (ac-tubulin). Όταν ολοκληρωθεί η κυτταροκίνηση βρίσκεται σε σύμπλοκο με την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη του ενδιάμεσου σώματος εκτός των θυγατρικών κυττάρων (LI et al., 2005).

Η πιο λεπτομερής μικροσκοπική παρατήρηση της έκφρασης της pH3 (Ser10) επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η παρουσία RAPA αυξάνει τον αριθμό των pH3<sup>+</sup> κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο της μετάφασης. Όσα κύτταρα είναι pH3<sup>+</sup> παρουσία RAPA παρουσιάζουν την χαρακτηριστική εικόνα μόνο της μεταφασικής pH3 που φαίνεται στην εικόνα 6.10 (RAPA), σε αντίθεση με την καλλιέργεια ελέγχου (control) όπου είναι εμφανείς και οι δυο ανιχνεύσιμες μορφές της pH3 (της πρόφασης και της μετάφασης).



Εικόνα 6.10. (Αριστερά) Απεικόνιση της κατανομής της pH3 (Ser10) και της acetylated-tubulin στις διάφορες φάσεις της μίτωσης και της κυτταροκίνησης (Τροποποίηση από: LI et al., 2005). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της κατανομής της pH3(Ser10) και της ac-tubulin παρουσία RAPA για 5 ημέρες καθώς και στην καλλιέργεια ελέγχου. Φακός 100x. Τεχνητό ζουμ: 3,6x.

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι τα κύτταρα σταματούν στο στάδιο της μετάφασης και δεν ολοκληρώνουν τον κύκλο, μετρήθηκε ο αριθμός των ενδιάμεσων σωμάτων (midbodies) παρουσία ή απουσία των αναστολέων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.11, τα ενδιάμεσα σώματα είναι δομές των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού που δημιουργούνται στο στάδιο της τελόφασης και της κυτταροκίνησης ως απόρροια ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου. Βασικό συστατικό αυτών των δομών είναι, εκτός από την Aurora B, η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη A. Η ακετυλίωση γίνεται σε 4 κάταλοιπα Lys40 από την ακετυλοτρανσφεράση NAT10, η οποία εντοπίζεται επίσης στα ενδιάμεσα σώματα (Shen et al., 2009). Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.11, ο αριθμός των ενδιάμεσων σωμάτων υποδιπλασιάζεται παρουσία RAPA σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου (Control: 6,1% vs RAPA: 3,3%) σε αντίθεση με τον αριθμό των pH3<sup>+</sup> κυττάρων που διπλασιάζεται (Εικόνα 6.9).



**Εικόνα 6.11: Μελέτη της δημιουργίας ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία LY και RAPA.** (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων (midbodies) παρουσία των αναστολέων για 5 ημέρες. Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία των αναστολέων. Η παρατήρησή τους επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης ειδικού αντισώματος για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (Ac-tub). Αξιοσημείωτη είναι η απουσία ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία LY η οποία συνοδεύεται από συγκέντρωση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε συγκεκριμένες περιοχές του κυτταροπλάσματος. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 100x. Τεχνητό ζουμ: 1,5x. (\*p < 0,05, \*\* p < 0,01). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

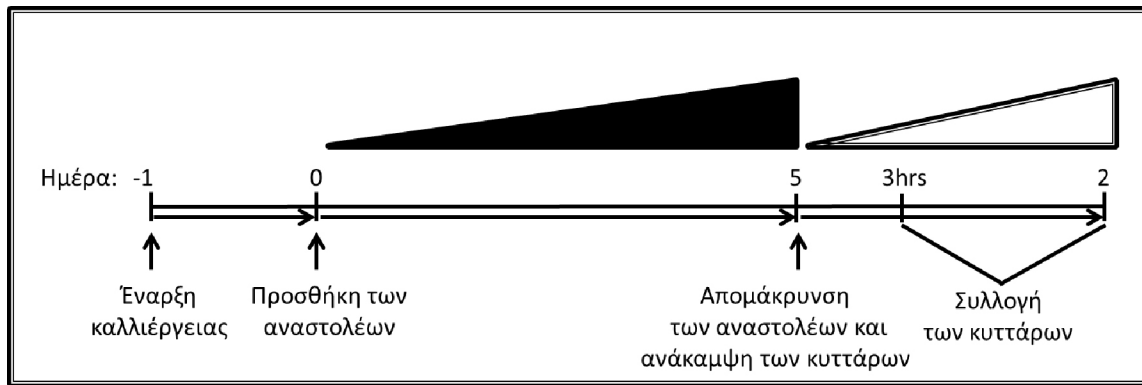
Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η RAPA καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο και εμποδίζει τα κύτταρα να περάσουν το σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου και να δημιουργηθούν τα ενδιάμεσα σώματα που είναι δείκτες ολοκλήρωσης του κύκλου.

Τέλος, σε αντίθεση με τη RAPA, έχει αποδειχτεί από τα προηγούμενα πειράματα ότι παρουσία LY ο κυτταρικός κύκλος σταματάει πολύ νωρίς, τα κύτταρα δεν περνούν το σημείο ελέγχου της φάσης G1 και εισέρχονται στη φάση G0. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την εξάλειψη των pH3 φιγούρων καθώς και των ενδιάμεσων σωμάτων (Εικόνες 6.9 και 6.11). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των κυττάρων παρουσία LY το οποίο τα διαφοροποιεί από την παρουσία RAPA είναι η κατανομή της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης και συνεπώς η οργάνωση του κυτταροσκελετού. Τα κύτταρα παρουσία LY είναι αφενός Ki67<sup>-</sup>, χωρίς την παρουσία ενδιάμεσων σωμάτων και αφετέρου παρουσιάζουν συγκεντρωμένη ακετυλιωμένη τουμπουλίνη σε συγκεκριμένες περιοχές του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 6.11 ζουμαρισμένες εικόνες). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ζυμομύκητα *Saccharomyces Cerevisiae* αποκάλυψαν ότι η είσοδος των κυττάρων στη φάση της αδράνειας (ή G0) συνοδεύεται από αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού, μια διαδικασία που κάνει τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στο στρες της συγκεκριμένης φάσης (Laporte et al., 2013). Η αναδιάρθρωση του κυτταροσκελετού και η συγκέντρωση της τουμπουλίνης παρουσία LY είναι πιθανό να αντανakλά την είσοδο των κυττάρων στη φάση G0 και την αποθήκευση βασικών πρωτεϊνών όπως είναι και εκείνες του κυτταροσκελετού. Έτσι, όταν το κύτταρο εξέλθει από τη συγκεκριμένη κατάσταση έχει τα απαραίτητα εφόδια για να ξεκινήσει τον κυτταρικό κύκλο.

## **6.8 Ανάκαμψη των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων**

Όπως προαναφέρθηκε, βασικός σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των αλλαγών που συμβαίνουν στη βιολογία των κυττάρων παρουσία των φαρμάκων αλλά και μετά την απομάκρυνση τους καθώς και ποια μονοπάτια μπορεί να σχετίζονται με την ανάκαμψη των καρκινικών κυττάρων μετά τη θεραπεία.

Αφού χαρακτηρίστηκαν τα βιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων παρουσία των αναστολέων, η μελέτη συνεχίστηκε με τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων. Προς αυτή την κατεύθυνση απομακρύνθηκαν οι αναστολείς LY και RAPA από το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν παρουσία θρεπτικών συστατικών (σχεδιάγραμμα εικόνας 4.11).

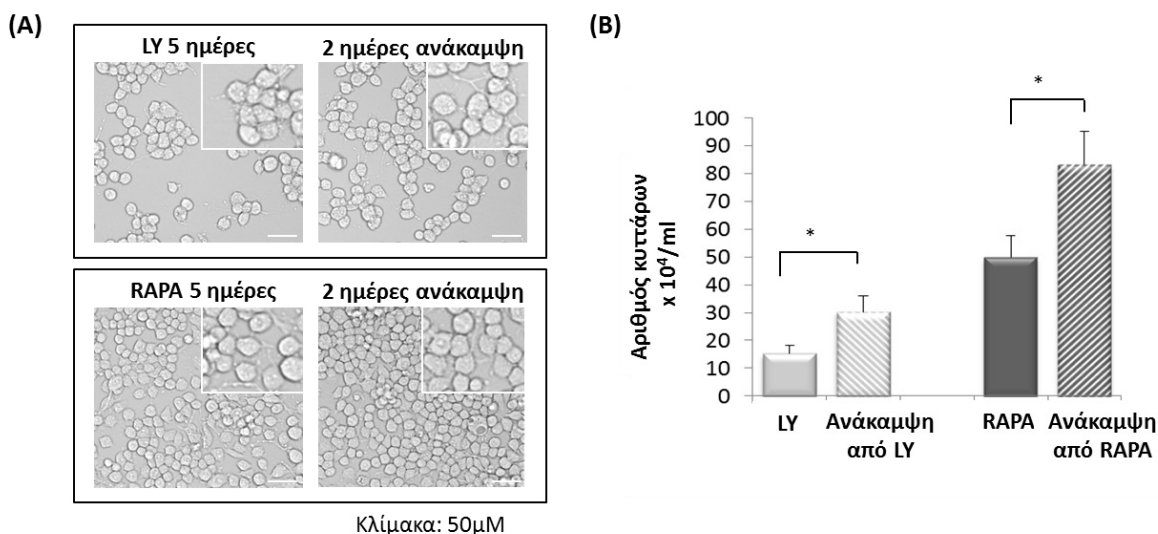


Εικόνα 6.12: Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια

Μελετήθηκε καταρχήν η ικανότητα των κυττάρων να εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο (στην περίπτωση του LY) και να συνεχίζουν κανονικά τον πολλαπλασιασμό (μετά από RAPA). Διερευνήθηκε, επίσης, αν υπάρχει μεταβολή σε άλλες ιδιότητες του κυττάρου όπως είναι η διαφοροποίηση καθώς και εάν ενεργοποιούνται ξανά τα μονοπάτια PI3k/Akt και mTOR που είχαν κατασταλεί. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση άλλων σηματοδοτήσεων, που γνωρίζουμε ότι αλληλεπιδρούν με τη σηματοδότηση Akt – mTOR, στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση των αναστολέων.

### 6.9 Η επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων στον αριθμό και τη μορφολογία των κυττάρων Neuro2A είναι αντιστρεπτή

Το πρώτο βήμα για να ελεγχθεί εάν ενεργοποιείται ο πολλαπλασιασμός μετά την απομάκρυνση των αναστολέων ήταν η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των κυττάρων 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση τόσο του LY όσο και της RAPA οι οποίοι υπήρχαν στην καλλιέργεια για 5 ημέρες. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των κυττάρων στην πρώτη περίπτωση διπλασιάστηκε και στη δεύτερη αυξήθηκε 1,7 φορές (Εικόνα 6.13). Επίσης, μετά την απομάκρυνση του LY τα κύτταρα απέκτησαν ξανά νευρίτες που σημαίνει ότι αποκαταστάθηκε η μορφολογία τους (Εικόνα 6.13.A μεγεθύνσεις).



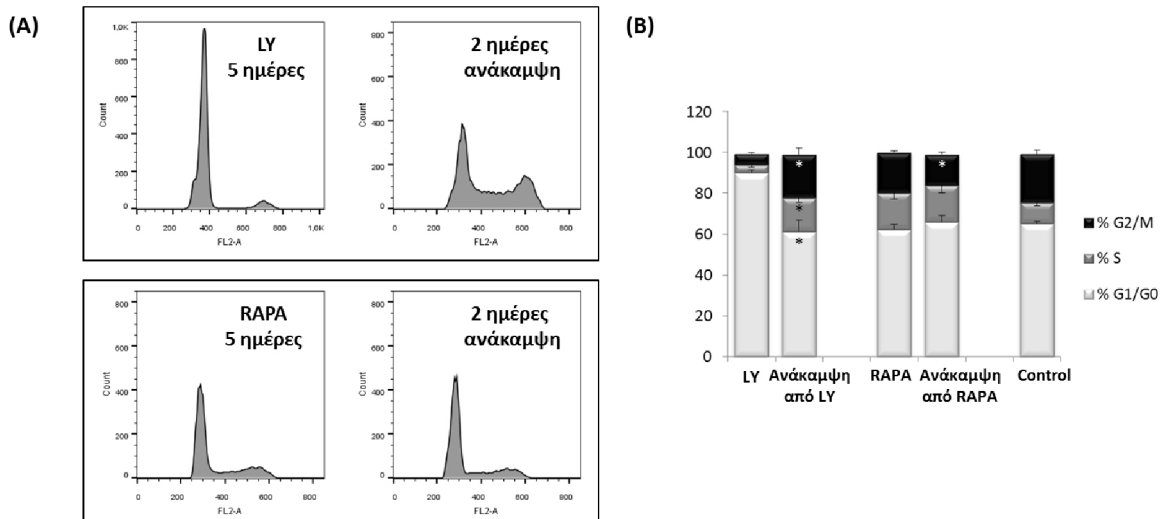
**Εικόνα 6.13: Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων συνεχίζεται μετά την απομάκρυνση των αναστολέων.**

(A) Απεικόνιση της καλλιέργειας των κυττάρων Neuro2A παρουσία των αναστολέων LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους. Στις μεγεθυμένες εικόνες απεικονίζεται η απουσία νευριτών παρουσία LY (και όχι παρουσία RAPA) και η επαναδημιουργία τους στην ανάκαμψη από LY. Φακός 20x. Τεχνητό ζουμ 4x. (B) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων στις συνθήκες του μέρους A (\*  $p < 0,05$ ). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

### 6.10 Η απομάκρυνση των αναστολέων επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τον κυτταρικό κύκλο των νευροβλαστωματικών κυττάρων

Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων μετά την απομάκρυνση του LY συνοδεύεται από την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και την έναρξη του πολλαπλασιασμού. Ο κυτταρικός κύκλος μετά την απομάκρυνση του LY επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα όπως φαίνεται στην εικόνα 6.14 (LY) καθώς μοιάζει με τον κύκλο της καλλιέργειας ελέγχου (C).

Μετά την απομάκρυνση της RAPA ο κύκλος προχωράει, ωστόσο, δεν επιστρέφει στην αρχική κατάσταση όπως συμβαίνει μετά την απομάκρυνση του LY. Ο αριθμός των κυττάρων της φάσης S παραμένει αυξημένος (18% σε σχέση με το 10% της φάσης S της καλλιέργειας ελέγχου) και αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που έχουν περάσει στη φάση G1 ενώ μειώνονται τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση M (ανάκαμψη από RAPA: 66% G0/G1 και 15% M, παρουσία RAPA: 62% G0/G1 και 20% M).



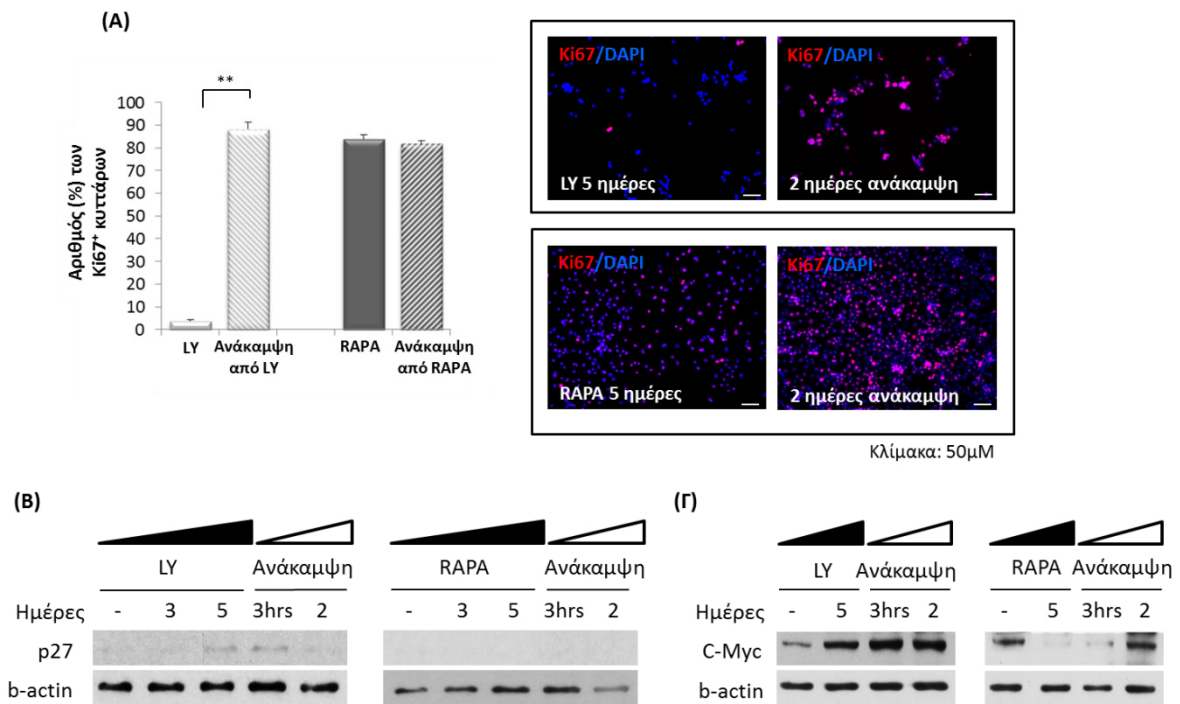
**Εικόνα 6.14:** Απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου παρουσία των αναστολέων καθώς και μετά την απομάκρυνσή τους. (Α) Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής (FACS) παρουσία των αναστολέων LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους. (Β) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων που περιγράφονται στο μέρος Α. (\*  $p < 0,05$ ). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

### 6.11 Οι μεταβολές των πρωτεϊνών δεικτών της φάσης G0 υποδηλώνουν την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο μετά την απομάκρυνση του LY και τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά τη RAPA

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την απομάκρυνση του LY τα κύτταρα εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και ξεκινάει ο πολλαπλασιασμός. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε από την αύξηση των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση του LY καθώς ο αριθμός τους αυξάνεται 24 φορές (LY:  $3,7 \pm 0,5 \rightarrow$  Release:  $88,3 \pm 3$  και επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 6.15.A). Προς αυτή την κατεύθυνση συνηγορεί και η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης p27 μετά την απομάκρυνση του LY. Μάλιστα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 δεν μειώνονται κατευθείαν αλλά πρέπει να περάσει ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον 3 ωρών (Εικόνα 6.15.B). Αυτό σημαίνει πως η ανάκαμψη μετά από LY είναι μια προγραμματισμένη διαδικασία για αυτό τα κύτταρα χρειάζονται ένα διάστημα προσαρμογής στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες για να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο. Επίσης, τα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης c-Myc παραμένουν αυξημένα ακόμη και 2 ημέρες μετά την



απομάκρυνση του LY. Αναδεικνύεται έτσι η αναγκαιότητα του συγκεκριμένου μορίου για την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και η παρατεταμένη ενεργοποίησή του είναι πιθανότατα απαραίτητη για την πλήρη ανάκαμψη του πολλαπλασιασμού (Εικόνα 6.15.Γ).



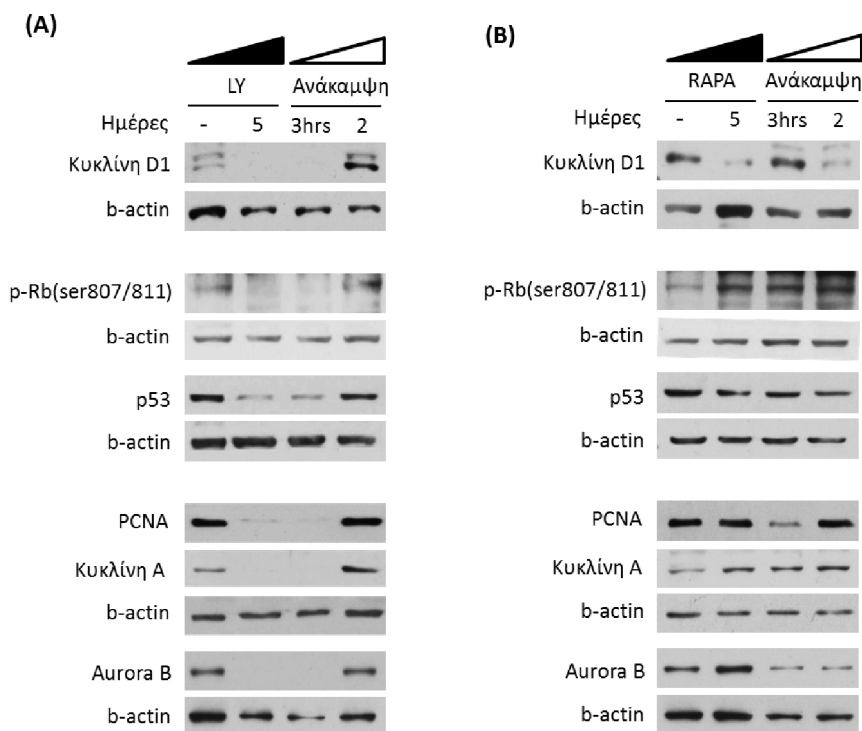
**Εικόνα 6.15:** Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Κί67, p27 και c-Myc αυξάνονται δραματικά κατά την ανάκαμψη. (Α) (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των Κί67+ κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων παρουσία των αναστολέων για 5 ημέρες καθώς και 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους (\*\*  $p < 0,01$ ). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της έκφρασης της πρωτεΐνης Κί67 στις προηγούμενες συνθήκες. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 20x. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεΐνης p27 παρουσία των αναστολέων για 5 ημέρες καθώς και 3 ώρες ή 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους. (C) Αποτύπωση της έκφρασης της πρωτεΐνης C-Myc στις παραπάνω συνθήκες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

Σε αντίθεση με το LY, η RAPA δεν οδηγεί τα κύτταρα εκτός του κυτταρικού κύκλου, όπως απέδειξαν τα προηγούμενα πειράματα. Αυτό δεν συμβαίνει ούτε μετά την απομάκρυνσή της, αφού δεν επηρεάζεται η έκφραση των πρωτεϊνών - δεικτών της

φάσης G<sub>0</sub>, Kι67 και p27 (6.15 A & B). Ωστόσο, η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης c-Myc επιβεβαιώνει τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση της RAPA (Εικόνα 6.15.Γ).

### **6.12 Οι μεταβολές στις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου επιβεβαιώνουν τη συνέχιση του κύκλου μετά την απομάκρυνση και των δυο αναστολέων**

Η μελέτη της έκφρασης – ενεργοποίησης βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (που είχαν κατασταλεί παρουσία LY) επιβεβαιώνει ότι η απομάκρυνση του LY και η καλλιέργεια των κυττάρων σε πλούσιο θρεπτικό μέσο οδηγεί στην έναρξη του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η έκφραση της κυκλίνης D1 και η φωσφορυλίωση του αναστολέα Rb αυξάνονται που σημαίνει ότι τα κύτταρα διέρχονται από τη φάση G<sub>1</sub>. Ακόμη, αυξάνεται η έκφραση του ογκοκαταστολέα p53, γεγονός που συμβάλλει στην ορθή λειτουργία του σημείου ελέγχου της φάσης G<sub>1</sub> (Restriction point). Επίσης, επάγεται η αντιγραφή του DNA καθώς αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης PCNA και της κυκλίνης A. Τα κύτταρα προχωρούν στη φάση G<sub>2</sub>, περνούν το σημείο ελέγχου της (DNA damage checkpoint) και προχωρούν στη φάση της μίτωσης καθώς ενεργοποιείται η κινάση Aurora B (Εικόνα 6.16.A). Αξίζει να σημειωθεί ότι για να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω μεταβολές θα πρέπει να περάσει ένα διάστημα τουλάχιστον 3 ωρών από την αφαίρεση του LY. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την καθυστέρηση της πτώσης της έκφρασης της πρωτεΐνης p27 και επιβεβαιώνει την προγραμματισμένη επανείσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο.



**Εικόνα 6.16: Επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων σε μόρια – κλειδιά του κυτταρικού κύκλου.**

Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται: η έκφραση κυκλινών D1 και A, των μορίων PCNA, Aurora B, p-Rb & p53 παρουσία των αναστολέων (A) LY και (B) RAPA για 5 ημέρες καθώς και μετά την απομάκρυνσή τους. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Η έκφραση των περισσότερων πρωτεϊνών ελέγχθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

Όπως στην περίπτωση του LY έτσι και μετά την απομάκρυνση της RAPA, ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται όπως αποκαλύπτεται από την αύξηση της κυκλίνης D1, της πτώση του παράγοντα PCNA και της κινάσης Aurora B 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του αναστολέα (Εικόνα 6.16.B). Οι συγκεκριμένες μεταβολές αποτελούν ένδειξη ότι τα κύτταρα περνούν το σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου, ολοκληρώνουν τον κύκλο και πιθανότατα έχουν εισέλθει στη φάση G1.

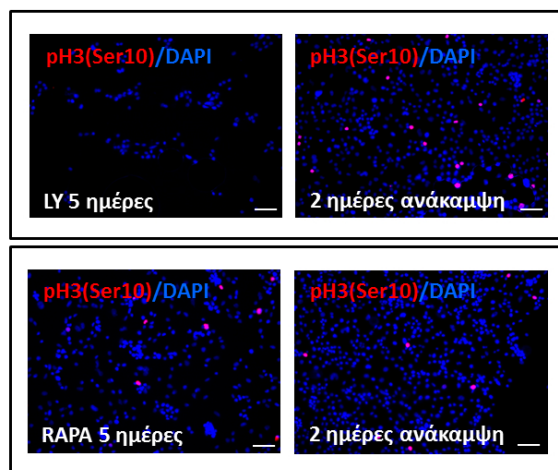
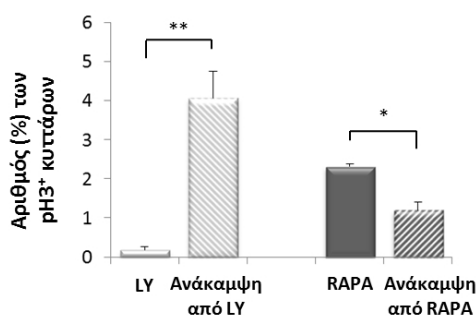
Ωστόσο, 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση της RAPA παρατηρείται πτώση της κυκλίνης D1 και η έκφραση της Aurora B συνεχίζει να είναι μειωμένη και κάτω από τα φυσιολογικά επίπεδα, γεγονότα που είναι πιθανό να υποδηλώνουν απορυθμισμένη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση του αναστολέα (Εικόνα 6.16.B). Στη μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1 μπορεί να συμβάλλει και η τυχόν

ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται με τέτοιου είδους στρες, όπως είναι το p38MAPK καθώς έχει βρεθεί ότι ενεργοποίηση της κινάσης p38 αναστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1 (Terada et al., 1999).

### 6.13 Η μεταβολή του αριθμού των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων παρουσιάζει αντίστροφη σχέση μεταξύ των αναστολέων κατά την απομάκρυνσή τους

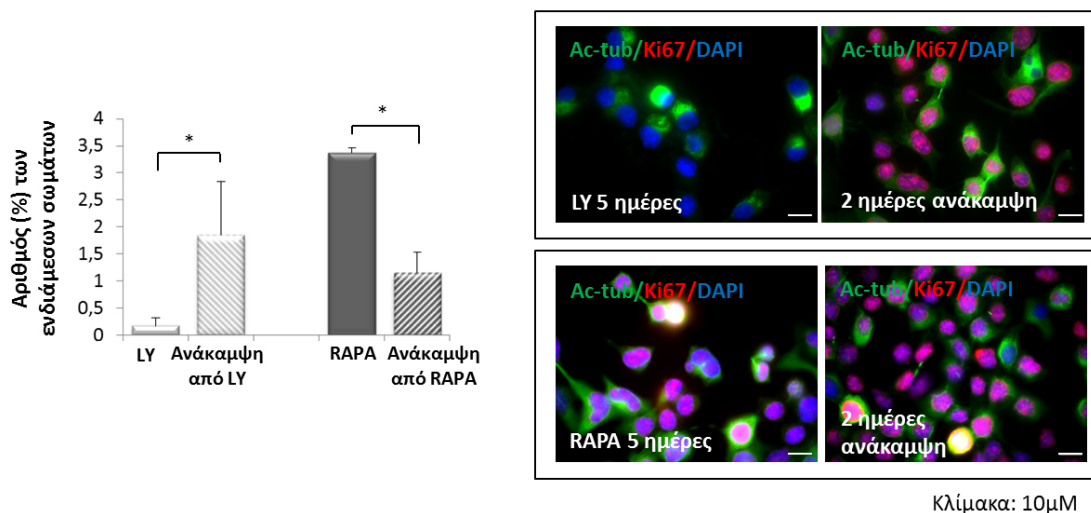
Η παρατήρηση ότι τα κύτταρα συνεχίζουν κανονικά των κυτταρικό κύκλο μετά την απομάκρυνση του LY επιβεβαιώθηκε και από την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης pH3(Ser10). Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.17.A, ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων έχει αυξηθεί 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση του LY και είναι σχεδόν στα ίδια επίπεδα με την καλλιέργεια ελέγχου. Επίσης, η αύξηση των ενδιάμεσων σωμάτων αποτελεί ακόμα μια ένδειξη προόδου του κυτταρικού κύκλου μετά την αφαίρεση του LY και μάλιστα είναι ο δείκτης ότι τα κύτταρα περνούν το στάδιο της τελόφασης και ολοκληρώνουν τον κύκλο (εικόνα 6.17.B).

(A)



Κλίμακα: 50μM

(B)



**Εικόνα 6.17: Μελέτη του αριθμού των  $\text{pH3}^+$  κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων.** (A) (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των  $\text{pH3(Ser10)}^+$  κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων παρουσία LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της έκφρασης της πρωτεΐνης pH3 στις παραπάνω συνθήκες. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 20x. (B) (Αριστερά) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία των αναστολέων για 5 ημέρες καθώς και 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους (\* $p < 0,05$ ). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των ενδιάμεσων σωμάτων στις παραπάνω συνθήκες. Η παρατήρησή τους επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (ac-tub). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 100x. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Σε αντίθεση με το LY, 2 ημέρες μετά την αφαίρεση της RAPA παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των  $\text{pH3}^+$  κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων (Εικόνα 6.17.A & B). Ωστόσο, όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται μετά της απομάκρυνση της RAPA (όπως φαίνεται από την αύξηση του αριθμού των κυττάρων και τις μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών – ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου). Συνεπώς, η μείωση των  $\text{pH3}^+$  κυττάρων (που συνδέεται με τη μείωση της έκφρασης της Aurora B) και των ενδιάμεσων σωμάτων σημαίνει ότι μετά την απομάκρυνση της RAPA τα κύτταρα περνούν γρήγορα το σημείο ελέγχου της μετάφασης και τη φάση της μίτωσης πιθανότατα λόγω κάποιας απορύθμισης της λειτουργίας του μηχανισμού ελέγχου που επιφέρει η δράση αυτού του αναστολέα. Τέλος, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δημιουργούνται μόνιμες αλλαγές στα κύτταρα μετά την

απομάκρυνση της RAPA γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στη συσσώρευση μεταλλάξεων.

#### **6.14 Επίδραση των αναστολέων στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων**

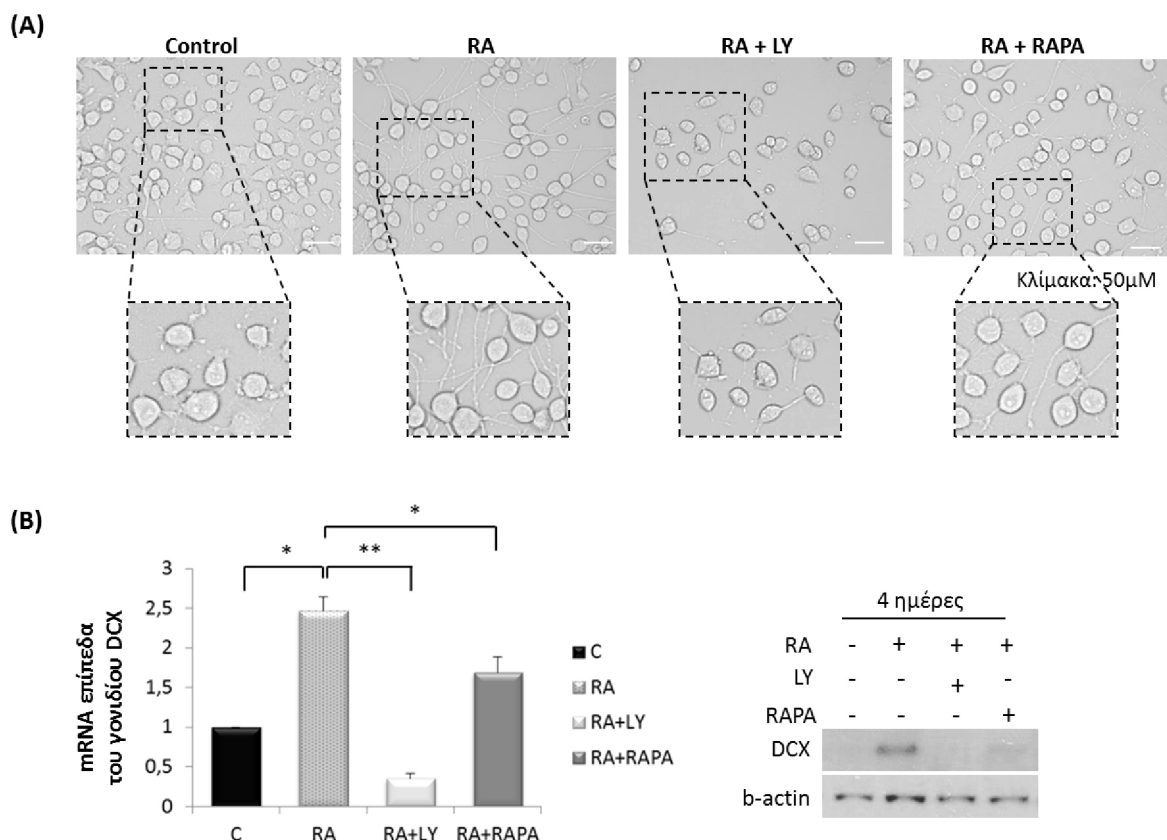
##### **Neuro2A**

Η επίδραση των αναστολέων LY και RAPA μελετήθηκε εκτός από τον πολλαπλασιασμό και στη διαδικασία της διαφοροποίησης, η οποία αποτελεί μια ακόμα βασική ιδιότητα των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Η διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ρετινοϊκού οξέος (RA) όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος 5.2.6.

Για τη διαφοροποίηση των κυττάρων μελετήθηκε αφενός η δημιουργία νευριτών, που αποτελούν την βασική δομή ενός διαφοροποιημένου κυττάρου, και αφετέρου η έκφραση της πρωτεΐνης DCX (Doublecortin). Για να θεωρηθεί ένα κύτταρο Neuro2A διαφοροποιημένο θα πρέπει να περιέχει αντιδιαμετρικά 2 νευρίτες και το μήκος τους να είναι τουλάχιστον διπλάσιο από τη διάμετρο του σώματος (Υλικά και μέθοδοι, Παράγραφος 5.2.6) και να εκφράζει DCX. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται στα νευρικά πρόδρομα κύτταρα και στους ανώριμους νευρώνες. Βρίσκεται συνδεδεμένη με τους μικροσωληνίσκους και επάγει τη δημιουργία και την μετανάστευση των νευριτών (Brown et al., 2003).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία LY εμποδίζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης καθώς τα κύτταρα αδυνατούν να δημιουργήσουν νευρίτες και να εκφράζουν DCX τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Τα επίπεδα mRNA της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρουσία LY είναι μικρότερα ακόμη και από τα βασικά της επίπεδα στην καλλιέργεια ελέγχου, όπου δεν υπάρχει ο παράγοντας RA που επάγει τη διαφοροποίηση (Εικόνα 6.18.A & B).

Η παρουσία RAPA επηρεάζει τη διαφοροποίηση σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το LY. Δεν εμποδίζει τη δημιουργία των νευριτών, αλλά οι νευρίτες που δημιουργούνται είναι μικρότεροι και στα περισσότερα κύτταρα υπάρχει μόνο ένας νευρίτης. Συνεπώς, τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν την εικόνα υγιούς διαφοροποίησης (Εικόνα 6.18.A). Αυτή η παρατήρηση αντανακλάται και από την μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης DCX τόσο μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο (Εικόνα 6.18.B).

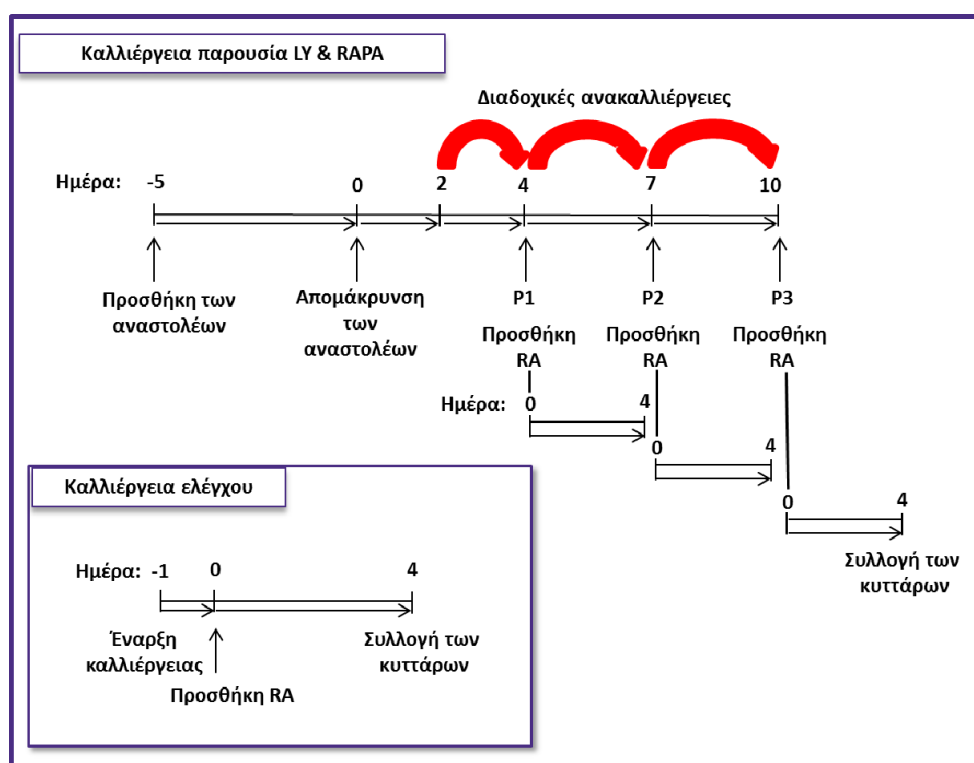


**Εικόνα 6.18: Ο LY αναστέλλει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενώ η RAPA επηρεάζει λιγότερο το δυναμικό διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων.** (A) Μορφολογική απεικόνιση της διαφοροποίησης των κυττάρων Neuro2A απουσία του παράγοντα διαφοροποίησης RA, παρουσία RA καθώς και κατά την ταυτόχρονη παρουσία RA με LY ή RAPA για 4 ημέρες. Φακός 20x. Στις μεγεθυμένες εικόνες απεικονίζεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια η παρουσία νευριτών ή όχι, ανάλογα με τη συνθήκη. Τεχνητό ζουμ 1,6x. (B) (Αριστερά) Γραφική παράσταση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου DCX στις συνθήκες που περιγράφονται στο μέρος A. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ποσοτικής PCR (Q-PCR). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το SRP14 και ως δείγμα αναφοράς το control (καλλιέργεια ελέγχου). (Δεξιά) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η έκφραση της πρωτεΐνης DCX στις παραπάνω συνθήκες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Όπου C: Καλλιέργεια ελέγχου (Control). Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Συμπερασματικά, αποκαλύπτεται από τα παραπάνω πειράματα ότι τα μονοπάτια PI3k/Akt και mTOR είναι απαραίτητα όχι μόνο για τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού αλλά και για τη διαφοροποίηση των Neuro2A κυττάρων. Η αναστολή του mTOR δυσχεραίνει τη διαφοροποίηση, ενώ η αναστολή της PI3k (η οποία σηματοδοτεί στο mTOR) εμποδίζει αυτή τη διαδικασία.

### 6.15 Ο LY αναστέλλει αντιστρεπτά τη διαφοροποίηση των κυττάρων ενώ η RAPA προκαλεί μόνιμη αναστολή της διαφοροποίησης

Για να μελετηθεί εάν η ανασταλτική επίδραση των φαρμάκων LY και RAPA στη διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A είναι αντιστρεπτή, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ανακαλλιέργειες για αρκετά passages (περάσματα) μετά την απομάκρυνση των αναστολέων. Σε καθένα passage προστέθηκε RA και μετά από 4 ημέρες συλλέχθηκαν τα κύτταρα, όπως παρουσιάζεται στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί.



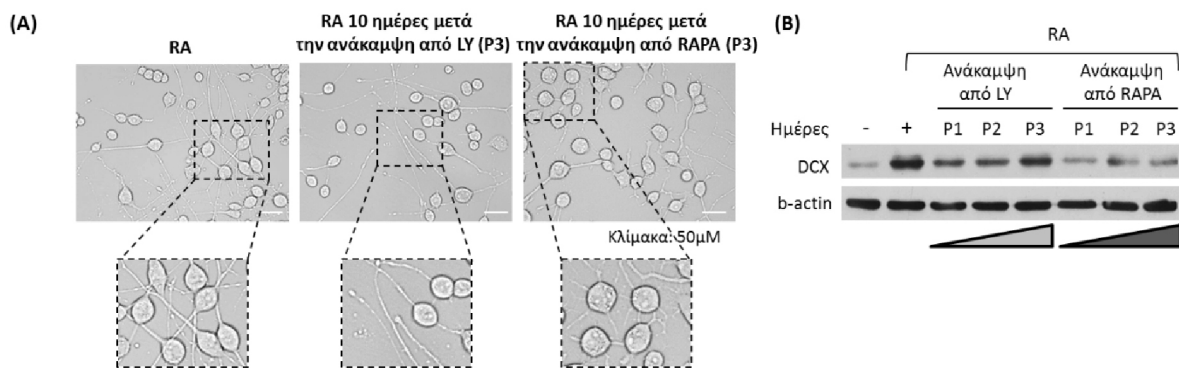
Εικόνα 6.19: Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της απομάκρυνσης των αναστολέων στη διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A: 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση των αναστολέων πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανακαλλιέργεια (passage) των κυττάρων, τα κύτταρα οδηγήθηκαν προς τη διαφοροποίηση με την παρουσία RA και συλλέχθηκαν ύστερα από τέσσερις ημέρες. Οι ανακαλλιέργειες συνεχίστηκαν για άλλες 4, 7 και 10 ημέρες μετά την απομάκρυνση των αναστολέων όπου σε όλα τα χρονικά διαστήματα συλλογής των κυττάρων προστέθηκε RA για τη μελέτη της διαφοροποίησης. Όλα τα δείγματα συνοδεύτηκαν από δείγμα της καλλιέργειας ελέγχου (control) το οποίο ωθήθηκε προς διαφοροποίηση παρουσία RA για 4 ημέρες.

Ακολούθησε μορφολογική παρατήρηση και απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης DCX. Τα πειράματα αποκάλυψαν ότι η επίδρασή του LY στη διαφοροποίηση είναι αντιστρεπτή καθώς τα



κύτταρα αποκτούν ξανά τη δυνατότητα να εκτείνουν νευρίτες και να εκφράζουν DCX παρουσία RA μετά την απομάκρυνση του LY (Εικόνα 6.20.A & B). Η επαναφορά της διαφοροποίησης γίνεται σταδιακά, καθώς η έκφραση της πρωτεΐνης DCX είναι χαμηλή όταν το RA προστίθεται 4 ημέρες μετά την ανάκαμψη και αυξάνεται σταδιακά μέχρι τις 10 ημέρες όπου πλησιάζει τα επίπεδα διαφοροποίησης της καλλιέργειας ελέγχου (Εικόνα 6.20.B).

Από την άλλη μεριά, η RAPA προκαλεί μόνιμη αναστολή στη διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.20, τα κύτταρα δεν εκτείνουν φυσιολογικούς νευρίτες και δεν αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης DCX όταν στο μέσο προστίθεται RA ακόμη και 10 ημέρες μετά την απομάκρυνση της RAPA.



**Εικόνα 6.20: Επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων Neuro2A.** (A) Μορφολογική απεικόνιση της διαφοροποίησης των κυττάρων παρουσία RA 10 ημέρες μετά την απομάκρυνση των αναστολέων. Φακός 20x. Στις μεγεθυμένες εικόνες απεικονίζεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια η παρουσία νευριτών ή όχι, ανάλογα με τη συνθήκη. Τεχνητό ζουμ 1,7x. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η έκφραση της πρωτεΐνης DCX παρουσία RA σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την απομάκρυνση των αναστολέων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία βιολογικά πειράματα.

Έτσι, διαπιστώνεται μέχρι στιγμής ότι το LY αναστέλλει με αντιστρεπτό τρόπο τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης γιατί οδηγεί τα κύτταρα σε μια G0-like κατάσταση, έτσι ώστε όταν αφαιρεθεί το φάρμακο τα κύτταρα είναι ικανά να ανακάμψουν γρήγορα και να επανέλθουν στη φυσιολογική κατάσταση.

Η RAPA δεν εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά δυσκολεύει τις συγκεκριμένες διαδικασίες και, σε αντίθεση με το LY, τα κύτταρα

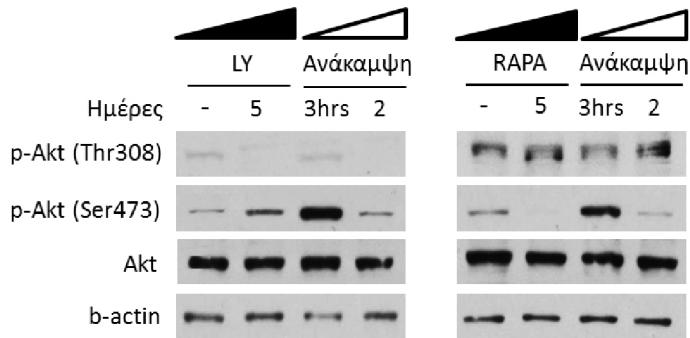
δεν ανακάμπτουν πλήρως μετά την απομάκρυνσή της. Οδηγεί δηλαδή σε μόνιμες μεταβολές στη βιολογία των κυττάρων.

#### **6.16 Η επίδραση των αναστολέων LY και RAPA στους στόχους του μονοπατιού PI3k – mTOR είναι αντιστρεπτή**

Επόμενος στόχος ήταν η συσχέτιση των μεταβολών που παρατηρούνται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων με αλλαγές που τυχόν να συμβαίνουν στην ενεργοποίηση μορίων – στόχων του άξονα PI3k – mTOR. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι μεταβολές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt στα κατάλοιπα Thr308 και Ser473, στη φωσφορυλίωση της κινάσης p70s6k στα κατάλοιπα Thr389 και ser371 καθώς και του παράγοντα 4EBP1 στα κατάλοιπα Thr37/46.

Η συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαίωσε σε βιοχημικό επίπεδο τον αντιστρεπτό τρόπο δράσης του LY σε αντίθεση με τη RAPA που οδηγεί σε μόνιμες μεταβολές. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6.21 (LY), 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του LY και την καλλιέργεια των κυττάρων σε πλούσιο θρεπτικό μέσο αυξάνεται έντονα η φωσφορυλίωση της κινάσης Akt στο κατάλοιπο Thr308 και μετά από 2 μέρες τα επίπεδα αποκαθίστανται στα κανονικά. Το ίδιο συμβαίνει και με τη φωσφορυλίωση στη Ser473 η οποία είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt και τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων στόχων.

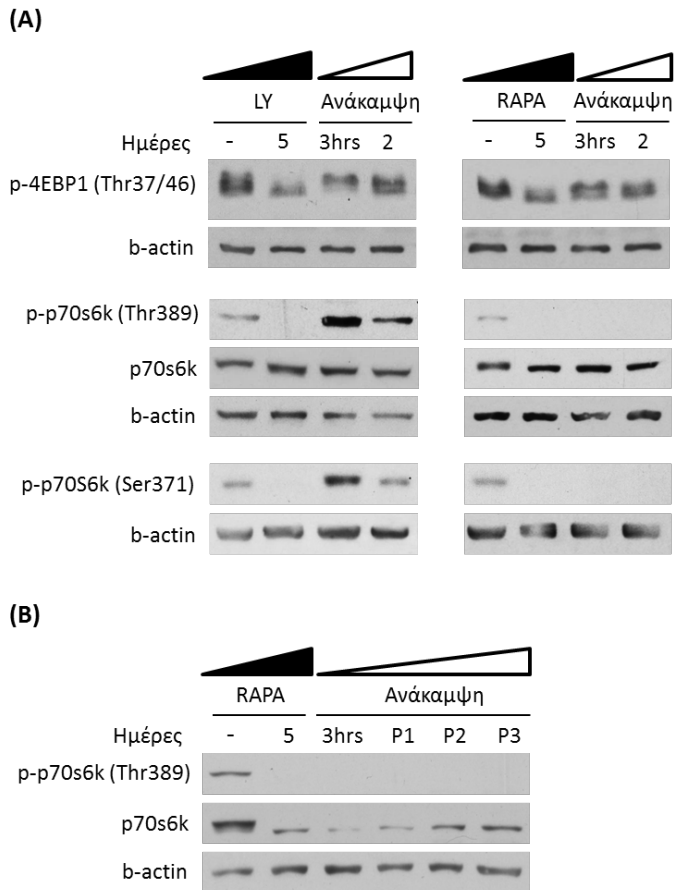
Από την άλλη μεριά, η απομάκρυνση της RAPA δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της Akt στο κατάλοιπο Thr308 (Εικόνα 6.21, RAPA). Όπως έχει προαναφερθεί, η συγκεκριμένη τροποποίηση πραγματοποιείται από την PDK1 η οποία δεν επηρεάζεται από τη RAPA στο σύστημά μας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η p-Akt(Ser473) αυξάνεται έντονα τις πρώτες ώρες απομάκρυνσης της RAPA και μειώνεται μετά στα βασικά επίπεδα, όπως συμβαίνει και μετά την απομάκρυνση του LY. Είναι πιθανό και σ αυτή την περίπτωση το κύτταρο να χρειάζεται υπερ-ενεργοποιημένη την κινάση Akt για την ενεργοποίηση στόχων της απαραίτητων για την πρόοδο του πολλαπλασιασμού.



**Εικόνα 6.21: Απεικόνιση των μεταβολών στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt παρουσία LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και 3 ώρες ή 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή τους.** Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

Η μελέτη των μορίων κάτωθι της Akt, όπως είναι το mTOR, αποκάλυψε ότι ενεργοποιείται το σκέλος mTOR – p70s6k - 4EBP1 μετά την απομάκρυνση του LY καθώς παρατηρείται αύξηση της φωσφορυλίωσης – απενεργοποίηση - της πρωτεΐνης 4EBP1 και αυξάνονται οι ενεργοποιητικές φωσφορυλιώσεις της p70s6k στα κατάλοιπα Thr389 και Ser371 που διαμεσολαβούνται από το mTOR (Εικόνα 6.22.A). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε υπερ-ενεργοποίηση της p70s6k όπως και της p-Akt στα πρώτα ενεργοποίησης του κυτταρικού κύκλου (3ώρες). Αυτό το γεγονός υποδηλώνει την αναγκαιότητα του ενεργού μονοπατιού mTOR για την πρωτεϊνοσύνθεση αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY για να μπορέσουν τα κύτταρα να ξεκινήσουν γρήγορα και ελεγχόμενα τον πολλαπλασιασμό.

Σε αντίθεση με το LY, η απομάκρυνση της RAPA συνοδεύεται μεν από αύξηση της απενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης του 4EBP1 αλλά δεν επανέρχεται η φωσφορυλίωση – ενεργοποίηση της κινάσης p70s6k στα κατάλοιπα Thr389 και Ser371 (εικόνα 6.22 RAPA). Η αναστολή της ενεργοποίησης της p70s6k είναι παρατεταμένη και υφίσταται για αρκετό χρονικό διάστημα (10 ημερών ή 3 passages όπως περιγράφονται στην εικόνα 4.18) μετά την απομάκρυνση της RAPA, (Εικόνα 6.22.B).



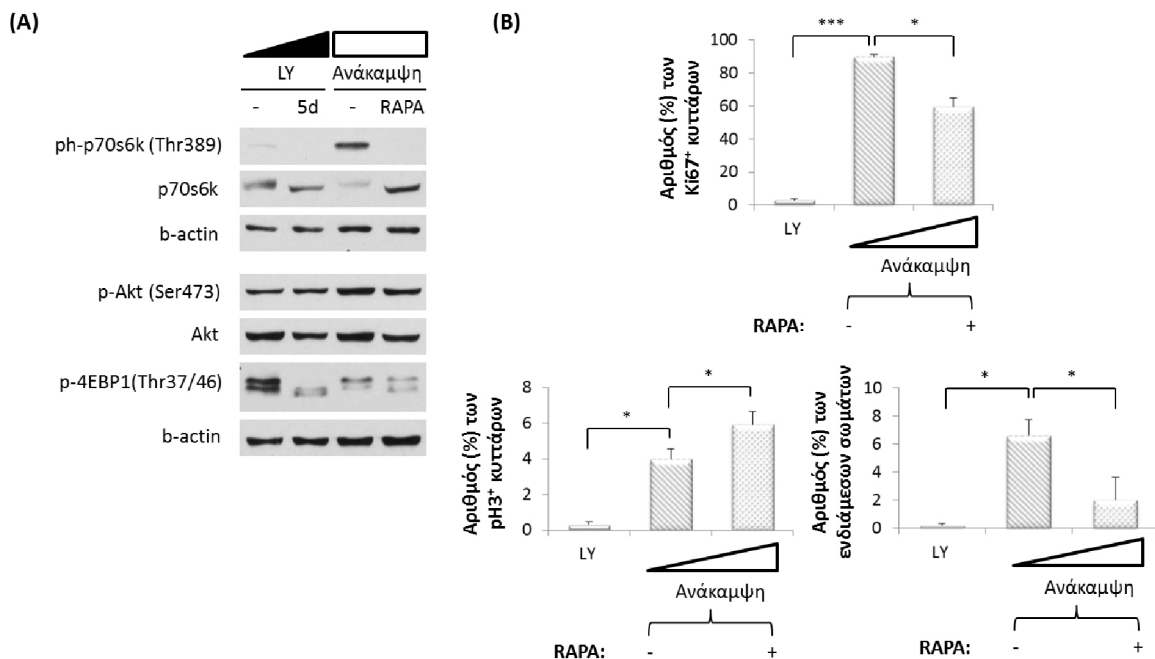
**Εικόνα 6.22: Απεικόνιση των μεταβολών στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των βασικών στόχων του μονοπατιού PI3k/mTOR: (A) p4EBP1 και p70s6k, παρουσία LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και μετά την απομάκρυνσή τους. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα. (B) Απεικόνιση της παρατεταμένης αναστολής της έκφρασης της πρωτεΐνης rh-p70(Thr389) ακόμα και 3 passages (ή 10 ημέρες) μετά την απομάκρυνση της RAPA. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.**

Με άλλα λόγια η πρωτεϊνοσύνθεση και ο πολλαπλασιασμός συνεχίζονται απουσία ενεργής p70s6k μετά την απομάκρυνση της RAPA. Θα μπορούσε σε αυτό σημείο να υποθέσει κανείς ότι οι μόνιμες μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη βιολογία των κυττάρων μετά την επώαση με RAPA συνδέονται με τη μόνιμη αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p70s6k.

### 6.17 Η αναστολή του συμπλόκου mTOR αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY εμποδίζει επιλεκτικά τη φωσφορυλίωση της p70s6k και τη φυσιολογική ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού

Τα προηγούμενα αποτελέσματα αναδεικνύουν την αναγκαιότητα του ενεργού άξονα Akt - mTOR - p70s6k για να μπορέσουν τα κύτταρα να ανταπεξέλθουν στο στρες της ανάκαμψης μετά την απομάκρυνση του LY και να ξεκινήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Ακόμη, η παρουσία RAPA επιφέρει σχετικά μόνιμη αναστολή της p70s6k καθώς η ενεργοποιητική της φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Thr389 δεν επανέρχεται για αρκετό διάστημα μετά την απομάκρυνση της RAPA.

Στα πλαίσια αυτά ελέγχθηκε η επίδραση της αναστολής του συμπλόκου mTOR, παρουσία RAPA, στην είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και στην έναρξη του πολλαπλασιασμού αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY. Τα πειράματα απέδειξαν ότι η παρουσία RAPA εμποδίζει την πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k μετά την απομάκρυνση του LY, καθώς αναστέλλει την έντονη ενεργοποίηση της p-p706k(Thr389) 3 ώρες μετά την ανάκαμψη, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η φωσφορυλίωση της Akt στη Ser473 και η φωσφορυλίωση – απενεργοποίηση του 4EBP1 (Εικόνα 6.23.A). Αναδύεται έτσι μια πιο ειδική σχέση της ενεργότητας του mTOR με την p70S6k κατά την επανέναρξη του κυτταρικού κύκλου.



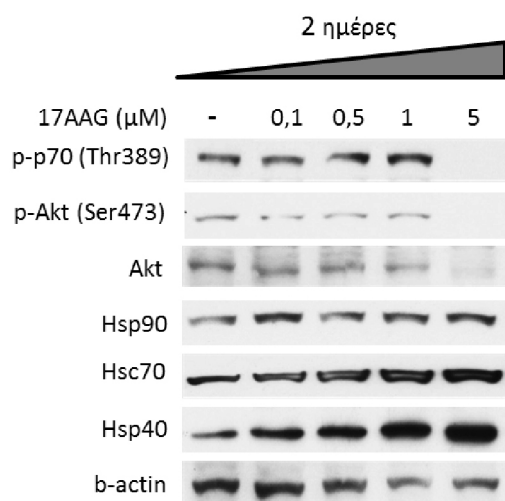
**Εικόνα 6.23: Επίδραση της παρουσίας RAPA στην έναρξη του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY.** (Α) Απεικονίζονται οι μεταβολές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p-p70(Thr389) και των άλλων στόχων του mTOR 3 ώρες παρουσία RAPA αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. (Β) Γραφική παράσταση του αριθμού των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων, pH3<sup>+</sup> κυττάρων και midbodies διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων 2 ημέρες μετά την απομάκρυνσή του LY παρουσία ή απουσία RAPA (\* p < 0,05, \*\*\*p<0,001). Τα κύτταρα επώαστηκαν με LY για 5 ημέρες πριν την ανάκαμψη. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της p70s6k συνοδεύεται από καθυστέρηση της εισόδου των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο όπως αποδεικνύεται από τον μειωμένο αριθμό των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων κατά την ανάκαμψη από LY παρουσία RAPA σε σχέση με την ανάκαμψη απουσία αναστολέα (Εικόνα 6.23.B). Ο μειωμένος αριθμός Ki67<sup>+</sup> κυττάρων συνοδεύεται από μείωση του πολλαπλασιασμού και καθυστέρηση των κυττάρων πριν τη φάση M, όπως αποκαλύπτει ο αυξημένος αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και ο μειωμένος αριθμός των ενδιάμεσων σωμάτων, χαρακτηριστικό το οποίο αποτελεί βασική ιδιότητα της RAPA, σύμφωνα με τα προηγούμενα πειράματα (Παράγραφος 6.7). Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απενεργοποίηση της p70s6k συνδέεται με την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου που προκαλεί η RAPA και ότι το μονοπάτι mTOR πρέπει να είναι πλήρως ενεργό για την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και την ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά τη φάση G0.

#### **6.18 Η Hsp90 είναι απαραίτητη για την έντονη ενεργοποίηση της p-p70(Thr389) και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά την ανάκαμψη από LY**

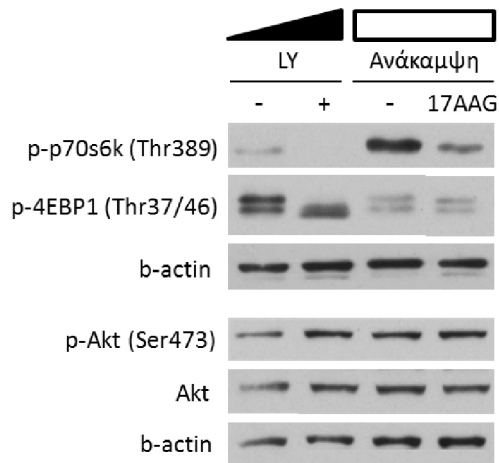
Λαμβάνοντας υπ' όψιν την σημασία του μονοπατιού PI3k – mTOR και ιδιαίτερα του ενεργού συμπλόκου mTOR για την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό, τα περαιτέρω πειράματα προσανατολίστηκαν προς τη μελέτη μορίων που αλληλεπιδρούν με στόχους του μονοπατιού και είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του. Όπως έχει προαναφερθεί (Εισαγωγή, παράγραφος 3.8.1), ένα τέτοιο μόριο είναι η πρωτεΐνη Hsp90. Στα πλαίσια αυτά ελέγχθηκε η επίδραση της αναστολής της δράσης της Hsp90 στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k – mTOR και του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY και της RAPA. Χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της Hsp90, 17AAG και αρχικά μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων (με βάση

τη βιβλιογραφία) στην ενεργοποίηση βασικών στόχων του μονοπατιού mTOR (p-p70s6k και p-Akt) και στον πολλαπλασιασμό με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση 5μM είναι ανασταλτική για την ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR (Εικόνα 6.24), οπότε χρησιμοποιήθηκε μικρότερη συγκέντρωση (1μM) για την περαιτέρω μελέτη, όπου σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας δεν επηρεάζει τους στόχους του μονοπατιού αλλά αναστέλλει τη δράση της Hsp90, καθώς αυξάνεται η έκφραση των άλλων Hsps: Hsc70 και Hsp40.



**Εικόνα 6.24:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17AAG για 2 ημέρες στη φωσφορυλίωση στόχων του μονοπατιού PI3k – mTOR. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

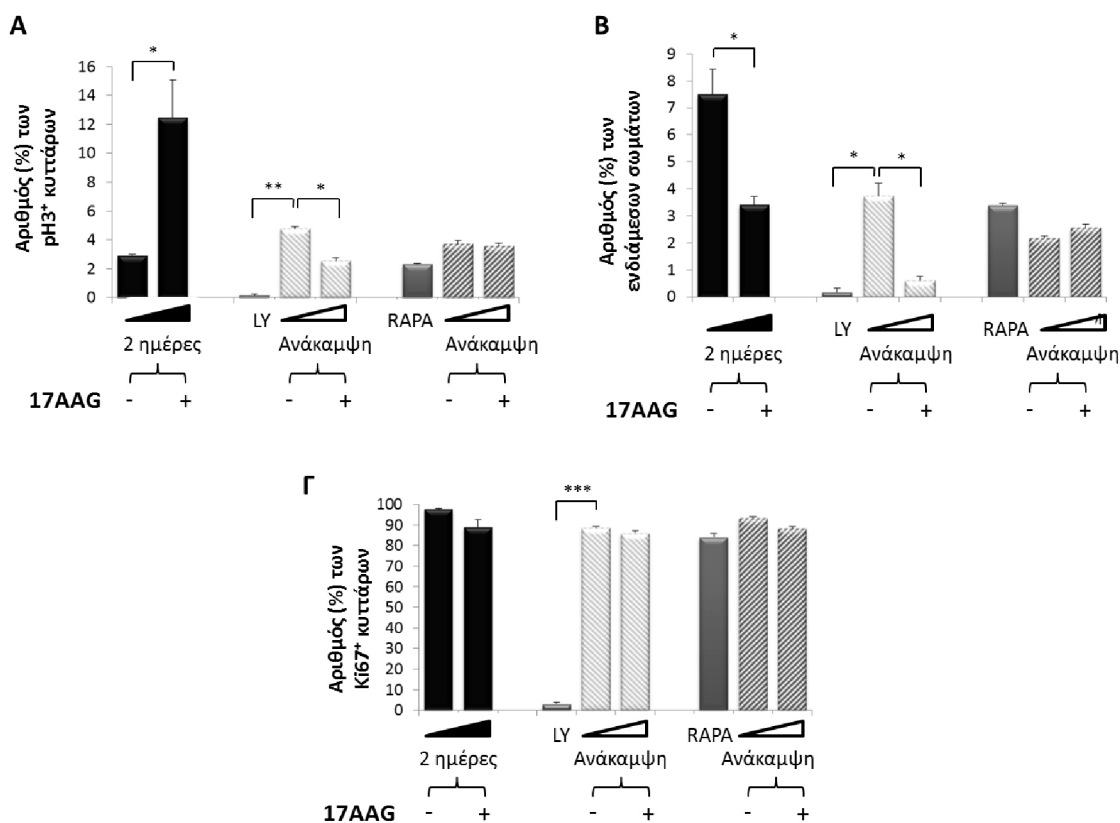
Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.25, η ενεργοποίηση των βασικών στόχων του μονοπατιού mTOR, p-Akt και p-4EBP1, μετά την απομάκρυνση του LY δεν επηρεάζεται παρουσία 17AAG. Ωστόσο, εμποδίζεται προοδευτικά η υπερ-ενεργοποίηση της p-p70(Thr389) 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του LY και παραμένει στα βασικά επίπεδα. Δηλαδή, η Hsp90 εμπλέκεται στην επιλεκτική δράση του άξονα Akt/mTOR στην φωσφορυλίωση της p70S6k κατά την επανέναρξη του πολλαπλασιασμού.



**Εικόνα 6.25: Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα 17AAG 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του LY στους στόχους του μονοπατιού PI3k – mTOR.** Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Η παρουσία του LY στα κύτταρα διήρκησε 5 ημέρες πριν την ανάκαμψη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Η αναστολή της υπερ-ενεργοποίησης της p70s6k παρουσία 17AAG μετά από LY συνοδεύεται από μείωση του πολλαπλασιασμού καθώς μειώνεται ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων (Διαγράμματα A & B εικόνας 6.26 ανοιχτές γκρι μπάρες). Αυτή η μείωση παρατηρείται μόνο μετά την ανάκαμψη από LY, δεν είναι αποτέλεσμα της παρουσίας μόνο και μόνο του 17AAG στα κύτταρα (Διαγράμματα A & B εικόνας 6.26 μαύρες μπάρες), ούτε συμβαίνει μετά την ανάκαμψη από RAPA (Διαγράμματα A & B εικόνας 6.26 σκούρες γκρι μπάρες). Είναι ένα χαρακτηριστικό που συνδέεται με την αναγκαιότητα της δράσης των Hsps μετά από LY, έτσι ώστε τα κύτταρα να ξεπεράσουν το στρες της ανάκαμψης και να εισέλθουν γρήγορα και φυσιολογικά στον κυτταρικό κύκλο. Αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία 17AAG αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY δεν επηρεάζει την αύξηση του αριθμού των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων, δηλαδή την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (Διάγραμμα Γ εικόνας 6.26 ανοιχτές γκρι μπάρες).





**Εικόνα 6.26: Επίδραση της αναστολής της HSP90 στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY.** Γραφική παράσταση του αριθμού των pR3<sup>+</sup> κυττάρων (A), ενδιάμεσων σωμάτων (B) και Ki67<sup>+</sup> κυττάρων (Γ) διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων παρουσία του αναστολέα 17AAG για 2 ημέρες είτε σε μια καλλιέργεια ελέγχου, είτε μετά την απομάκρυνσή του LY και της RAPA – ανάκαμψη. Η παρουσία του LY και της RAPA στα κύτταρα διήρκησε 5 ημέρες πριν την ανάκαμψη. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. (\*  $p < 0,05$ ).

Αντίθετα με το LY, η αναστολή της Hsp90 μετά την απομάκρυνση της RAPA δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς, όπως φαίνεται σε όλα τα διαγράμματα της εικόνας 6.26, δεν παρουσιάζεται κάποια μεταβολή στον αριθμό των μορίων – δεικτών του πολλαπλασιασμού που μελετήθηκαν. Δηλαδή, η ανάκαμψη μετά από RAPA είναι ανεξάρτητη της δράσης των Hsps.

### **6.19 Συσχέτιση του άξονα mTOR - p70s6k με σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στη φάση της μίτωσης**

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις ενισχύουν την υπόθεσή μας ότι η ελεγχόμενη δράση του μονοπατιού Akt – mTOR και ειδικά της p70s6k είναι απαραίτητη για την ομαλή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ακόμη είδαμε ότι η αναστολή της p70s6k μέσω RAPA συνοδεύεται από ΜΗ ομαλή συνέχιση του κύκλου μετά την απομάκρυνσή του αναστολέα και γρήγορο πέρασμα των κυττάρων από τη φάση της μίτωσης, που υποδηλώνει απορύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Παράγραφος 6.13). Άρα υποδηλώνεται μια αλληλεπίδραση της p70s6k με το mTOR για το πέρασμα από το σημείο ελέγχου της φάσης G2 στη φάση M. Για αυτούς τους λόγους ελέγξαμε με πιο προσεκτική ματιά τη σχέση του mTOR και της p70s6k με τη μίτωση.

Όπως προαναφέρθηκε στην Εισαγωγή, γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι:

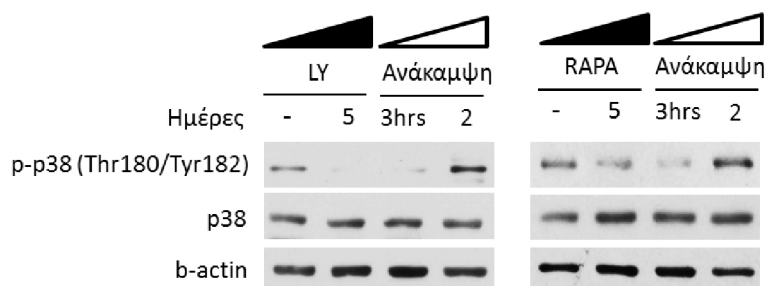
- Πολύ σημαντικά οργανίδια για τη φάση της μίτωσης είναι τα κεντροσώματα τα οποία αποτελούν το σημείο έναρξης της μιτωτικής ατράκτου (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.7.1).
- Η p70s6k βρίσκεται στα κεντροσώματα και η λειτουργία της σε αυτό το οργανίδιο δεν είναι πλήρως γνωστή (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.7.5).
- Το mTOR επίσης έχει βρεθεί στα κεντροσώματα αυτοφωσφορυλιωμένο στη Ser2481 και η συγκεκριμένη τροποποίηση αυξάνεται στη φάση της μίτωσης (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.7.5).
- Μια ακόμη πολύ σημαντική πρωτεΐνη για τη διεξαγωγή της μίτωσης είναι η κινάση p38MAPK η οποία εντοπίζεται στα κεντροσώματα και είναι απαραίτητη για το σωστό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2.A).
- Το μονοπάτι p38MAPK ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες, όπως είναι η προσθήκη θρεπτικών συστατικών και αναπτυξιακών παραγόντων. Τέτοιου είδους στρες δημιουργείται στο μοντέλο μας μετά την απομάκρυνση των αναστολέων (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2).
- Ακόμη, η κινάση p38 αλληλεπιδρά με το μονοπάτι mTOR και επάγει φωσφορυλίωση της p70s6k σε διαφορετικά κατάλοιπα απ' ότι το mTOR (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2.B).

Με βάση τα παραπάνω, η περαιτέρω μελέτη εστιάστηκε στην ανάλυση της επίδρασης του μονοπατιού p38 κατά την ανάκαμψη των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων, με κεντρικό μόριο την p-p70s6k(Thr389).

## 6.20 Η αναστολή του μονοπατιού PI3k – mTOR μειώνει αντιστρεπτά την έκφραση της κινάσης p38

Γνωρίζουμε ότι η κινάση p38 ενεργοποιείται έμμεσα από τη σηματοδότηση της PI3k και όπως προαναφέρθηκε αλληλεπιδρά με τον άξονα mTOR – p70s6k (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2.B). Στα πλαίσια αυτά, αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση των αναστολέων LY και RAPA, καθώς και η απομάκρυνσή τους, στην ενεργοποίηση – φωσφορυλίωση της κινάσης p38 στα κατάλοιπα Thr180/Tyr182, η οποία γίνεται από τις MAPKKs: MKK3 και MKK6 (Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία LY καταστέλλει τη φωσφορυλίωση της κινάσης p38 με αντιστρεπτό τρόπο καθώς αυξάνεται 2 ημέρες μετά την αφαίρεση του φαρμάκου (Εικόνα 6.27 LY – Ανάκαμψη). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει ότι η ενεργοποίηση της κινάσης p38 ελέγχεται από το μονοπάτι της PI3k (Rane et al., 2001).

Επίσης, η αναστολή του συμπλόκου mTOR μέσω RAPA παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της κινάσης p38 (αν και σε μικρότερο βαθμό απ' ότι το LY), υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία της κινάσης mTOR είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της κινάσης p38. Αυτή η αναστολή είναι και πάλι αντιστρεπτή καθώς η απομάκρυνση της RAPA αυξάνει έντονα την p-p38(Thr180/Tyr182) (Εικόνα 6.27 RAPA - Ανάκαμψη).



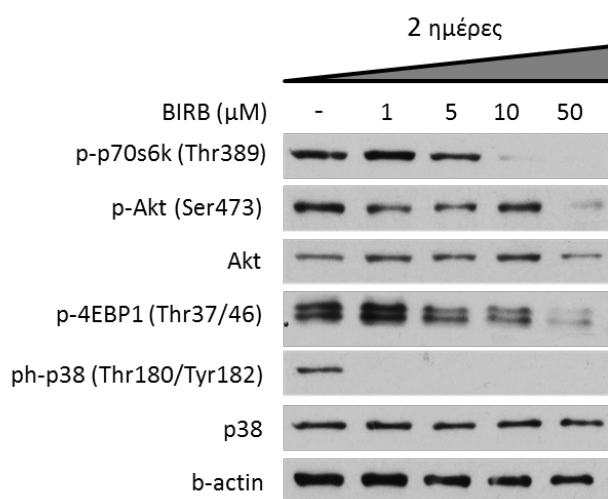
**Εικόνα 6.27:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η επίδραση του LY και της RAPA για 5 ημέρες καθώς και η απομάκρυνσή τους (ανάκαμψη) στη φωσφορυλίωση της p38MAPK. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Η ενεργοποίηση της κινάσης p38 μετά την απομάκρυνση των αναστολέων θα μπορούσε πιθανά να υποδηλώσει την αναγκαιότητα του ενεργού μονοπατιού της p38MAPK για τη συνέχιση του πολλαπλασιασμού τόσο μετά την απομάκρυνση του LY όσο και μετά την απομάκρυνση της RAPA.

### 6.21 Η δράση της κινάσης p38 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της p70s6k κατά την ανάκαμψη των κυττάρων

Για να μελετηθεί εκτενέστερα η αναγκαιότητα της κινάσης p38 για την ανάκαμψη των κυττάρων μετά από LY ή RAPA και κατά πόσο επηρεάζει την ενεργοποίηση της p70s6k, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της p38MAPK, BIRB 796 (BIRB). Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, Παράγραφος 3.8.2.A, ο συγκεκριμένος αναστολέας εμποδίζει τη φωσφορυλίωση – ενεργοποίηση της κινάσης p38 στα κατάλοιπα Thr180/Tyr182.

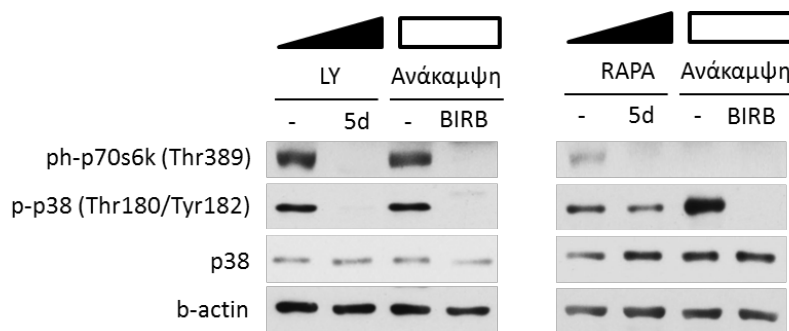
Αρχικά επιλέχτηκε η κατάλληλη συγκέντρωση η οποία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της p38 αλλά δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων, κάτι το οποίο συμβαίνει στις συγκεντρώσεις 5μM και κάτω (Εικόνα 6.28).



**Εικόνα 6.28:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αναστολέα BIRB για 2 ημέρες στη φωσφορυλίωση στόχων του μονοπατιού PI3k – mTOR. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αναστολή της p-p70s6k (Thr389) που παρατηρείται παρουσία 10μM BIRB δεν συνοδεύεται από αλλαγές στα επίπεδα του p-4EBP1 και της p-Akt (Ser473). Αυτή η επιλεκτική αναστολή της φωσφορυλίωση p70s6k παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων BIRB σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας αποτελεί ένδειξη μιας πιο ειδικής αλληλεπίδρασης της p70s6k με το p38. Ωστόσο παρουσία της ακραίας συγκέντρωσης 50μM BIRB αναστέλλεται η ενεργοποίηση και των υπόλοιπων στόχων του mTOR, γεγονός το οποίο είναι απόρροια της τοξικότητας αυτής της συγκέντρωσης η οποία εκτός των άλλων συνοδεύεται από αρκετό κυτταρικό θάνατο.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα BIRB (5μM) στη φωσφορυλίωση της p70s6k (Thr389) σε καλλιέργεια όπου είχε προηγηθεί η παρουσία LY ή RAPA για 5 ημέρες. Η παρουσία BIRB για 2 ημέρες (όπως και για 3 ώρες) αναστέλλει την ενεργοποίηση της p70s6k μετά την απομάκρυνση του LY, γεγονός το οποίο συνοδεύεται από αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης p38 (Εικόνα 6.29 LY - Ανάκαμψη). Αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των κυττάρων παρουσία BIRB μετά από LY σε σχέση με την κανονική καλλιέργεια αποκαλύπτει πως η επίδραση του μονοπατιού p38 στην p70s6k γίνεται ως απόκριση στο στρες της ανάκαμψης των κυττάρων από τη φάση G0.



**Εικόνα 6.29:** Απεικόνιση των μεταβολών στη φωσφορυλίωση της p70s6k και της p38 παρουσία LY ή RAPA για 5 ημέρες (5d) καθώς και κατά την ανάκαμψη απουσία ή παρουσία 5μM BIRB για 2 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

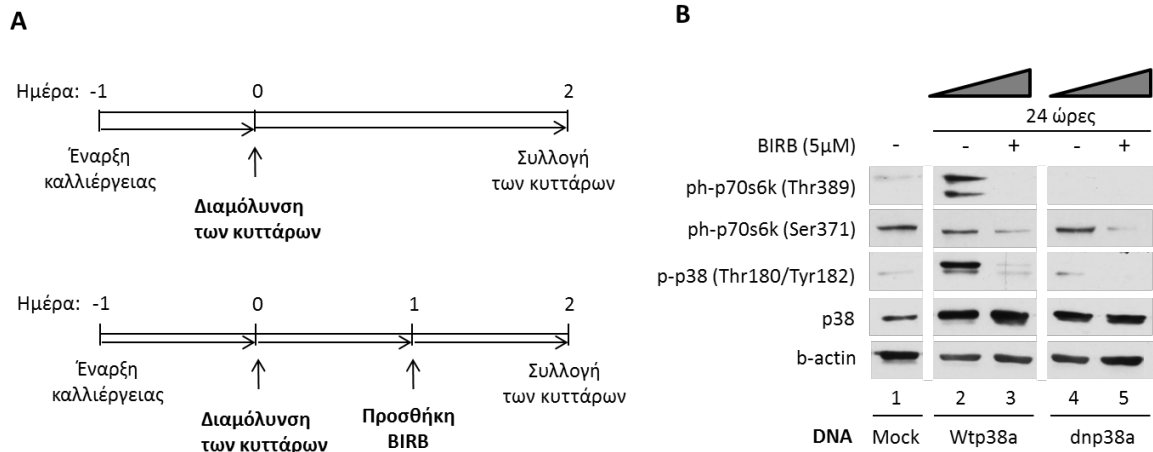
Ανάλογα σχεδόν είναι τα αποτελέσματα της παρουσίας BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA καθώς εμποδίζει την έντονη ενεργοποίηση της κινάσης p38 που συμβαίνει κανονικά μετά την απομάκρυνση αυτού του αναστολέα (εικόνα 6.27). Ωστόσο, η αναστολή της κινάσης p38 σε αυτή την περίπτωση δεν μπορεί να επηρεάσει

την έκφραση της p-p70s6k (Thr389) καθώς τα επίπεδα της δεν επανέρχονται έτσι κι αλλιώς μετά από RAPA (Εικόνα 6.29 RAPA - Ανάκαμψη). Δηλαδή, η έκθεση των κυττάρων σε RAPA εμποδίζει την κινάση p38 να προωθήσει την φωσφορυλίωση της p70S6k στο κατάλοιπο Thr389.

## **6.22 Η φωσφορυλίωση της p70s6k στη θέση Thr389 είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της κινάσης p38**

Για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κινάσης p38 και της p70s6k πραγματοποιήθηκε το ακόλουθο πείραμα υπερέκφρασης της κινάσης p38: Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με εξωγενές DNA της αγρίου τύπου ισομορφής p38a (wtp38a) και ύστερα από 2 ημέρες καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέχτηκαν και μελετήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p70s6k. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το DNA που κωδικοποιεί για την αδρανή - dominant negative - μορφή της p38 (dnp38a), τα χαρακτηριστικά του οποίου περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος 5.1.6. Η διαμόλυνση με το εξωγενές DNA συνοδεύτηκε από την προσθήκη του αναστολέα BIRB 1 ημέρα πριν τη συλλογή των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην εικόνα 6.30.A.

Τα πειράματα έδειξαν ότι κατά την υπερέκφραση του γονιδίου του αγρίου τύπου p38 αυξάνεται η φωσφορυλίωση της p70s6k και μάλιστα μόνο στο κατάλοιπο Thr389 και όχι στη Ser371 (Εικόνα 6.30.B, διαδρομές 1 vs 2). Από την άλλη μεριά, η υπερέκφραση της αδρανούς μορφής της κινάσης p38 (dnp38a) μειώνει τα βασικά επίπεδα της p-p70s6k (Thr389) και πάλι δεν επηρεάζει την έκφραση της p-p70(Ser371), όπως φαίνεται στις διαδρομές 4 και 5 της εικόνας 6.30.B.



**Εικόνα 6.30: Επίδραση της υπερέκφρασης της κινάσης p38 στην ενεργοποίηση της p70s6k.** (A) Σχηματική απεικόνιση των χρονικών διαστημάτων της διαμόλυσης των κυττάρων με το εξωγενές DNA (transfection) και της προσθήκης BIRB. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της φωσφορυλιωμένης p70s6k στα κατάλοιπα Thr389 και Ser371 κατά την υπερέκφραση του *wtp38a* ή της *dnp38a* μορφής για 2 ημέρες. Η υπερέκφραση συνοδεύτηκε από την παρουσία ή την απουσία BIRB για 24 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Διαδρομή 1: Κύτταρα transfected με mock DNA. Διαδρομή 2: Κύτταρα transfected με *wtp38a* για 2 ημέρες. Διαδρομή 3: Όπως και στη διαδρομή 2 με τη διαφορά ότι την τελευταία ημέρα πριν τη συλλογή των κυττάρων προστέθηκε BIRB (5μM) στην καλλιέργεια για 24 ώρες. Διαδρομή 4: Κύτταρα transfected με *dnp38a* για 2 ημέρες. Διαδρομή 5: Όπως και στη διαδρομή 4 με τη διαφορά ότι την τελευταία ημέρα πριν τη συλλογή των κυττάρων προστέθηκε BIRB (5μM) στην καλλιέργεια για 24 ώρες. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Επιβεβαιώνεται με αυτόν τον τρόπο ότι η φωσφορυλίωση της p70s6k στη Thr389 είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της κινάσης p38. Ωστόσο, η ενεργοποιητική επίδραση του εξωγενούς p38 στην p-p70s6k (Thr389) αναστέλλεται παρουσία BIRB 1 ημέρα πριν τη συλλογή των κυττάρων (Εικόνα 6.30.B, διαδρομή 3), γεγονός που επαληθεύει την ανασταλτική επίδραση του αναστολέα BIRB στη φωσφορυλίωση της p70s6k στη Thr389. Παράλληλα η παρουσία BIRB εμποδίζει και τη φωσφορυλίωση στη Ser371 τόσο κατά την υπερέκφραση της p38 όσο και κατά την καταστολή της (*dnp38a*) (Εικόνα 6.30.B διαδρομές 3 και 5). Αυτό σημαίνει πως η παρεμπόδιση της συγκεκριμένης τροποποίησης δεν είναι απόρροια της κατεσταλμένης κινάσης p38 παρουσία BIRB, όπως συμβαίνει με την Thr389, αλλά οφείλεται πιθανότατα σε κάποια παράπλευρη δράση του αναστολέα BIRB. Τέλος, η αύξηση της έκφρασης της

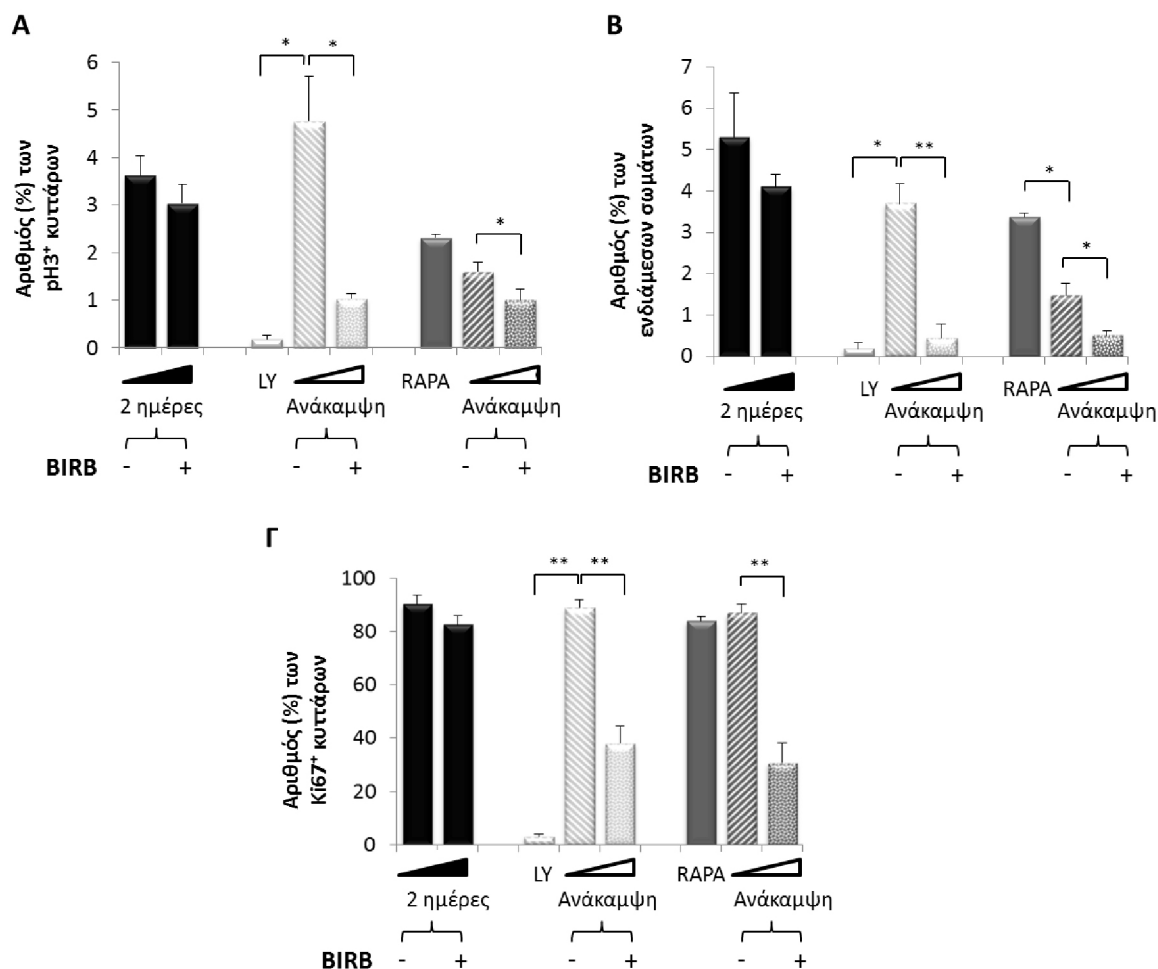
κινάσης p-p38 (Thr180/Tyr182) κατά την υπερέκφραση του εξωγενούς p38 και η μείωσή της παρουσία της αδρανούς κινάσης p38 (dnp38) επιβεβαιώνει την επιτυχία της διαμόλυνσης. Επίσης, η αναστολή της παρουσία BIRB επιβεβαιώνει τη δράση του αναστολέα BIRB στο συγκεκριμένο πείραμα.

### **6.23 Η αναστολή της κινάσης p38 παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μετά την απομάκρυνση του LY και της RAPA**

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι στο μοντέλο μας αναδεικνύεται ο ρόλος της κινάσης p38 στην ενεργοποίηση της p70s6k και ότι μεταβολές στην έκφραση της p70s6k συνοδεύονται από μη ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση των αναστολέων, τα πειράματα συνεχίστηκαν με τη μελέτη της επίδρασης του αναστολέα BIRB στην είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο μετά την απομάκρυνση του LY και στη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση της RAPA. Όπως έχει συζητηθεί, μόριο - δείκτης της εξόδου των κυττάρων από τη φάση G0 είναι πρωτεΐνη ki67, και ως δείκτες για τη συνέχιση του πολλαπλασιασμού μετά από RAPA μετρήθηκαν ο αριθμός των pH3(Ser10)<sup>+</sup> κυττάρων και αριθμός των ενδιάμεσων σωμάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία BIRB δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (Εικόνα 6.31 BIRB 2 ημέρες) αλλά η παρουσία του αμέσως μετά την απομάκρυνση τόσο του LY όσο και της RAPA μειώνει τον αριθμό των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων, δηλαδή μειώνει τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 6.31.A & B, LY – Ανάκαμψη και RAPA - Ανάκαμψη). Ακόμη, μειώνεται ο αριθμός των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες που είναι μια ένδειξη ότι τα κύτταρα εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο στην περίπτωση της απομάκρυνσης της RAPA και παρεμποδίζεται η είσοδος τους στον κύκλο κατά την ανάκαμψη από LY (Εικόνα 6.31.Γ).





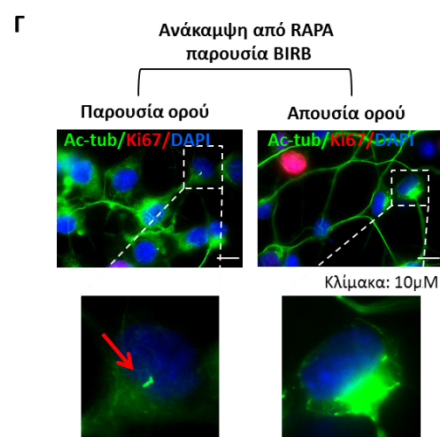
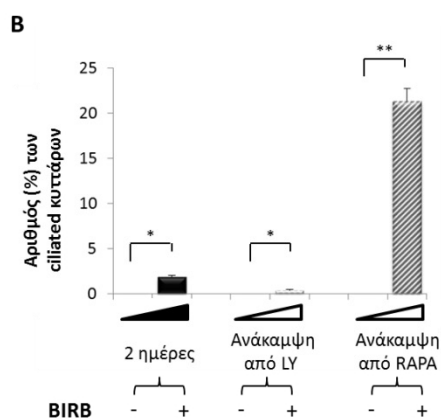
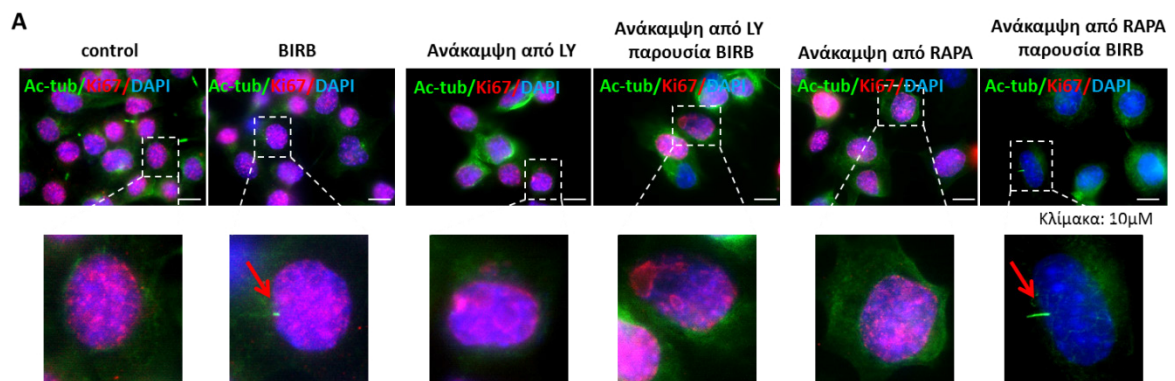
**Εικόνα 6.31: Επίδραση της αναστολής της p38MAPK στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY και της RAPA.** Απεικόνιση (A) του αριθμού των pH3<sup>+</sup> κυττάρων (B), του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων και (Γ) του αριθμού των κι67<sup>+</sup> κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων παρουσία BIRB για 2 ημέρες σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας καθώς και μετά την απομάκρυνση των αναστολέων LY και RAPA. Η παρουσία του LY και της RAPA στα κύτταρα διήρκησε 5 ημέρες πριν την ανάκαμψη. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01).

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ενεργή κίνηση p38 (όπως και η λειτουργία της Hsp90) είναι απαραίτητες για την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο μετά την απομάκρυνση του LY και την ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR μέσω της ινσουλίνης. Επίσης, η συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση της RAPA, αν και είναι ανεξάρτητη της δράσης της Hsp90, εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης p38.

## 6.24 Η ανάκαμψη των κυττάρων παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA επάγει το σχηματισμό πρωτογενών μικροτριχιδίων

Η μελέτη του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία BIRB για 2 ημέρες μετά την απομάκρυνση των αναστολέων LY και RAPA οδήγησε εκτός των άλλων στο σχηματισμό τριχοειδών προεκβολών τύπου primary cilia (ή πρωτογενών μικροτριχιδίων) στο μοντέλο μας.

Πιο συγκεκριμένα η χρώση με αντίσωμα εναντίον της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Ac-tub) αποκάλυψε ότι η παρουσία BIRB σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας οδηγεί στο σχηματισμό μικροτριχιδίων σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των κυττάρων ( $\approx 1\%$ ) και με πολύ μικρό μήκος, ενώ μετά την απομάκρυνση του LY το ποσοστό των κυττάρων που εμφανίζουν μικροτριχίδιο είναι μηδαμινό ( $\approx 0,3\%$ ). Ωστόσο, η παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA οδηγεί σε δραματική αύξηση του αριθμού του συγκεκριμένου είδους κυττάρων ( $\approx 21\%$ ) που συνοδεύεται από αύξηση του μήκους των μικροτριχιδίων ( $\approx 3,5$  φορές) και κύτταρα που δεν εκφράζουν Ki67 (Εικόνα 6.32.A και B, Ανάκαμψη από RAPA παρουσία BIRB). Αντίθετα, παρουσία BIRB σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας δεν μεταβάλλεται ο αριθμός των ki67<sup>+</sup> κυττάρων.



**Εικόνα 6.32: Η παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA αυξάνει δραματικά τον αριθμό των κυττάρων που σχηματίζουν μικροτριχίδια.** (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των μικροτριχιδίων παρουσία του αναστολέα BIRB (5μΜ) για 2 ημέρες σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (control) καθώς και μετά την απομάκρυνση των αναστολέων LY και RAPA. Η παρατήρησή τους επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (Ac-tub). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 100x. Τεχνητό ζουμ 3,6x. (Β) Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που σχηματίζουν μικροτριχίδια στις συνθήκες του μέρους Α (\*p < 0,05). (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μορφολογίας των κυττάρων παρουσία BIRB για 2 ημέρες αμέσως μετά την απομάκρυνση της RAPA σε συνθήκες υψηλού ορού στο θρεπτικό μέσο είτε απουσία ορού. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. Φακός 100x. Τεχνητό ζουμ 3,6x. Παρουσιάζεται ένα από τα τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί πως για να σχηματιστεί το μικροτριχίδιο απαιτείται η παρουσία θρεπτικών συστατικών στο μέσο καθώς δεν επάγεται η δημιουργία τους όταν η καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA γίνεται σε θρεπτικό μέσο όπου δεν προστίθεται ορός. Αντ' αυτού τα κύτταρα αποκτούν αρκετά μεγάλους νευρίτες, ως ένα εναλλακτικό μηχανισμό να επικοινωνήσουν με τα γειτονικά κύτταρα (Εικόνα 6.32.Γ).

Με άλλα λόγια, επιβεβαιώνεται στο σύστημά μας η βιβλιογραφία που υποστηρίζει πως η κινάση p38 εμποδίζει τη δημιουργία των μικροτριχιδίων καθώς η αναστολή της τα επάγει (Ressurreição et al., 2011). Επίσης, φαίνεται ότι ο σχηματισμός των μικροτριχιδίων σχετίζεται με τη φάση που βρίσκονται τα κύτταρα καθώς όταν προστίθεται το BIRB μετά από LY, όπου τα κύτταρα είναι στη φάση G0, δεν δημιουργούνται μικροτριχίδια. Αντιθέτως, όταν προστίθεται μετά από RAPA, όπου τα κύτταρα είχαν σταματήσει τον κύκλο πριν το σημείο ελέγχου της μετάφρασης, αυξάνεται αισθητά ο αριθμός των κυττάρων που εμφανίζουν μικροτριχίδιο. Δηλαδή, τα κύτταρα ολοκληρώνουν τον κύκλο και στη συνέχεια το κεντρόσωμα χρησιμοποιείται όχι για τη δημιουργία της ατράκτου αλλά για τη συνάθροιση του μικροτριχιδίου, γι αυτό μειώνεται και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι όσα κύτταρα έχουν μικροτριχίδιο παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA, είναι  $ki67^-$ , που σημαίνει ότι έχουν εξέλθει από τον κυτταρικό κύκλο. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο της RAPA καθώς τα κύτταρα που σχηματίζουν μικροτριχίδιο παρουσία BIRB σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας είναι  $Ki67^+$ , δηλαδή βρίσκονται

εντός του κυτταρικού κύκλου και χρησιμοποιούν το μικροτριχίδιο ως εναλλακτικό τρόπο για να επιβιώσουν όταν το μονοπάτι p38MAPK είναι κατεσταλμένο. Συμπεραίνουμε ότι η αναστολή του μονοπατιού mTOR σε συνδυασμό με την αναστολή της σηματοδότησης p38MAPK αποτελούν έναν μηχανισμό επιβίωσης των κυττάρων που οδηγεί στην είσοδο σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0 όπου πιθανότατα είναι προστατευμένα.

## 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 7.1 Η παρουσία LY επηρεάζει με αντιστρεπτό τρόπο το μονοπάτι PI3k – mTOR – p70s6k και τον πολλαπλασιασμό, ενώ η δράση της RAPA προκαλεί μόνιμες μεταβολές στη βιολογία του κυττάρου

Από την παρούσα μελέτη αποκαλύπτεται καταρχήν ότι η αναστολή μορίων που βρίσκονται ανοδικά στη σηματοδότηση Ινσουλίνη – PI3k – mTOR – p70s6k ασκεί διαφορετική επίδραση στη βιολογία του κυττάρου, απ' ότι η αναστολή μορίων που βρίσκονται καθοδικά στο μονοπάτι.

Η αναστολή της PI3k παρουσία LY συνοδεύεται από αναστολή του πολλαπλασιασμού, έξοδο των κυττάρων απ' τον κυτταρικό κύκλο και παραμονή σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της φάσης G0 του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από μια σειρά παρατηρήσεων: Πρώτον, ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται χωρίς να παρατηρείται κυτταρικός θάνατος. Δεύτερον ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται στις φάσεις G0/G1, η έκφραση της πρωτεΐνης-δείκτη του πολλαπλασιασμού - Kι67 ελαχιστοποιείται και παράλληλα ενεργοποιείται η έκφραση της πρωτεΐνης p27 η οποία αποτελεί αναστολέα του κυτταρικού κύκλου και εκφράζεται στη φάση G0. Σε αυτή την υπόθεση συνηγορεί και η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης c-Myc γεγονός το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό των καρκινικών βλαστικών κύτταρων, δηλαδή κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0 (Wang et al., 2008, Tansey 2014). Τρίτον, μειώνεται η έκφραση των κυκλινών D1 και A καθώς και μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (pRb, PCNA, Aurora B), καθώς επίσης παρατηρείται μείωση στον αριθμό των pH3(ser10)<sup>+</sup> κυττάρων, όπου η φωσφορυλίωση στη Ser10 είναι απαραίτητη για τη ολοκλήρωση της μίτωσης (Hsu et al., 2000) και μείωση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων (midbodies) που εμφανίζονται κατά την τελόφαση (Shen et al., 2009). Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι ο κυτταρικός κύκλος σταματάει νωρίς, στη φάση G1 και τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση G0. Τέταρτον, δεν παρατηρείται απόπτωση καθώς δεν αυξάνεται η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και μειώνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών p53 και p-p38 (Thr180/Tyr182) των οποίων η έκφραση αυξάνεται κανονικά σε συνθήκες στρες και μπορούν να επάγουν απόπτωση, ανάλογα με

το ερέθισμα (Cuenda et al., 2007, Wood et al., 2009). Τέλος, μειώνεται η πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της αναστολής του μονοπατιού mTOR και συγκεκριμένα των στόχων του mTORC1: p-p70s6k (Thr389 και Ser371) και p-4EBP1 (Thr37/46). Είναι πιθανό ότι το κύτταρο προσπαθώντας να ανταπεξέλθει στο στρες που προκαλείται καθώς δεν μπορεί να αξιοποιήσει τα θρεπτικά συστατικά μειώνει τις μεταβολικές του διεργασίες μέσω καταστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης (Cheung et al., 2013). Έτσι, αποθηκεύει ενέργεια με σκοπό να έχει τα απαραίτητα εφόδια που χρειάζεται για να αξιοποιήσει τα θρεπτικά συστατικά μετά την απομάκρυνση του LY και να ξεκινήσει τον πολλαπλασιασμό.

Η αναστολή του συμπλόκου mTOR παρουσία RAPA επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη βιολογία του κυττάρου: Καταρχήν, μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων λόγω μείωσης του πολλαπλασιασμού, σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το LY, αλλά ούτε σε αυτή την περίπτωση επάγεται η απόπτωση. Δεύτερον, τα κύτταρα δεν οδηγούνται εκτός του κυτταρικού κύκλου καθώς δεν επηρεάζεται ο αριθμός των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων, ούτε εκφράζεται ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου, p27 (Gerdes, et al., 1991, Oesterle et al., 2011). Τρίτον, παρατηρείται καθυστέρηση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου που συνοδεύεται από αυξημένη ενσωμάτωση BrdU σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου και τέταρτον, αντίθετα με τον LY, παρατηρείται μείωση της έκφρασης του ογκογονιδίου c-MYC και της κυκλίνης D1, αύξηση της έκφρασης της Aurora B (η οποία ελέγχει τη διέλευση των κυττάρων από τη φάση G2 στην M) όπως και του αριθμού των pH3(ser10)<sup>+</sup> κυττάρων και των μεταφασικών φιγούρων καθώς και μείωση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων.

Η ραπαμυκίνη λοιπόν δεν αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο σε κάποια επιμέρους φάση. Αντιθέτως τον καθυστερεί, και λαμβάνοντας υπ' όψιν την αύξηση των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και της Aurora B καθώς και τη μείωση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων συμπεραίνουμε ότι παρουσία RAPA τα κύτταρα καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο στην αρχή της μίτωσης καθώς είναι πιθανό να δυσκολεύονται να περάσουν το σημείο ελέγχου της μετάφασης.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωση της μίτωσης είναι η ενεργή κινάση p38. Παρατηρήσαμε ότι η φωσφορυλίωση της κινάσης p38 αναστέλλεται παρουσία RAPA, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελεί έναν λόγο για την παρεμπόδιση του

κύκλου. Ακόμη, παρουσία RAPA αναστέλλεται η φωσφορυλίωση των στόχων του mTORC1: p-p70s6k(Thr389 και Ser371), και p-4EBP1(Thr37/46) όπως και η φωσφορυλίωση της Akt στο κατάλοιπο Ser473, η οποία είναι στόχος του mTORC2. Η απενεργοποίηση της p70s6k και η ενεργοποίηση του 4EBP1 (λόγω αναστολής της φωσφορυλίωσης τους) μειώνει την πρωτεϊνοσύνθεση ως μια προσπάθεια του κυττάρου να ανταπεξέλθει στο στρες της μη αξιοποίησης των θρεπτικών συστατικών (λόγω ελλιπούς σηματοδότησης mTOR).

Μετά την απομάκρυνση των αναστολέων παρατηρήσαμε ότι ο αριθμός των κυττάρων αυξάνεται, υποδηλώνοντας ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της απομάκρυνσης του LY η αύξηση είναι μεγαλύτερη από την απομάκρυνση της RAPA (2 fold vs 1,7 fold). Επίσης, ο κυτταρικός κύκλος επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από LY ενώ δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή μετά την απομάκρυνση της RAPA, συνεχίζεται, δηλαδή, με μειωμένο ρυθμό. Επιπρόσθετα, αυξάνεται ο αριθμός των Ki67<sup>+</sup> κυττάρων και μειώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης p27 μετά την απομάκρυνση του LY που επιβεβαιώνει την είσοδο των κυττάρων στον φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Η απομάκρυνση της RAPA δεν επηρεάζει τα παραπάνω μόρια επιβεβαιώνοντας ότι τα κύτταρα δεν εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου ούτε κατά τη διάρκεια ούτε μετά την απομάκρυνσή της. Αντίθετα, αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης c-Myc και στις δυο περιπτώσεις, που συνάδει με το γεγονός ότι συνεχίζεται ο πολλαπλασιασμός. Μετά την απομάκρυνση του LY αυξάνεται η έκφραση των μορίων pRb και p53 καθώς και των κυκλινών D1 και A. Επίσης, η αύξηση και των υπόλοιπων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως το PCNA, ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων, υποδηλώνουν ότι ο κύκλος συνεχίζεται και ολοκληρώνεται κανονικά μετά την απομάκρυνση του LY. Αντιθέτως, μετά την απομάκρυνση της RAPA, παρατηρείται μεν παροδική αύξηση στην κυκλίνη D1, δηλαδή τα κύτταρα περνάνε το σημείο ελέγχου της μετάφασης και προχωρούν τον κυτταρικό κύκλο, αλλά δυο μέρες μετά παρατηρείται μείωση στην έκφραση της κυκλίνης D1 και της Aurora B που οδηγεί στη μείωση του αριθμού των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και συνοδεύεται από μείωση του αριθμού των ενδιάμεσων σωμάτων, ενώ ο αριθμός των κυττάρων συνεχίζει να αυξάνεται.

Φαίνεται δηλαδή ότι η δράση της RAPA οδηγεί σε απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα μετά την απομάκρυνση της να παρατηρείται γρήγορη διέλευση των κυττάρων από τις τελευταίες φάσεις του κύκλου. Δεν είναι καθόλου απίθανο με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα να συσσωρεύουν επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες δημιουργούν μόνιμες αλλαγές στη βιολογία του κυττάρου. Ένα παράδειγμα μόνιμης μεταβολής που προκαλεί η RAPA είναι η αναστολή της διαφοροποίησης ακόμη και μετά την απομάκρυνσή της, σε αντίθεση με τον LY το οποίο αναστέλλει αντιστρεπτά τη διαδικασία της διαφοροποίησης, όπως και τον πολλαπλασιασμό. Αυτό το γεγονός αποτελεί ακόμη μια ένδειξη ότι ο LY οδηγεί τα κύτταρα σε μια «προστατευμένη» G0-like κατάσταση, που τα βοηθάει να επανέλθουν στη φυσιολογική λειτουργία μετά την απομάκρυνσή του.

Μετά την απομάκρυνση του LY ενεργοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση καθώς παρατηρείται πλήρης ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3k – mTOR καθώς αυξάνεται η φωσφορυλίωση των στόχων του όπως είναι η p-Akt ( Thr308 & Ser473), η p-p70s6k (Thr389 & Ser371) και ο p-4EBP1(Thr37/46). Ειδικά, για την p-Akt(Ser473) και την p-p70s6k παρατηρείται υπερ-ενεργοποίηση κατά την έναρξη του κυτταρικού κύκλου, που οφείλεται πιθανά στην έντονη ανάγκη του κυττάρου για πρωτεϊνοσύνθεση σε αυτές τις συνθήκες.

Η απομάκρυνση της RAPA αποκαθιστά τη φωσφορυλίωση του 4EBP1 και οδηγεί σε παροδική αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt στο κατάλοιπο Ser473. Ωστόσο, παρατηρείται σχετικά μόνιμη αναστολή της ενεργοποίησης της p70s6k καθώς δεν επανέρχεται η φωσφορυλίωση στα ενεργοποιητικά της κατάλοιπα: Thr389 και Ser371. Δηλαδή, ο πολλαπλασιασμός κατά την ανάκαμψη από RAPA συνεχίζεται απουσία ενεργής p70s6k γεγονός το οποίο είναι πιθανό να ευθύνεται για τις μόνιμες μεταβολές στη βιολογία των κυττάρων που συζητήθηκαν προηγουμένως. Η σημασία της p70s6k για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αναδεικνύεται όταν ανασταλεί η έντονη ενεργοποίηση της αμέσως μετά την απομάκρυνση του LY με τη χρήση RAPA, καθώς καθυστερεί η είσοδος των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και εμποδίζεται η ολοκλήρωσή του.



## **7.2 Η ανάκαμψη των κυττάρων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης p38MAPK**

Και στις δυο περιπτώσεις μετά την απομάκρυνση των αναστολέων αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης p-p38(Thr180/Tyr182). Όπως προαναφέρθηκε, η συγκεκριμένη κινάση ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες όπως είναι οι μεταβολές των θρεπτικών συστατικών του περιβάλλοντος. Μια τέτοια συνθήκη είναι όταν το κύτταρο αφήνεται ελεύθερο να αξιοποιήσει τα πλούσια θρεπτικά συστατικά του μέσου μετά την απομάκρυνση των αναστολέων.

Η αναστολή του μονοπατιού p38, παρουσία του ειδικού αναστολέα BIRB, μετά την απομάκρυνση του LY παρεμποδίζει, την ενεργοποίηση της p70s6k και την ανάκαμψη των κυττάρων. Αυτό υποδηλώνει τη σημασία της ενεργής σηματοδότησης p38MAPK για να εξέλθουν τα κύτταρα από τη φάση G0 και να εισέλθουν στον φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Η αναγκαιότητα της ενεργής κινάσης p38 για την ενεργοποίηση - φωσφορυλίωση της p70s6k εδραιώνεται από την αύξηση της έκφρασης της p-p70s6k (Thr389) κατά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης p38. Μάλιστα αυτή η σχέση είναι ειδική για την Thr389 καθώς υπερέκφραση της πρωτεΐνης p38 δεν επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p70s6k στη Ser371.

Διαπιστώνεται ότι η συνέχιση του κυτταρικού κύκλου μετά την απομάκρυνση της RAPA, εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης p38, καθώς η αναστολή της παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η δράση της p38 είναι απαραίτητη για την έναρξη της διαδικασίας της μίτωσης (Lee et al., 2010) και η RAPA καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο πριν το σημείο ελέγχου της μετάφρασης, εκεί δηλαδή όπου συσσωρεύεται η κινάση p38 για να βοηθήσει τα κύτταρα να περάσουν ελεγχόμενα αυτό το στάδιο. Η αναστολή της πρωτεΐνης p38 παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA μειώνει τον πολλαπλασιασμό, γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με την υπερενεργοποίηση της p-p38 (Thr180/Tyr182) που συμβαίνει κανονικά κατά την ανάκαμψη από RAPA, αποτελεί ένδειξη ότι η κινάση p38 διαμεσολαβεί στη γρήγορη διέλευση των κυττάρων από τις τελευταίες φάσεις του κύκλου και επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται απουσία ενεργούς p70s6k. Γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες ότι η κινάση p38 επάγει τη φωσφορυλίωση της p70s6k στα κατάλοιπα Thr421/Ser424 (Terradellas et al.,

2008, Choi et al., 2012). Θα μπορούσε λοιπόν η ενεργοποίηση των παραπάνω καταλοίπων της p70s6k παρουσία p38 κατά την ανάκαμψη από RAPA να αναπληρώνει τη δράση της p-p70s6k(Thr389) στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ακόμη, ένας εναλλακτικός μηχανισμός συνέχισης της πρωτεϊνοσύνθεσης απουσία ενεργούς p70s6k θα μπορούσε να είναι η ενεργοποίηση της p90s6k, η οποία είναι μια κινάση ανάλογη της p70s6k αλλά δεν αναστέλλεται παρουσία RAPA. Η p90s6k ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες από τις MAPKs (κυρίως από τις κινάσες Erk και p38) και φωσφορυλιώνει την s6 ριβοσωμική υπομονάδα, όπως και η p70s6k, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση (Frodin et al., 1999).

Τέλος, η αναστολή της δράσης πρωτεϊνών heat shock, όπως είναι η Hsp90, που αλληλεπιδρούν με συστατικά της σηματοδότησης PI3k - mTOR αποκάλυψε ότι η λειτουργία τους είναι απαραίτητη για την έντονη ενεργοποίηση της p70s6k κατά την έναρξη του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY και για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, η συνέχιση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση της RAPA είναι ανεξάρτητη της δράσης της Hsp90 καθώς η αναστολή της, παρουσία του ειδικού αναστολέα, 17AAG, δεν επέφερε κάποια αλλαγή στην έκφραση μορίων - δεικτών του πολλαπλασιασμού. Αυτό το γεγονός μπορεί να σχετίζεται με τη φάση που η RAPA καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο και είναι πιθανό η απουσία αναγκαιότητας των Hsps μετά την απομάκρυνση της RAPA να συνδέεται με την μόνιμη αναστολή της p-p70(Thr389).

### **7.3 Η αναστολή της p38MAPK κατά την ανάκαμψη των κυττάρων από RAPA αλλά όχι από LY οδηγεί στο σχηματισμό πρωτογενών μικροτριχιδίων**

Η αναστολή της κινάσης p38 παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA οδήγησε στη μείωση του πολλαπλασιασμού καθώς μειώθηκε ο αριθμός των pH3<sup>+</sup> κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων. Αυτή η μείωση συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό μικροτριχιδίων.

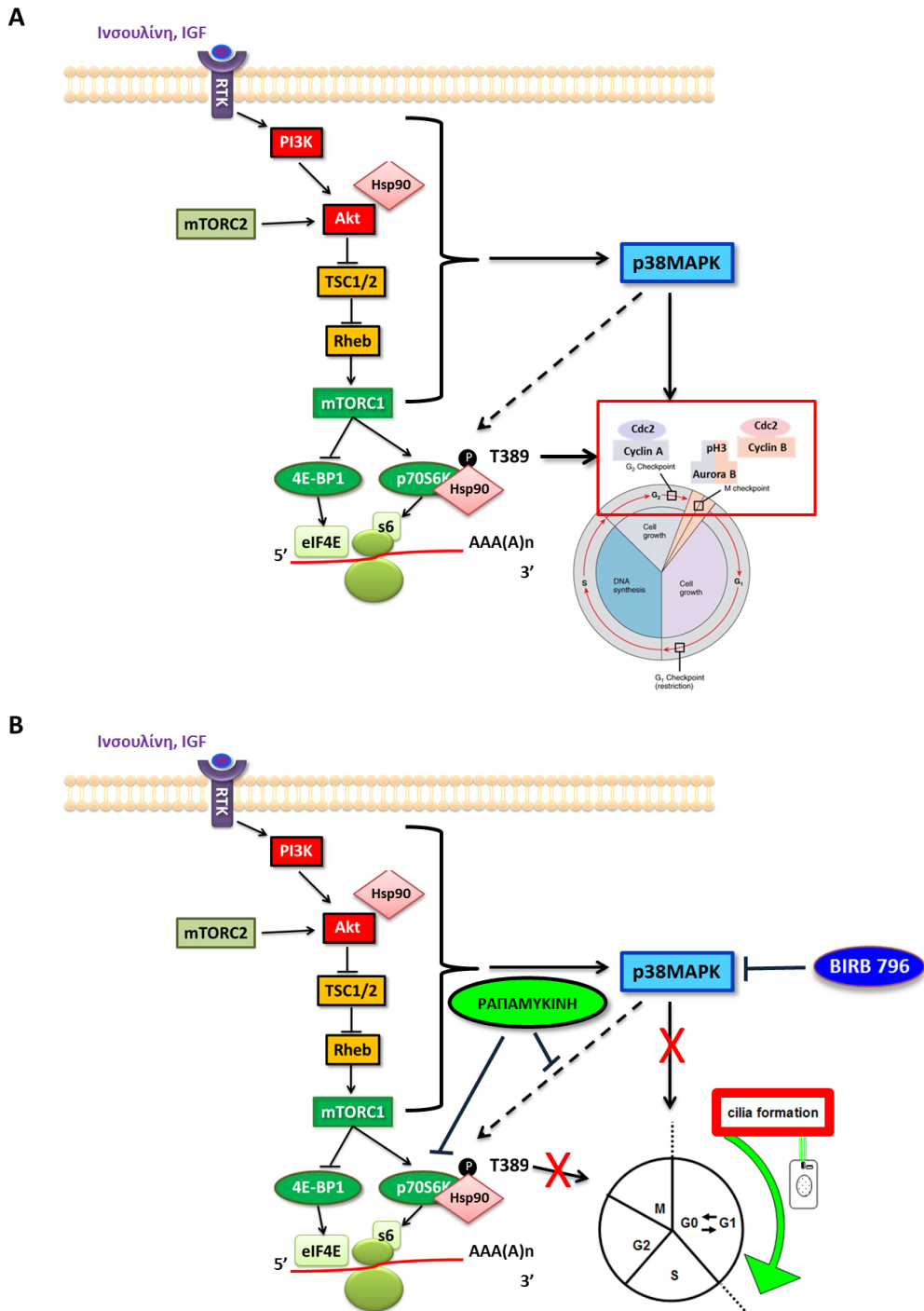
Τα μικροτριχίδια (ή cilia) αποτελούν τριχοειδείς δομές των μικροσωληνίσκων που εκτείνονται από το κεντρόσωμα προς το εξωκυττάριο περιβάλλον, με βασικό συστατικό τους τα κεντριόλια των κεντροσωμάτων. Λειτουργούν ως κεραιές για το κύτταρο καθώς αντιλαμβάνονται εξωκυττάρια σήματα και σηματοδοτούν σε βασικά μονοπάτια όπως το Hedhehog, το Wnt, το mTOR κ.α. (Seeger-Nukpezah et al., 2013). Η δημιουργία τους

συνδέεται με βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, η πολικότητα των κυττάρων ακόμα και η δημιουργία ιστών. Πιο σημαντική για τη λειτουργία του κυττάρου είναι η σχέση με το non-canonical μονοπάτι Wnt (PCP) όπου το μικροτριχίδιο σηματοδοτεί στο PCP ως απόκριση του περιβάλλοντος για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και το PCP σηματοδοτεί στο μικροτριχίδιο για τη δημιουργία πολικότητάς και την επαγωγή της μετανάστευσης (Wang 2009). Η σύνδεση των μικροτριχιδίων με τη μετανάστευση έχει αναδείξει αυτές τις δομές αναγκαίες για τη νευρογένεση καθώς λειτουργεί ως αισθητήριο όργανο του περιβάλλοντος και καθορίζει την κατεύθυνση της πολικότητας του νευρίτη (Veland et al., 2014).

Δημιουργούνται επίσης όταν τα κύτταρα εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και εισέρχονται στη φάση G0, όπου η απουσία της μιτωτικής ατράκτου αφήνει ελεύθερα τα κεντριόλια να αποτελέσουν τον κορμό για τη δημιουργία του βασικού τους σώματος (Tollenaere et al., 2014). Γνωρίζουμε ότι η αναστολή της δράσης της κινάσης p38 συνδέεται με την αύξηση της κινητικότητας των κινητών μικροτριχιδίων (motile cilia) στον νηματώδη σκώληκα *C. elegans* (Ressurreição et al., 2011), άρα είναι πιθανό η αναστολή της κινάσης p38 να επάγει τη δημιουργία μικροτριχιδίων και σε άλλα μοντέλα.

Τα πειράματα έδειξαν ότι η παρουσία BIRB σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας οδηγεί στο σχηματισμό ενός ελάχιστου αριθμού μικροτριχιδίων με πολύ μικρό μήκος. Αντίθετα, ο αριθμός των κυττάρων που σχηματίζουν μικροτριχίδια 20πλασιάζεται και αυξάνεται το μήκος τους εάν πριν από τη χορήγηση του BIRB έχει προηγηθεί η παρουσία RAPA. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο της RAPA καθώς δεν δημιουργήθηκαν μικροτριχίδια παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση του LY. Είναι πιθανό ο σχηματισμός των μικροτριχιδίων να σχετίζεται με τη φάση που βρίσκονται τα κύτταρα παρουσία RAPA ή να επιβεβαιώνει το στρες που προκαλεί η RAPA στα κύτταρα καθώς τα μικροτριχίδια μπορούν να δημιουργηθούν ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός επιβίωσης του κυττάρου όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές. Γνωρίζουμε ότι ο σχηματισμός των μικροτριχιδίων συνοδεύεται από την είσοδο των κυττάρων στη φάση G0. Αυτό το χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με την απουσία έκφρασης Ki67 στα κύτταρα που σχηματίζουν μικροτριχίδια είναι μια ένδειξη ότι ο συνδυασμός RAPA με BIRB οδηγεί τα κύτταρα σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0, αποκτούν δηλαδή καινούριες ιδιότητες και έναν διαφορετικό τρόπο να επιβιώνουν υπο αντίξοες συνθήκες.

Με βάση όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στο ακόλουθο μοντέλο:



Εικόνα 7.1: Προτεινόμενο μοντέλο της αλληλεπίδρασης της σηματοδότησης PI3k – p38MAPK – p70s6k στο σύστημα μας με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης

Σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή απουσία κάποιου αναστολέα, (εικόνα 7.1.A) η σηματοδότηση της PI3k ενεργοποιεί από τη μια το μονοπάτι mTORC1 και από την άλλη τον άξονα της p38MAPK. Η κινάση p38 αλληλεπιδρά πιθανώς με τον στόχο του mTORC1, p70s6k και αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για να περάσουν τα κύτταρα το σημείο ελέγχου της φάσης G2, να προχωρήσουν στη μίτωση και να ολοκληρώσουν τον κυτταρικό κύκλο.

Αντίθετα, η αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης p70s6k παρουσία RAPA οδηγεί σε απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς μετά την απομάκρυνσή της τα κύτταρα διέρχονται γρήγορα από τη φάση της μίτωσης και της κυτταροκίνησης. Ωστόσο, η ενεργοποίηση της κινάσης p38MAPK βοηθά τα κύτταρα να συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό έστω και απορυθμισμένα. Από την άλλη μεριά, η παρουσία RAPA σε συνδυασμό με την αναστολή της δράσης της κινάσης p38MAPK από τον BIRB (εικόνα 7.1.B) δεν επιτρέπει στα κύτταρα να συνεχίσουν τον πολλαπλασιασμό, χωρίς να οδηγούνται όμως σε κυτταρικό θάνατο. Αντ' αυτού, τα κύτταρα αναπτύσσουν έναν εναλλακτικό μηχανισμό επιβίωσης καθώς εισέρχονται σε μια κατάσταση ομοιάζουσα της G0 η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 και σχηματισμό μικροτριχιδίων.

#### **7.4 Συμπεράσματα – Προοπτικές**

Από την παρούσα μελέτη:

- Αναδεικνύεται για πρώτη φορά ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των κινασών mTOR – p38 – p70s6k είναι απαραίτητη για την ανάκαμψη του κυτταρικού κύκλου μετά την αναστολή του μονοπατιού: Ινσουλίνη/IGF1 – PI3k - mTOR.
- Αποκαλύπτεται ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο τα νευροβλαστωματικά κύτταρα σχηματίζουν πρωτογενή μικροτριχίδια, κάτι το οποίο δεν ήταν γνωστό.
- Διαπιστώνεται ότι τα μικροτριχίδια εκτός από ένα αισθητήριο όργανο του περιβάλλοντος μπορούν να εμφανίζονται και πιθανώς να δρουν ως τμήμα ενός σηματοδοτικού μηχανισμού απαραίτητου για την επιβίωση του κυττάρου υπό συνθήκες στρες, παρατήρηση που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Προς αυτή την κατεύθυνση έχει ήδη ξεκινήσει η μελέτη της επίδρασης των παραπάνω μονοπατιών στη βιολογία των νευρικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από

περιοχές νευρογένεσης του ενήλικου εγκεφάλου και η σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα του νευροβλαστωματικού μοντέλου. Βασικοί άξονες της μελέτης είναι οι μεταβολές στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κινασών mTOR – p38 – p70s6k σε σχέση με τη φάση G0 και τον σχηματισμό μικροτριχιδίων.

Η αντιμετώπιση καρκίνων όπως το νευροβλάστωμα με τη χρήση φαρμάκων (π.χ. rapalogs) τα οποία οδηγούν στην αναστολή του μονοπατιού PI3k – mTOR στοχεύοντας σε μόρια που βρίσκονται καθοδικά, όπως το σύμπλοκο mTORC1 ή η κινάση p70s6k, είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με αναστολείς μορίων που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, όπως η κινάση p38MAPK, δεν είναι αποτελεσματική επειδή, όπως είδαμε σε αυτή τη μελέτη, τα κύτταρα μπορεί να αποκτούν νέες ιδιότητες.

Αντίθετα, προσεγγίσεις που στοχεύουν σε μόρια που βρίσκονται ανοδικά στο μονοπάτι PI3k – mTOR (π.χ. μόρια με δράση ανάλογη του LY) σε συνδυασμό με την καταστολή της p38MAPK ή της Hsp90 θα μπορούσαν να αποτελούν έναν νέο τρόπο αντιμετώπισης καρκίνων όπως το νευροβλάστωμα. Στα πλαίσια αυτά, θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί με ποιον τρόπο μια τέτοια στρατηγική επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα.

## 8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 8.1 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 3.1:</b>	Σχηματική απεικόνιση των μορίων και των σημάτων που εμπλέκονται στην ενήλικη νευρογένεση .....	<b>10</b>
<b>Εικόνα 3.2:</b>	Απεικόνιση της ενεργοποίησης της PI3k και της Akt από την ινσουλίνη μέσω του υποδοχέα της.....	<b>12</b>
<b>Εικόνα 3.3:</b>	Οι στόχοι της κινάσης Akt.....	<b>13</b>
<b>Εικόνα 3.4:</b>	Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κινάσης Akt με το σύμπλοκο mTORC1 .....	<b>14</b>
<b>Εικόνα 3.5:</b>	Η ρύθμιση της σηματοδότησης mTOR.....	<b>15</b>
<b>Εικόνα 3.6:</b>	Οι λειτουργίες των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 .....	<b>17</b>
<b>Εικόνα 3.7:</b>	Σύνθεση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 και παρουσίαση των κύριων στόχων τους.....	<b>18</b>
<b>Εικόνα 3.8:</b>	Ρύθμιση της δράσης της πρωτεΐνης 4E-BP1 .....	<b>19</b>
<b>Εικόνα 3.9:</b>	Κύριοι στόχοι και ρόλοι της p70s6k .....	<b>21</b>
<b>Εικόνα 3.10:</b>	Κρυσταλλική δομή της PI3k παρουσία ATP ή LY294002 .....	<b>25</b>
<b>Εικόνα 3.11:</b>	Σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους δομών των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 .....	<b>26</b>
<b>Εικόνα 3.12:</b>	Απεικόνιση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και της σχέσης τους με το νευροβλάστωμα .....	<b>30</b>
<b>Εικόνα 3.13:</b>	Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και των σημείων ελέγχου του .....	<b>34</b>
<b>Εικόνα 3.14:</b>	Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε όλες τις φάσεις της μίτωσης .....	<b>36</b>
<b>Εικόνα 3.15:</b>	Οι κατηγορίες της φάσης G0 και η σχέση τους με τον κυτταρικό κύκλο ..	<b>37</b>
<b>Εικόνα 3.16:</b>	Σχηματική απεικόνιση των βασικών ρυθμιστών της προόδου του κυτταρικού κύκλου .....	<b>41</b>
<b>Εικόνα 5.1:</b>	Κυκλικός χάρτης του πλασμιδίου pCDNA το οποίο περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση p38α.....	<b>63</b>

<b>Εικόνα 5.2:</b>	Κυκλικός χάρτης του πλασμιδίου PCDNA το οποίο περιέχει το μεταλλαγμένο γονίδιο της αδρανούς μορφής της κινάσης p38.....	<b>63</b>
<b>Εικόνα 5.3:</b>	Χώρος μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer .....	<b>67</b>
<b>Εικόνα 5.4:</b>	Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής .....	<b>72</b>
<b>Εικόνα 5.5:</b>	Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR.....	<b>79</b>
<b>Εικόνα 5.6:</b>	Γραφικές παραστάσεις στις οποίες φαίνεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης .....	<b>83</b>
<b>Εικόνα 5.7:</b>	Τα βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE .....	<b>87</b>
<b>Εικόνα 6.1:</b>	Απεικόνιση του αριθμού των κυττάρων Neuro2A παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων LY και RAPA για 3 ημέρες.....	<b>94</b>
<b>Εικόνα 6.2:</b>	Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου παρουσιάζονται οι μεταβολές στη φωσφορυλίωση μορίων – στόχων των μονοπατιών PI3k – mTOR παρουσία των αναστολέων LY και RAPA για 3 ημέρες.....	<b>95</b>
<b>Εικόνα 6.3:</b>	Και οι δυο αναστολείς ασκούν ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να οδηγούν σε απόπτωση .....	<b>96</b>
<b>Εικόνα 6.4:</b>	Τα κύτταρα εξακολουθούν να ενσωματώνουν BrdU παρουσία RAPA .....	<b>98</b>
<b>Εικόνα 6.5:</b>	Απεικόνιση των μεταβολών στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου παρουσία των αναστολέων LY και RAPA .....	<b>99</b>
<b>Εικόνα 6.6:</b>	Ο αναστολέας LY μεταβάλλει τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ki67 και p27, ενώ η RAPA δεν τα επηρεάζει.....	<b>101</b>
<b>Εικόνα 6.7:</b>	Ο LY και η RAPA επηρεάζουν με αντίθετο τρόπο την πρωτεϊνική έκφραση του ογκογονιδίου C-MYC.....	<b>102</b>
<b>Εικόνα 6.8:</b>	Επίδραση των αναστολέων σε μόρια - κλειδιά του κυτταρικού κύκλου ....	<b>104</b>
<b>Εικόνα 6.9:</b>	Μελέτη της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης H3 στη Ser10 η οποία χαρακτηρίζει την όψιμη φάση G2 και την έναρξη της μίτωσης.....	<b>106</b>
<b>Εικόνα 6.10:</b>	(Αριστερά) Απεικόνιση της κατανομής της pH3 (Ser10) και της acetylated-tubulin στις διάφορες φάσεις της μίτωσης και της κυτταροκίνησης (Τροποποίηση από: Liet al., 2005). (Δεξιά) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της κατανομής της pH3(Ser10) και της ac-tubulin παρουσία RAPA για 5 ημέρες καθώς και στην καλλιέργεια ελέγχου .....	<b>107</b>



<b>Εικόνα 6.11:</b> Μελέτη της δημιουργίας ενδιάμεσων σωμάτων παρουσία LY και RAPA .....	<b>108</b>
<b>Εικόνα 6.12:</b> Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια.....	<b>110</b>
<b>Εικόνα 6.13:</b> Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων συνεχίζεται μετά την απομάκρυνση των αναστολέων .....	<b>111</b>
<b>Εικόνα 6.14:</b> Απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου παρουσία των αναστολέων καθώς και μετά την απομάκρυνσή τους .....	<b>112</b>
<b>Εικόνα 6.15:</b> Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ki67, p27 και c-Myc αυξάνονται δραματικά κατά την ανάκαμψη .....	<b>113</b>
<b>Εικόνα 6.16:</b> Επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων σε μόρια – κλειδιά του κυτταρικού κύκλου .....	<b>115</b>
<b>Εικόνα 6.17:</b> Μελέτη του αριθμού των pH3+ κυττάρων και των ενδιάμεσων σωμάτων μετά την απομάκρυνση των αναστολέων.....	<b>116</b>
<b>Εικόνα 6.18:</b> Ο LY αναστέλλει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενώ η RAPA επηρεάζει λιγότερο το δυναμικό διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων.....	<b>119</b>
<b>Εικόνα 6.19:</b> Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της απομάκρυνσης των αναστολέων στη διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro2A .....	<b>120</b>
<b>Εικόνα 6.20:</b> Επίδραση της απομάκρυνσης των αναστολέων στο δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων Neuro2A .....	<b>121</b>
<b>Εικόνα 6.21:</b> Απεικόνιση των μεταβολών στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt παρουσία LY και RAPA για 5 ημέρες καθώς και 3 ώρες ή 2 ήμερες μετά την απομάκρυνσή τους.....	<b>123</b>
<b>Εικόνα 6.22:</b> Απεικόνιση των μεταβολών στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των βασικών στόχων του μονοπατιού PI3k/mTOR .....	<b>124</b>
<b>Εικόνα 6.23:</b> Επίδραση της παρουσίας RAPA στην έναρξη του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY .....	<b>125</b>

<b>Εικόνα 6.24:</b> Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων 17AAG για 2 ημέρες στη φωσφορυλίωση στόχων του μονοπατιού PI3k – mTOR .....	<b>127</b>
<b>Εικόνα 6.25:</b> Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα 17AAG 3 ώρες μετά την απομάκρυνση του LY στους στόχους του μονοπατιού PI3k – mTOR .....	<b>128</b>
<b>Εικόνα 6.26:</b> Επίδραση της αναστολής της HSP90 στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY .....	<b>129</b>
<b>Εικόνα 6.27:</b> Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η επίδραση του LY και της RAPA για 5 ημέρες καθώς και η απομάκρυνσή τους (ανάκαμψη) στη φωσφορυλίωση της p38MAPK .....	<b>131</b>
<b>Εικόνα 6.28:</b> Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αναστολέα BIRB για 2 ημέρες στη φωσφορυλίωση στόχων του μονοπατιού PI3k – mTOR .....	<b>132</b>
<b>Εικόνα 6.29:</b> Απεικόνιση των μεταβολών στη φωσφορυλίωση της p70s6k και της p38 παρουσία LY ή RAPA για 5 ημέρες (5d) καθώς και κατά την ανάκαμψη απουσία ή παρουσία 5μM BIRB για 2 ημέρες .....	<b>133</b>
<b>Εικόνα 6.30:</b> Επίδραση της υπερέκφρασης της κινάσης p38 στην ενεργοποίηση της p70s6k .....	<b>135</b>
<b>Εικόνα 6.31:</b> Επίδραση της αναστολής της p38MAPK στην ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού μετά την απομάκρυνση του LY και της RAPA .....	<b>137</b>
<b>Εικόνα 6.32:</b> Η παρουσία BIRB μετά την απομάκρυνση της RAPA αυξάνει δραματικά τον αριθμό των κυττάρων που σχηματίζουν μικροτριχίδια.....	<b>138</b>
<b>Εικόνα 7.1:</b> Προτεινόμενο μοντέλο της αλληλεπίδρασης της σηματοδότησης PI3k – p38MAPK – p70s6k στο σύστημα μας με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.....	<b>148</b>

## 8.2 ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 5.1</b> ρησιμοποιούμενοι εκκινήτες.....	<b>64</b>
<b>Πίνακας 5.2:</b> Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR .....	<b>81</b>
<b>Πίνακας 5.3:</b> Σύσταση μίγματος Q-PCR και πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή .....	<b>84</b>
<b>Πίνακας 5.4:</b> Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	<b>89</b>

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κωλέττας Ευάγγελος, Κυτταρικός κύκλος. Σημειώσεις στα πλαίσια του μαθήματος Μοριακή Βιολογία Γονιδίου του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ». Ιωάννινα 2008.
2. Aberg M.A., Aberg N.D., Palmer T.D., Alborn A.M., Carlsson-Skwirut C., Bang P., Rosengren L.E., Olsson T., Gage F.H., Eriksson P.S. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol. Cell. Neuroscience* 24, 2003, pages 23-40.
3. Adams R.R., Carmena M. and Earnshaw W.C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *TRENDS in Cell Biology* Vol.11 No.2 February 2001.
4. Bamberger A.M., Pu L.P., Cool D.R., Loh Y.P. The Neuro-2a neuroblastoma cell line expresses [Met]-enkephalin and vasopressin mRNA and peptide. *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 113, Issue 2, 22 September 1995, Pages 155–163.
5. Bender A, Opel D, Naumann I, Kappler R, Friedman L, von Schweinitz D, Debatin KM, Fulda S. PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene*. 2011 Jan 27;30(4):494-503.
6. Bertoli C., De Bruin R. A. M. "Turning cell cycle entry on its head". *CELL DIVISION* 1 July 2014. *elifesciences.org*.
7. BERVEN L.A. and CROUCH M.F. Cellular function of p70S6K: A role in regulating cell motility. *Immunology and Cell Biology* (2000) 78, 447–451.
8. Bissler, J.J., McCormack, F.X., Young, L.R., Elwing, J.M., Chuck, G., Leonard, J.M., Schmithorst, V.J., Laor, T., Brody, A.S., Bean, J., et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *N. Engl. J. Med.* 358 (2008), 140–151.
9. BIOCHROM AG. Latest findings on heat in Latest findings on heat inactivation activation of sera. August 10, 2010.
10. Boller, D., Schramm, A., Doepfner, K. T., Shalaby, T., von Bueren, A. O., Eggert, A., Grotzer, M. A., Arcaro, A. Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110delta impairs growth and survival in neuroblastoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 1172- 1181.

11. Bolton W.E., Mikulka W.R., Healy C.G., Schmittling R.J., Kenyon N.S. Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of synchronized mammalian cells. *Cytometry*. 1992;13(2):117-26.
12. Brock Tom. The PI3k Pathway: Fast Forward For Cancer. Article Library Cayman Chemical. Cayman Chemical Company, Incorporated. Cancer 2009.
13. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar 3.
14. Brodeur, GM, Pritchard, J, Berthold, F, Carlsen, NL, Castel, V, Castelberry, RP, De Bernardi, B, Evans, AE, Favrot, M, Hedborg, F. "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment". *Journal of Clinical Oncology* 11 1993 (8): 1466–77.
15. Brodeur, G., Seeger, R., Schwab, M., Varmus, H., Bishop, J. "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage". *Science* 224 1984 (4653): 1121–4.
16. Brown J.P., Couillard-Després S., Cooper-Kuhn C.M., Winkler J., Aigner L., Kuhn H.G. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 467:1–10 (2003).
17. Buchkovich N.J., Yu Y., Zampieri C.A. and Alwine J.C. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K–Akt–mTOR signalling pathway. *Nature reviews, microbiology* volume 6, april 2008, 265.
18. Burrows F, Zhang H. and Kamal A. Hsp90 and Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle* 3:12, 1530 – 1536. December 2004.
19. Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1993. 6012–6023.
20. Chiang G.G. and Abraham R.T. Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 280, No. 27, Issue of July 8 2005, pp. 25485–25490.
21. Cetinkaya C., Hultquist A., Su Y., Wu S., Bahram F., Pålman S., Guzhova I., Larsson L.G. Combined IFN-gamma and retinoic acid treatment targets the

- N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Oct;6(10):2634-41.
22. Choi C.H., Lee B.H., Ahn S.G. and Oha S.H. Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012 Feb 24;418(4):759-64.
  23. Choudhury GG. Akt serine threonine kinase regulates platelet-derived growth factor-induced DNA synthesis in glomerular mesangial cells: regulation of c-fos and p27Kip1 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 276: 35636–35643.
  24. Chun-Do Oh, Song-Ja Kim, Jung-Won Ju, Woo Keun Song, Jae-Hong Kim, Yung Joon Yoo, Jang-Soo Chun. Immunosuppressant rapamycin inhibits protein kinase C  $\alpha$  and p38 mitogen-activated protein kinase leading to the inhibition of chondrogenesis. *European Journal of Pharmacology* 2001, 427, 3, 175-185.
  25. Clark A.S., West K., Streicher S, and Dennis P.A. Constitutive and Inducible Akt Activity Promotes Resistance to Chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 1, 707–717, July 2002.
  26. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* (2005) 24, 2796–2809.
  27. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *TRENDS in Cell Biology* Vol.13 No.2 February 2003.
  28. Cowley S., Paterson H., Kemp P., Marshall C.J. Activation of MAP Kinase Kinase Is Necessary and Sufficient for PC1 2 Differentiation and for Transformation of NIH 3T3 Cells. *Cell*, Vol. 77, 941-952, June 17, 1994.
  29. Crevel G., Bates H., Huikeshoven H. and Cotterill S. The Drosophila Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 cochaperone that interacts with DNA polymerase  $\alpha$ . *Journal of Cell Science* 114, 2015-2025 (2001).
  30. Cuenda A., Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *ScienceDirect. Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (2007) 1358–1375.
  31. Dang C.V. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis and Metabolism. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Jan. 1999, p. 1–11.

32. Dey-Guhaa I., Wolfer A., Yehb A.C., Albeckb J.G., Darpa R., Leona E., Wulfkuhlec J., Petricoin IIIc E.F., Wittnera B.S. and Ramaswamy S. Asymmetric cancer cell division regulated by AKT. PNAS, August 2, 2011, vol. 108, no. 31.
33. Dimberg A., Bahram F., Karlberg I., Larsson L.G., Nilsson K., Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). Blood. 2002 Mar 15;99(6):2199-206.
34. Dolezalova D., Mraz M., Barta T., Plevova K., Vinarsky V., Holubcova Z., Jaros J., Dvorak P., Pospisilova S., Hampl A. MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells. Stem Cells. 2012 Jul 30(7):1362-72.
35. Edinger A., Linardic C.M., Chiang G.G., Thompson C.B. and Abraham R.T. Differential Effects of Rapamycin on Mammalian Target of Rapamycin Signaling Functions in Mammalian Cells. CANCER RESEARCH 63, 8451–8460, December 1, 2003.
36. Ertmer A., Huber V., Gilch S., Yoshimori T., Erfle V., Duyster J., Elsasser H-P. and Schatzl H.M. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. Leukemia (2007) 21, 936–942.
37. Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and Alnemri E.S. CPP32, a Novel Human Apoptotic Protein with Homology to Caenorhabditis elegans Cell Death Protein Ced-3 and Mammalian Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 269, No. 49, Issue of December 9, pp. 30761-30764, 1994.
38. Frödin M. and Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Molecular and Cellular Endocrinology 151(1-2) 1999:Pages 65-77.
39. Fulda S. The PI3K/Akt/mTOR Pathway as Therapeutic Target in Neuroblastoma. Current Cancer Drug Targets, 2009, 9, 729-737.
40. Foster K.G. and Fingar D.C. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 19, pp. 14071–14077, May 7, 2010.
41. Gerdes J., Li L., Schlueter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Gerlach C., Stahmer I., Kloth S., Brandt E., and Flad H. D. Immunobiochemical and molecular biologic

- characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology*, Vol. 138, No. 4, April 1991.
42. GHARBI S.I., ZVELEBIL M.J., SHUTTLEWORTH S.J., HANCOX T., SAGHIR N., TIMMS J.F. and WATERFIELD M.D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* (2007) 404, 15–21.
  43. Giacinti C. and Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* (2006) 25, 5220–5227.
  44. Graham E.S., Ball N., Scotter E.L., Narayan P., Dragunow M. and Glass M. Induction of Krox-24 by Endogenous Cannabinoid Type 1 Receptors in Neuro2A Cells Is Mediated by the MEK-ERK MAPK Pathway and Is Suppressed by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 281, NO. 39, pp. 29085–29095, September 29, 2006
  45. Grasso S., Menéndez-Gutiérrez M. P., Carrasco-García E., Mayor-López L., Tristante E., Rocamora-Reverte L., Gómez-Martínez Á., García-Morales P., Ferragut J.A., Saceda M. and Martínez-Lacaci I. Cell Death and Cancer, Novel Therapeutic Strategies. "Apoptosis and Medicine". *Medicine*. Chapter 4.
  46. Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Richard A. Singer, and Margaret Werner-Washburne. "Sleeping Beauty": Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June 2004, p. 187–206 Vol. 68, No. 2.
  47. Hang H., Fox M.H. Analysis of the Mammalian Cell Cycle by Flow Cytometry. *Cell Cycle Checkpoint Control Protocols*. Volume 241 of the series *Methods in Molecular Biology™*, pp 23-35.
  48. Harper J., Wade E., Stephen J. "The DNA Damage Response: Ten Years After". *Molecular Cell* 28 (5) December 2007: 739–745.
  49. Hartwich J.E., Orr W. S., Ngc C.Y., Spencec Y., McLaughlinc J.M., Furmand W.L., McGregord L.M., Davidoff A.M. Rapamycin increases neuroblastoma xenograft and host stromal derived osteoprotegerin inhibiting osteolytic bone disease in a bone metastasis model. *Journal of Pediatric Surgery* Volume 48, Issue 1, January 2013, Pages 47–55.

50. Helbing C.C., Wellington C.L., Gogela-Spehar M., Cheng T., Pinchbeck G.G., Johnston R.N. Quiescence versus apoptosis: Myc abundance determines pathway of exit from the cell cycle. *Oncogene*. 1998 Sep 24;17(12):1491-501.
51. Hill M.M., Hemmings B.A. Inhibition of protein kinase B/Akt: implications for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 93 (2002) 243– 251.
52. Ho Shuk Wai, Tsui Yuk Tung Chanel, Wong Ting Ting, Cheung Stanley Kwok-Kuen, Goggins William B., Yi Lau Ming, Cheng Kwok Kin and Baum Larry. Effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) in transgenic mouse models of frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer’s disease. *Translational Neurodegeneration* 2013, 2:24.
53. Houle F., Huot J. Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer. *Mol Carcinog*. 2006 Jun;45(6):362-7.
54. Hsu J.Y., Sun Z.W., Li X., Reuben M., Tatchell K., Bishop D.K., Grushcow J.M., Brame C.J., Caldwell J.A., Hunt D.F., Lin R., Smith M.M., Allis C.D. Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes. *Cell*, Vol. 102, 279–291, August 4, 2000.
55. [http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell\\_culture.pdf](http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf)
56. <https://www.addgene.org/20352>
57. <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/control-of-the-cell-cycle-89/regulation-of-the-cell-cycle-at-internal-checkpoints-398-11625>.
58. <http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/patient/neuroblastoma-treatment-pdq#section/all>
59. [http://www.celeromics.com/Cell\\_Counting\\_with\\_Neubauer\\_Chamber/Basic\\_Hemocytometer\\_Usage](http://www.celeromics.com/Cell_Counting_with_Neubauer_Chamber/Basic_Hemocytometer_Usage)
60. <http://www.flemingtonlab.com/Protocols/PreparingCellsforFACS-PI.pdf>.
61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007335>
62. <http://www.slideshare.net/ouopened/sds-page-lecture>.
63. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)
64. Hu C.K., Coughlina M., and Mitchison T.J. Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Molecular Biology of The Cell*. 2012 Mar 23(6):1024-34.



65. Huang, X., and Saint-Jeannet, J.P. "Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge". *Dev. Biol.* 275, 2004, 1-11.
66. Ismail Heba M.S. Overexpression of S6 Kinase 1 in Brain Tumours Is Associated with Induction of Hypoxia-Responsive Genes and Predicts Patients' Survival. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Oncology* Volume 2012.
67. Johnsen, J. I., Segerstrom, L., Orrego, A., Elfman, L., Henriksson, M., Kagedal, B., Eksborg, S., Sveinbjornsson, B., Kogner, P. Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2008, 27, 2910-2922.
68. Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA. "Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1972, 69 (7): 1934–8.
69. Katholnig K1, Kaltenecker CC, Hayakawa H, Rosner M, Lassnig C, Zlabinger GJ, Gaestel M, Müller M, Hengstschläger M, Hörl WH, Park JM, Säemann MD, Weichhart T. p38a Senses Environmental Stress To Control Innate Immune Responses via Mechanistic Target of Rapamycin. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1519-27. doi: 10.4049/jimmunol.1202683. Epub 2013 Jan 11.
70. Khokhar N. Z., Altman J. K., and Platanius L. C. "Emerging roles for mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of solid tumors and hematological malignancies". *Current opinion in Oncology.* November 2011 - Volume 23 - Issue 6.
71. Kriegler M. *Transfer and Expression: A Laboratory Manual.* W. H. Freeman. 1991. pp. 96–97.
72. Kubista M., Manuel A.J., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Radek S., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stuhlberg A., Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125. 2006.
73. Kuma Y., Sabio G., Bain J., Shpiro N., Ma´rquez R. and Cuenda A. BIRB796 Inhibits All p38 MAPK Isoforms in Vitro and in Vivo. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 280, No. 20, Issue of May 20, pp. 19472–19479, 2005.
74. Laplante M. and Sabatini D.M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, April 13, 2012.

75. Laporte D., Courtout F., Salin B., Ceschin J., Sagot I. An array of nuclear microtubules reorganizes the budding yeast nucleus during quiescence. *The Journal of Cell Biology*. 2013 Nov 25, 203(4):585-94
76. Lee C. 2009. <http://arstechnica.com/science/2009/01/go-for-your-pcr/>
77. Lee ER, Kim JY, Kang YJ, Ahn JY, Kim JH, Kim BW, Choi HY, Jeong MY and Cho SG. Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1763(9):958-68. Epub 2006 Jun 27.
78. Lee K., Kenny A.E. and Rieder C.L. P38 Mitogen-activated Protein Kinase Activity Is Required during Mitosis for Timely Satisfaction of the Mitotic Checkpoint But Not for the Fidelity of Chromosome Segregation. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 21, 2150–2160, July 1, 2010.
79. Lehner B., Sandner B., Marschallinger J., Lehner C., Furtner T., Couillard-Despres S., Rivera F.J., Brockhoff G., Bauer H.C., Weidner N., Aigner L. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res*. 2011 Sep;345(3):313-28.
80. Li D.W., Yang Q., Chen J.T., Zhou H., Liu R.M., Huang X.T. Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell Research*. 2005 Feb;15(2):120-6.
81. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: One Drug, Many Effects. *Cell Metabolism* 19, March 4, 2014.
82. Li Z, Yan S, Attayan N, et al. Combination of an allosteric Akt Inhibitor MK-2206 with etoposide or rapamycin enhances the antitumor growth effect in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2012, 18:3603–3615.
83. Liu Zheng Z., Kumar A., Ota K., Wallner E.I., Kanwar Y.S. Developmental regulation and the role of insulin and insulin receptor in metanephrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 6758–6763, June 1997 *Cell Biology*.
84. Löbrich M., Jeggo P.A. "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction". *Nature Reviews Cancer* 7, November 2007 (11): 861–869.

85. Ma X.M. and Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 307-318. May 2009.
86. Machida M., Fujimaki S., Hidaka R., Asashima M. and Kuwabara T. The Insulin Regulatory Network in Adult Hippocampus and Pancreatic Endocrine System. Hindawi Publishing Corporation. *Stem Cells International*. Volume 2012.
87. Mahller Y Y., Williams J P., Baird W. H., Mitton B., Grossheim J., Saeki Y., Cancelas J.A., Ratner N., Cripe T.P. Neuroblastoma Cell Lines Contain Pluripotent Tumor Initiating Cells That Are Susceptible to a Targeted Oncolytic Virus. *PLoS ONE*, 1 January 2009, Volume 4, Issue 1.
88. Malumbres M., Barbacid M. "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm". *Nature Reviews* March 2009. *Cancer* 9 (3): 153–166.
89. Marsh, D.J., Trahair, T.N., Martin, J.L., Chee, W.Y., Walker, J., Kirk, E.P., Baxter, R.C., and Marshall, G.M. Rapamycin treatment for a child with germline PTEN mutation. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 2008, 357–361.
90. Marshall G.M., Carter D.R., Cheung B.B., Liu T., Mateos M.K., Meyerowitz J.G. and Weiss W.A. The prenatal origins of cancer. *NATURE REVIEWS. CANCER* VOLUME 14. APRIL 2014.
91. Martini M., Ciralo E., Gulluni F. and Hirsch E. Targeting PI3K in cancer: any good news? *Frontiers in Oncology*. May 2013. Volume 3. Article 108.
92. Martelli A. M., Chiarini F., Evangelisti C., Cappellini A., Buontempo F., Bressanin D., Fini M., and McCubrey J. A. 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.
93. Mei H., Wang Ye, Lin Z. and Tong Q. The mTOR Signaling Pathway in Pediatric Neuroblastoma. *Pediatric Hematology and Oncology*, 30:605–615, 2013.
94. Meyuhas O. and Drazan A. Ribosomal Protein S6 Kinase: From TOP mRNAs to Cell Size. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 90,2009.
95. Mendoza M. C., Er E. E., and Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011 June ; 36(6): 320–328.
96. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Kung AL, Davies FE, Morgan G, Akiyama M, Shringarpure R, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D,

- Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Rosen NS, Anderson KC. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1092-100.
97. Mizuarai S., Kawagishi A. and Kotani H. Inhibition of p70S6K2 down-regulates Hedgehog/GLI pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Molecular Cancer* 2009.
98. National Cancer Institute. "Neuroblastoma Treatment". Retrieved 2008-07-30.
99. Oesterle E.C., Chien W.M., Campbell S., Nellimarla P., Fero M.L. p27Kip1 is required to maintain proliferative quiescence in the adult cochlea and pituitary. *Cell Cycle* 10:8, 1237-1248. April 15, 2011.
100. Opel D., Poremba C., Simon T., Debatin Klaus-Michael and Fulda S. Activation of Akt Predicts Poor Outcome in Neuroblastoma. *Cancer Res* 2007.
101. Ornelas I.M., Silva T.M., Fragel-Madeira L., Marques Ventura Ana Lucia. Inhibition of PI3K/Akt Pathway Impairs G2/M Transition of Cell Cycle in Late Developing Progenitors of the Avian Embryo Retina. *PLOS ONE*. 1 January 2013. Volume 8. Issue 1.
102. Papst P.J., Sugiyama H., Nagasawa M. Lucas J.J., Maller J.L. and Terada N. Cdc2-Cyclin B Phosphorylates p70 S6 Kinase on Ser<sup>411</sup> at Mitosis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 273, No. 24, Issue of June 12, pp. 15077–15084, 1998 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
103. Paul's Biology Page. <http://brentbiology.weebly.com/cell-cycle.html>.
104. Platani M., Trinkle-Mulcahy L., Porter M., Jeyaprakash A. A. and Earnshaw W.C. Mio depletion links mTOR regulation to Aurora A and Plk1 activation at mitotic centrosomes. *The Journal of Cell Biology*. June 29, 2015.
105. Q&A: WHY HEAT INACTIVATE FETAL BOVINE SERUM (FBS)? DIFFERENCE BETWEEN FBS AND HEAT INACTIVATED FBS. *Sympo(sci)um*. 13/07/2012.
106. Rafalski V.A., Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in Neurobiology* 93 2011. 182-203.
107. Rane M.J., Coxon P.Y., Powell D.W., Webster R., Klein J.B., Pierce W., Ping P. and McLeish K.R. p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 Activation Functions as 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-2 for Akt in Human Neutrophils. *THE JOURNAL*

OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 276, No. 5, Issue of February 2, pp. 3517–3523, 2001.

108. Reiske H., Sui B., Ung-Medoff H., Donahue R., Li W.B., Goldblatt M., Li L., Kinch M.S. Identification of annexin A13 as a regulator of chemotherapy resistance using random homozygous gene perturbation. *Anal Quant Cytol Histol.* 2010 Apr;32(2):61-9.
109. Ressurreição M., Rollinson D., Emery A.M, Walker A.J. A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. *BMC Cell Biology* 2011, 12:6.
110. Rossi R., Pester J. M., McDowell M., Soza S., Montecucco A. and Lee-Fruman K. K. IDENTIFICATION OF S6K2 AS A CENTROSOME-LOCATED KINASE. *FEBS Lett.* 2007 August 21; 581(21): 4058–4064.
111. Rousseau S., Houle F., Kotanides H., Witte L., Waltenberger J., Landry J., Huot J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10661-72.
112. Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-independent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 1994, 35–43.
113. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn T., Mullis K.B., and Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 1988, 487-491
114. Sato S., Fujita N. and Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. 10832–10837, *PNAS*, September 26, 2000, vol. 97, no. 20.
115. Sambrook J. and Russell DW, 2001, *Molecular Cloning: A laboratory manual*,. 3rd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
116. Sambrook J. and Russell DW. Amplification of cDNA generated by reverse transcription of mRNA. *CSH Protoc.* 2006 Jun 1.
117. Samkari A., Cooper Z. A, Holloway M. P, Liu J., Altura R. A. Rapamycin induces the anti-apoptotic protein survivin in neuroblastoma. *Int J Biochem Mol Biol* 2012;3(1):28-35.

118. SAUNDERS R.N., METCALFE M.S., and NICHOLSON M.L. Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. *Kidney International*, Vol. 59, 2001, pp. 3–16.
119. Seeger-Nukpezah T., Little J.L., Serzhanova V. and Golemis E.A. Cilia and cilia-associated proteins in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2013 Dec 1;10(3-4):e135-e142.
120. Seki A., Coppinger J A., Jang C., Yates III J.R. and Fang G. Bora and Aurora A Cooperatively Activate Plk1 and Control the Entry into Mitosis. *Science*. 2008 June 20; 320(5883): 1655–1658.
121. Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells. 2000. *Cancer Res*. 60,3504 –3513.
122. Sen B., Xie Z., Case N., Thompson W.R., Uzer G., Styner M., and Rubin J. mTORC2 regulates mechanically induced cytoskeletal reorganization and lineage selection in marrow derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 2014 January 29(1).
123. Scholzen T1, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 182:311–322, 2000.
124. Schreiber K.H., Ortiz D., Academia E.C., Anies A.C., Liao Chen-Yu and Kennedy B.K. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell* 2015, 14, pp265–273.
125. Shen Q., Zheng X., McNutt M.A., Guang L., Sun Y., Wang J., Gong Y., Hou L., Zhang B. NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Experimental Cell Research*. 2009 Jun 10;315(10):1653-67.
126. Showkat M., Beigh M.A., and Andrabi K.I. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. Hindawi Publishing Corporation. *Molecular Biology International*, Volume 2014, Article ID 686984.

127. Singleton, J. R., Randolph, A. E., Feldman, E. L. Insulin-like growth factor I receptor prevents apoptosis and enhances neuroblastoma tumorigenesis. *Cancer Res.* 1996, 56, 4522-4529.
128. Tansey W.P. Mammalian MYC Proteins and Cancer. Hindawi Publishing Corporation New Journal of Science. Volume 2014, Article ID 757534, 27 pages.
129. Tchaikovski V., Fellbrich G., Waltenberger J. The Molecular Basis of VEGFR-1 Signal Transduction Pathways in Primary Human Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* November 29, 2007.
130. Tchevkina Elena and Komelkov Andrey. Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, "Protein Phosphorylation in Human Health" Chapter 1.
131. Terada Y., Inoshita S., Nakashima O., Kuwahara M., Sasaki S., Marumo F. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney International* 1999 Oct. 56(4):1258-61.
132. Terradellas E.C., Tato I., Bartrons R., Ventura F. and Rosa J.L. ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783. 2008. 2241–2254.
133. Thomson A.W., Turnquist H.R. and Raimondi G. Immunoregulatory Functions of mTOR Inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009 May 9.
134. Tischler A.S. Triple immunohistochemical staining for bromodeoxyuridine and catecholamine biosynthetic enzymes using microwave antigen retrieval. *J Histochem Cytochem.* 1995 Jan;43(1):1-4.
135. Tollenaere M.A.X., Mailand N. and Bekker-Jensen S. Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. 72:11–23.
136. Tremblay R.G., Sikorska M., Sandhu J.K., Lanthier P., Ribocco-Lutkiewicz M., Bani-Yaghoub M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods.* Volume 186, Issue 1, 30 January 2010, Pages 60–67.
137. Tsai W.B., Aiba I., Long Y., Lin H.K., Feun L., Savaraj N., Kuo M.T. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res.* 2012 May 15;72(10):2622-33.

138. Ulrich H.D. & Takahashi T. Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* (2013) 122:259–274.
139. Van der Valk J.B.F., Vijverberg H.P.M. Neuroblastoma cells as possible model in the study of glutamate receptors. *Amino Acids* 1991. 1:91-95.
140. VELAND I.R., LINDBÆK L. AND CHRISTENSEN S.T. Linking the Primary Cilium to Cell Migration in Tissue Repair and Brain Development. *BioScience*. December 2014. Vol. 64 No. 12.
141. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic". *J. Antibiot.* 28 (10) October 1975: 721–6.
142. Vivanco I. and Sawyers C.L. THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE–AKT PATHWAY IN HUMAN CANCER. *NATURE REVIEWS. CANCER VOLUME 2. JULY 2002.*
143. Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., and Brown R.F. A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-l-benzopyran-4-one (LY294002). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 269, No. 7, Issue of February 18, pp. 5241-5248, 1994.
144. Wall M., Poortinga G., Hannan K.M., Pearson R.B., Hannan R.D., McArthur G.A. Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood, Hematopoiesis and Stem Cells*. 2008 Sep 15, 112(6):2305-17.
145. Wang J., Wang H., Li Z., Wu Q., Lathia J.D., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One*. 2008;3(11):e3769.
146. Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: A new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2009;8(8). August 2009.
147. Weisburger E.K. Mechanisms of carcinogenesis. *Cancer Growth and progression* 1989. Page 94.
148. Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007 Jul 19, 448(7151):318-24.
149. West K.A, Castillo S. S., Dennis P.A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*, Volume 5, Issue 6, December 2002, Pages 234–248.



150. Winzen R., Kracht M., Ritter B., Wilhelm A., Chen C.Y., Shyu A.B., Müller M., Gaestel M., Resch K., Holtmann H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine induced mRNA stabilization via MAP kinase activated protein kinase 2 and an AU-rich region targeted mechanism. *The EMBO Journal* Vol.18 No.18 pp.4969–4980, 1999.
151. Wong M.L. and Medrano J.P. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39. 2005.
152. Wood C. D., Thornton T. M., Sabio G., Davis R. A., and Rincon M. Nuclear Localization of p38 MAPK in Response to DNA Damage. *International Journal of Biological Sciences* 2009, 5(5):428-437.
153. Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.10 No.2 February 2004.
154. Wu Peng and Hu Yongzhou. Small molecules targeting phosphoinositide 3-kinases. *Medicinal Chemistry Communications* 2012.
155. Yang K., Hitomi M. and Stacey D.W. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Division*. 2006 Dec 18, 1:32.
156. Yamashita R., Suzuki Y., Takeuchi N., Wakaguri H., Ueda T., Sugano S. and Nakai K. Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, No. 11 3707–3715.
157. Yu, S.W., Baek, S.H., Brennan, R.T., Bradley, C.J., Park, S.K., Lee, Y.S., Jun, E.J., Lookingland, K.J., Kim, E.K., Lee, H., Goudreau, J.L., Kim, S.W., Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Stem Cells* 26. 2602–2610. 2008.
158. Zeng M., Zhou J.N. Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cellular Signalling* 20. 2008. 659–665.
159. Zhou H., Luo Y., and Huang S. Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010 September 1.