

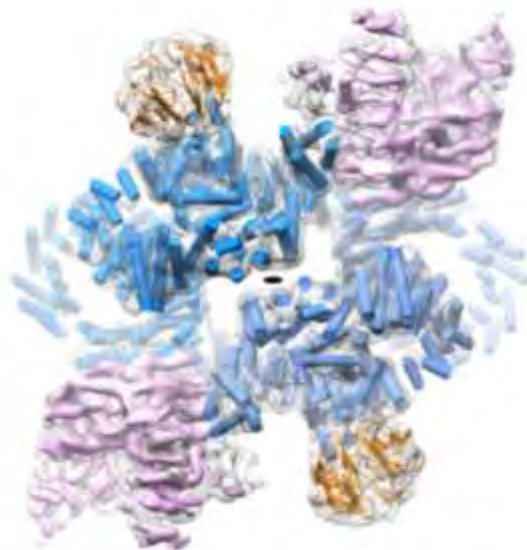
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC2 σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες οξειδωτικού στρες”

“The role of mTORC2 signaling pathway in control and oxidative stress conditions”



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Δήμητρα Τσολιάκου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Επαμεινώνδας Δοξάκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας

Λάρισα, 2019

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

Υπεύθυνος Ερευνητής

Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Τριμελής Επιτροπή

Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γκάγκος Σαράντης, Ερευνητής Β', ΙΙΒΕΑΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) παίζει κύριο ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού. Το mTOR αποτελεί συστατικό δύο διακριτών πρωτεϊνικών συμπλοκών, του mTOR συμπλόκου 1 (mTORC1) και το mTOR συμπλόκου 2 (mTORC2). Βασικό στοιχείο του mTORC1 αποτελεί η πρωτεΐνη RAPTOR, ενώ του mTORC2 οι πρωτεΐνες RICTOR και mSIN1. Το mTORC1 σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται σε ένα σύνολο διαδικασιών, όπως η σύνθεση των πρωτεϊνών και η ρύθμιση της αυτοφαγίας και η ενεργοποίηση του οφείλεται στους αυξητικού παράγοντες, τα επίπεδα ενέργειας και οξυγόνου αλλά και στην καταστροφή του DNA. Αντίθετα, ο ρόλος του mTORC2 σηματοδοτικού μονοπατιού είναι λιγότερο γνωστός καθώς και οι παράγοντες που το ενεργοποιούν. Το mTORC2 έχει βρεθεί να επηρεάζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη κυτταρική μετανάστευση, ενώ ενεργοποιείται και αυτό από αυξητικούς παράγοντες. Η πρωτεΐνη AKT αποτελεί τον πιο γνωστό στόχο του mTORC2, την οποία φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο Ser473. Εξαιτίας της σύνδεσης του mTOR με τόσες διεργασίες, η δυσλειτουργία των συμπλοκών έχουν εμπλακεί σε ένα σύνολο ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η παχυσαρκία και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι. Στη παρούσα πτυχιακή εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος του mTORC2 στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για αυτόν τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T στην οποία έγιναν υπερέκφρασεις των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1 σε συνθήκες παρουσία ή απουσία του χημικού CCCP. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν shRNA για τις ίδιες πρωτεΐνες στις ίδιες συνθήκες. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε ανοσοσύτρωμα κατά Western όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι αντι-αποπτωτικών και αποπτωτικών πρωτεϊνών. Ο κυτταρικός θάνατος μετρήθηκε, επιπλέον, με την δοκιμασία LDH και με την βοήθεια κυτταρομετρίας ροής κατά την οποία προηγήθηκε χρώση των αποπτωτικών κυττάρων με Annexin V συνδεδεμένη με FITC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το mTORC2 προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, ενώ το mTORC1 επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες υπερέκφρασης τόσο παρουσία όσο και απουσία του χημικού. Τα αντίθετα αποτελέσματα φάνηκαν στις συνθήκες με CCCP όταν χρησιμοποιήθηκαν shRNA για το RICTOR και το RAPTOR.

ABSTRACT

The mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) protein plays a central role in the regulation of cellular growth and metabolism. The mTOR is a component of two distinct protein complexes termed mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). RAPTOR is the regulatory component of mTORC1 contrary to RICTOR and mSIN1 which are the regulatory components of mTORC2. The mTORC1 signaling pathway is involved in several processes including protein synthesis and regulation of autophagy and its upstream activation is mediated by growth factors, ATP and oxygen levels, and DNA damage. In contrast, the role of mTORC2 signaling pathway is less well-known as are its activation factors. mTORC2 is also activated by growth factors and has been found to regulate cytoskeleton organization and cell migration. The best known substrate of mTORC2 is the AKT protein kinase which is phosphorylated at Ser473. Due to the association of mTOR with many processes, deregulation of mTOR complexes have been implicated in a number of pathological conditions, including cancer, obesity and neurodegeneration diseases. In this study, we investigated the role of mTORC2 in the regulation of cell survival under control and oxidative stress conditions. For this purpose, the HEK293T cell line was used to overexpress or silence using shRNAs RICTOR, RAPTOR and mSIN1 proteins under control or pro-apoptotic conditions. Western immunoblotting was employed to detect expression of both anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. Cell death was, further, assessed by the LDH assay and Annexin V-based flow cytometry. The results indicated that mTORC2 overexpression protects cells against CCCP-induced stress whereas mTORC1 overexpression promotes cell death in both control and stress conditions. The reverse effects were observed when shRNAs for RICTOR and RAPTOR were employed.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ανακάλυψη της mTOR πρωτεΐνης.....	7
1.2 mTOR σύμπλοκα.....	7
1.2.1 Δομή του mTORC1 και του mTORC2.....	8
1.3 mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι.....	10
1.3.1 Ρυθμιστές ανοδικά του mTORC1.....	10
1.3.2 Ρυθμιστές ανοδικά του mTORC2.....	13
1.3.3 Ρυθμιστές καθοδικά του mTORC1.....	15
1.3.4 Ρυθμιστές καθοδικά του mTORC2.....	17
1.4 Ασθένειες που σχετίζονται με το mTOR.....	18
1.5 Σκοπός.....	21
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
2.1 Κυτταρικά συστήματα.....	21
2.2 Φορείς κλωνοποίησης.....	22
2.3 Διαλύματα.....	24
2.4 Φαρμακολογικοί παράγοντες.....	25
2.5 Αντισώματα.....	25
2.6 Μέθοδοι.....	26
2.6.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	26
2.6.2 Διαμόλυση κυτταρικών σειρών.....	26
2.6.3 Ανοσοσύτρωμα κατά Western.....	27
2.6.4 Λύση κυττάρων.....	27
2.6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	27
2.6.6 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα.....	28
2.6.7 Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα.....	

και εμφάνιση σε φιλμ	28
2.6.8 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων	29
2.6.9 Στατιστική επεξεργασία.....	29
2.6.10 Δοκιμασία LDH.....	29
2.6.11 Κυτταρομετρία ροής.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Διερεύνηση του ρόλου του mTORC2 στην απόπτωση.....	33
3.2 Μέτρηση της κυτταρικής θνησιμότητας.....	37
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

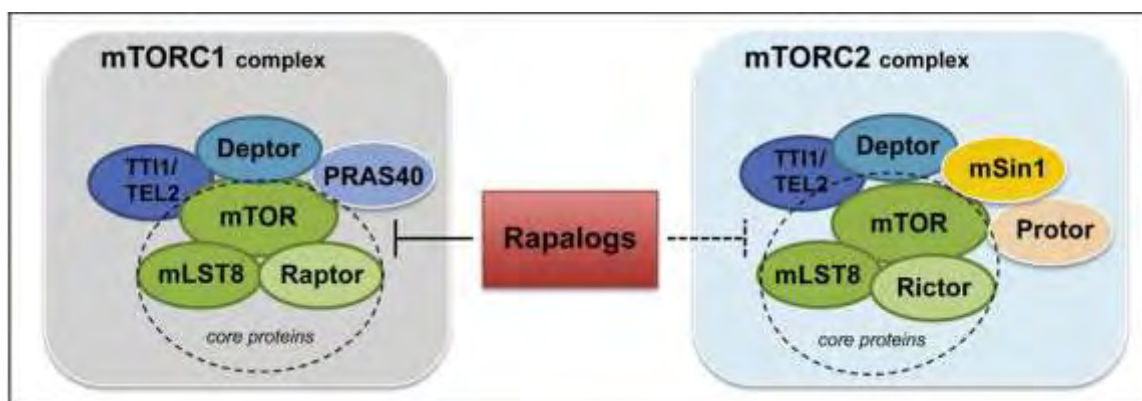
1.1 Ανακάλυψη της mTOR πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη mTOR (Mammalian/mechanistic target of rapamycin) αποτελεί τον κύριο στόχο του μορίου ραπαμυκίνη ή σιρόλυμους, όπως αναφέρεται κλινικά. Η ραπαμυκίνη, ένα αντιβιοτικό που ανήκει στην οικογένεια των μακρολιδών, παράγεται από το βακτήριο του εδάφους *Streptomyces Hygroscopicus* και αρχικά κέρδισε το ενδιαφέρον ως ένα μόριο με αντιμυκητιακές, ανοσοκατασταλτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Eng et al., 1984; Martel et al., 1977). Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι δρα σχηματίζοντας ένα gain-of-function σύμπλοκο με την πεπτιδιλ-προλυυσομεράση FKBP12 (12kDa FK506-binding protein) προκειμένου να αναστείλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Chung et al., 1992). Παρόλα αυτά, ο πλήρης μηχανισμός δράσης της ραπαμυκίνης δεν ήταν γνωστός μέχρι το 1994, όπου βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν το mTOR ως τον κύριο στόχο του συμπλόκου ραπαμυκίνη-FKBP12 (Sabatini et al., 1994).

1.2 mTOR σύμπλοκα

Το mTOR είναι μια “άτυπη” πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των PIKK κινασών (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) και αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες σχηματίζοντας, έτσι, δύο διακριτά σύμπλοκα, το mTOR σύμπλοκο 1 (mTORC1) και το mTOR σύμπλοκο 2 (mTORC2) (Εικόνα 1). Τα δύο αυτά σύμπλοκα μοιράζονται την καταλυτική υπομονάδα mTOR, καθώς επίσης το mLST8 (Mammalian lethal with Sec13 protein 8, γνωστό και ως GβL), το DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) και το σύμπλοκο TTI1/TEI2. Επιπρόσθετα με τις παραπάνω πρωτεΐνες, το mTORC1 περιλαμβάνει το RAPTOR (Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin) και την PRAS40 (Proline-rich Akt substrate 40 kDa), σε αντίθεση με το mTORC2 που περιλαμβάνει το RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), το mSIN1 (Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1), και το PROTON1/2 (Protein observed with rictor 1 and 2). Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, τα τρία βασικά στοιχεία του mTORC1 είναι το mTOR, το RAPTOR και το mLST8 και αντίστοιχα το mTOR, το RICTOR και το mLST8 για το mTORC2. Το σύμπλοκο FKBP12-ραπαμυκίνη αλληλεπιδρά άμεσα και αναστέλλει μόνο το mTOR όταν αυτό αποτελεί μέρος του συμπλόκου mTORC1 αλλά όχι του mTORC2, χαρακτηρίζοντας έτσι το πρώτο σύμπλοκο ευαίσθητο στην ραπαμυκίνη και το δεύτερο μη ευαίσθητο (Laplante & Sabatini, 2012). Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση του mTORC2 στη ραπαμυκίνη και ανάλογά της (Rapalogs) διαταράσσουν το σύμπλοκο, παρεμποδίζοντας την ενσωμάτωση του mTOR στο mTORC2 (Lamming et al., 2012; Sarbassov et al., 2006).

Η παρουσία κάθε πρωτεΐνης στα σύμπλοκα αυτά εξυπηρετεί διαφορετικό σκοπό. Συγκεκριμένα, το RAPTOR διευκολύνει την πρόσληψη του υποστρώματος στο mTORC1 μέσω δέσμευσης στο μοτίβο TOR σηματοδότησης (TOR signaling motif, TOS) το οποίο έχει βρεθεί στα υποστρώματα του mTORC1, αλλά επίσης απαιτείται και για την σωστή υποκυτταρική τοποθέτηση του mTORC1. Θεωρείται ότι το RICTOR εξυπηρετεί έναν παρόμοιο σκοπό, καθώς η απαλοιφή του RICTOR οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του mTORC2. Το mLST8, από την άλλη σχετίζεται με την καταλυτική περιοχή του mTORC1 και ενδέχεται να σταθεροποιεί τον βρόχο ενεργοποίησης της κινάσης, αν και οι γενετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι δεν σχετίζεται με τις βασικές λειτουργίες του συμπλόκου. Στα σύμπλοκα του mTOR το PRAS40 και το DEPTOR αποτελούν ανασταλτικές υπομονάδες (Peterson et al., 2009; Sancak et al., 2007), ενώ το mSIN1, είτε απαιτείται για την έκφραση του RICTOR, είτε για την σταθερότητα του στο mTORC2 (Frais et al., 2006). Τέλος, το PROTON1/2 δεσμεύεται στο mTORC2 περιφερειακά μέσω του RICTOR και του mSIN1, δεν απαιτείται για την συναρμολόγηση του συμπλόκου, αλλά ο ρόλος του δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Τέλος, οι πρωτεΐνες TTI1/TEL2 λειτουργούν ως ικρίωμα για την συναρμολόγηση και την σταθερότητα τόσο του mTORC1 όσο και του mTORC2 (Laplante & Sabatini, 2012).



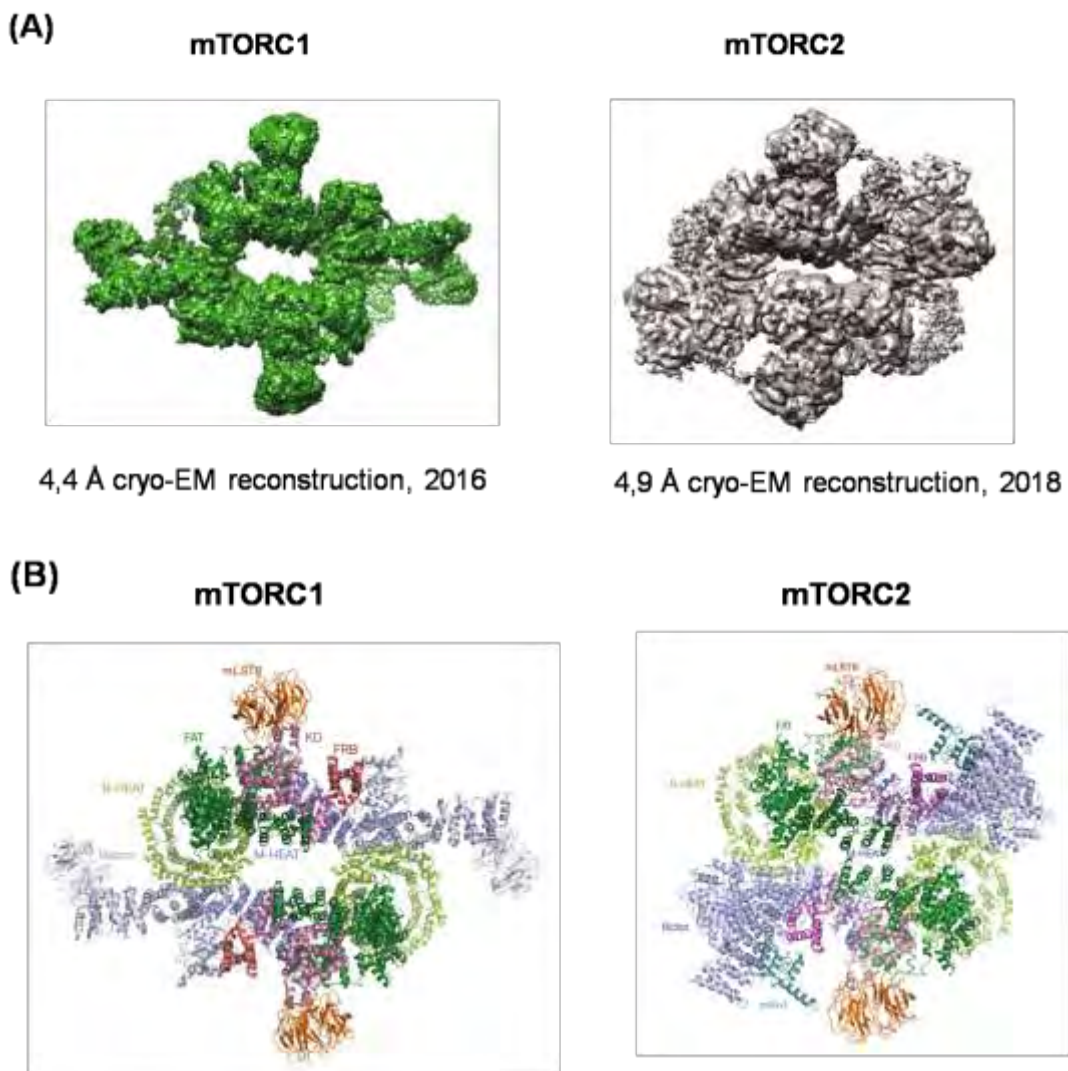
Εικόνα 1 mTOR σύμπλοκα. Το mTORC1 αποτελείται από το mTOR, το RAPTOR, το mLST8, το PRAS40, το DEPTOR και το σύμπλοκο TTI1/TEL2. Το σύμπλοκο αυτό είναι ευαίσθητο στην ραπαμυκίνη. Το mTORC2 αποτελείται από το mTOR, το RICTOR, το mLST8, το mSIN1, το DEPTOR, το σύμπλοκο το TTI1/TEL2 και το PROTON. Το σύμπλοκο αυτό χαρακτηρίζεται μη ευαίσθητο στην ραπαμυκίνη (Perluigi et al., 2015).

1.2.1 Δομή του mTORC1 και του mTORC2

Δομικές μελέτες για τα mTOR σύμπλοκα αποκάλυψαν σημαντικές πληροφορίες για την συναρμολόγηση των συμπλόκων και τη λειτουργία τους. Με την βοήθεια της κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Cryo-electron microscopy, cryo-EM), αναπαραστάσεις τόσο του mTORC1 όσο και του mTORC2 αποκάλυψαν ότι τα σύμπλοκα αυτά έχουν κοινή αρχιτεκτονική (Εικόνα 2A). Αποτελούνται από δύο αντίγραφα των υπομονάδων τους, σχηματίζοντας έτσι μια κοιλότητα, η λειτουργία της οποίας είναι προς το παρόν άγνωστη. Έχει προταθεί, ωστόσο, ότι παρέχει μια

επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τους ρυθμιστές των συμπλόκων που βρίσκονται ανοδικά. (Gaubitz et al., 2015)

Επιπλέον, κρυσταλλικές δομές της περιοχής της mTOR κινάσης (Εικόνα 2B), δείχνουν ότι ο βρόχος ενεργοποίησης είναι μια εγγενώς ενεργή διαμόρφωση, δηλαδή το αποτέλεσμα της mTORC1 σηματοδότησης ρυθμίζεται από ελεγχόμενη πρόσβαση των υποστρωμάτων. Αυτό έχει προταθεί ότι συμβαίνει μέσω δύο δομικών περιοχών του mTOR, την περιοχή δέσμευσης FKBP12-rapamycin (FKBP12-rapamycin binding domain, FRB) και το στοιχείο δέσμευσης του mLST8 (Lst8 binding element, LBE), τα οποία δημιουργούν μια εσοχή και έτσι παρεμποδίζουν την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Βασιζόμενοι σε αυτό το μοντέλο, η σύνδεση FKBP12-rapamycin αναστέλλει την mTORC1 σηματοδότηση περιορίζοντας περαιτέρω την πρόσβαση του υποστρώματος στην ενεργό θέση. Αντίστοιχα, το mTORC2 είναι μη ευαίσθητο στην δράση της ραπαμικίνης, καθώς το καρβόξυ-τελικό άκρο του RICTOR εμποδίζει στερικά την πρόσβαση στην FRB περιοχή. (Gaubitz et al., 2016)



Εικόνα 2 Σύγκριση της δομής του mTORC1 και του mTORC2. (A) Αναπαραστάσεις της κρυσταλλικής δομής της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ υψηλής ανάλυσης 4,4 Å για το mTORC1 (Yang et al., 2016) και 4,9 Å για το mTORC2 (Chen et al., 2018). (B) Συνολική δομή του mTORC1 (PDB: 5H64) και του mTORC2 (PDB: 5ZCS) όπου η κάθε περιοχή και οι υπομονάδες συμβολίζονται με διαφορετικά χρώματα (Yang et al., 2018).

1.3 mTOR μονοπάτι σηματοδότησης

Το mTOR μονοπάτι δέχεται πολυάριθμα εξωκυτάρια και ενδοκυτάρια σήματα που δείχνουν εάν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για αναβολικές διεργασίες. Έτσι, το mTORC1 ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, ινσουλίνης και IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), τα επίπεδα αμινοξέων και γλυκόζης, την κυτταρική ενεργειακή κατάσταση και τα επίπεδα οξυγόνου. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει κύριες λειτουργίες του κυττάρου, όπως την αυτοφαγία, την πρωτεϊνική και τη λιπιδιακή σύνθεση. Το mTORC2, ως το λιγότερο καλά μελετημένο σύμπλοκο, είναι γνωστό, μέχρι στιγμής, ότι ενεργοποιείται μετά την διέγερση του κυττάρου από την ινσουλίνη, τον IGF1 και την λεπτίνη (Kennedy et al., 2016).

1.3.1 Ρυθμιστές ανοδικά του mTORC1

Αυξητικοί παράγοντες

Το TSC (tuberous sclerosis complex), ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από το TSC1 (Tuberous sclerosis 1), το TSC2 και το TBC1D7 (Dibble et al., 2012), αποτελεί έναν ανοδικό ρυθμιστή του mTORC1 που λειτουργεί ως ένα σύμπλοκο που προσδένεται στις Ras πρωτεΐνες RHEB (Ras homology enriched in brain) ενεργοποιώντας την GTPάση δομή της. Η συνδεδεμένη με GTP μορφή του RHEB αλληλεπιδρά άμεσα με το mTORC1 και διεγείρει ισχυρά την δραστικότητα κινάσης του. Αντίθετα, το TSC ρυθμίζει αρνητικά το mTORC1 μετατρέποντας το RHEB στην ανενεργή GDP- δεσμευμένη κατάσταση του (Tee et al., 2003).

Το TSC εμπλέκεται στα ανοδικά μηνύματα που καταλήγουν στο mTORC1, συμπεριλαμβανομένου των αυξητικών παραγόντων, όπως είναι η ινσουλίνη και ο IGF1 (Insulin-like growth factor 1), τα οποία διεγείρουν τα PI3K και Ras μονοπάτια (Inoki et al., 2002). Όσον αφορά το PI3K μονοπάτι, η κινάση PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα φωσφορυλιώνει την PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate) και την μετατρέπει σε PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate). Η AKT ή αλλιώς PKB (Protein kinase B) μέσω της PH δομής (Pleckstrin-homology domain) δεσμεύει την PIP3 και φωσφορυλιώνεται από την PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1) στο κατάλοιπο Thr308 που εντοπίζεται στον βρόχο ενεργοποίησης (activation loop) και στο κατάλοιπο Ser473 από το mTORC2 στην καρβόξυ-τελική ουρά. Με την σειρά της η AKT/PKB φωσφορυλιώνει άμεσα το σύμπλοκο TSC προκειμένου να το απενεργοποιήσει και να επιτρέψει με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση του mTORC1 (Wu et al., 2009). Ταυτόχρονα, η AKT επιδρά στο mTORC1 με έναν τρόπο ανεξάρτητο του TSC συμπλόκου, φωσφορυλιώνοντας και προκαλώντας την απομάκρυνση της ανασταλτικής υπομονάδας PRAS40 από το RAPTOR.

Με παρόμοιο τρόπο οι υποδοχείς κινάση τυροσίνης που εξαρτώνται από το Ras ενεργοποιούν το mTORC1 μέσω της κινάσης ERK1/2 (Extracellular-signal-regulated-kinase 1/2) και του τελεστή του RSK1 (Ribosomal S6 kinase), τα οποία φωσφοφυριώνουν και αναστέλλουν το TSC2 (Inoki et al., 2002). Επιπλέον σηματοδοτικά μονοπάτια που δρουν με παρόμοιο μηχανισμό στο TSC είναι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNFα (Tumor necrosis factor α), που ενεργοποιεί το mTORC1 προκαλώντας την φωσφορυλίωση του TSC από την IKKβ (IκB kinase β) (Lee et al., 2007). Τέλος, το Wnt μονοπάτι αναστέλλει την GSK3β (Glycogen synthase kinase 3β), η οποία φυσιολογικά φωσφορυλιώνει και προάγει την ενεργοποίηση του TSC2 (Inoki et al., 2006).

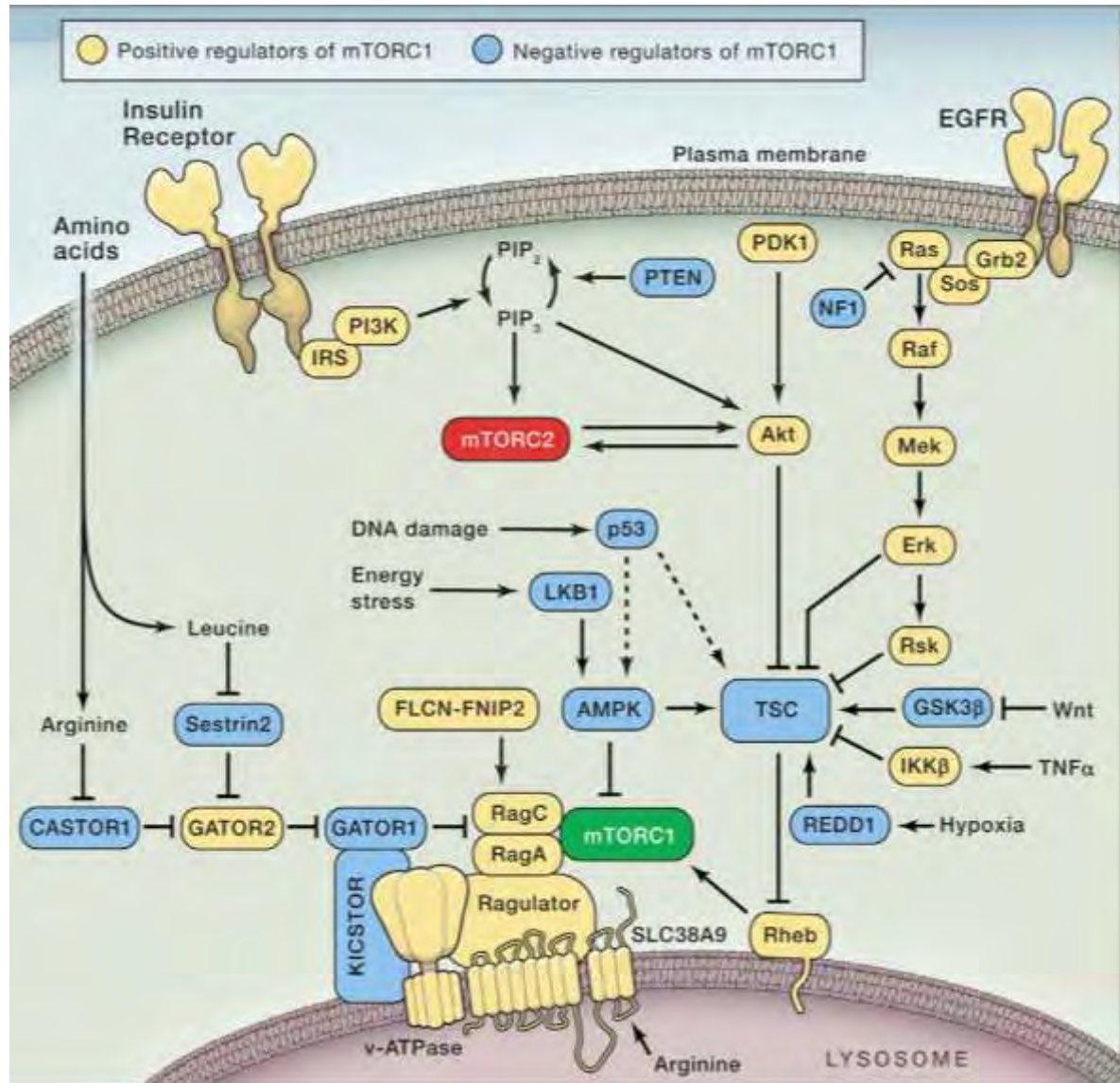
Επίπεδα οξυγόνου, ενέργειας και καταστροφή του DNA

Το mTORC1 ανταποκρίνεται στο ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό στρες, όπως είναι τα χαμηλά επίπεδα ATP και οξυγόνου αλλά και η καταστροφή του DNA. Η AMPK (Adenosine monophosphate-protein kinase), σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας, αναστέλλει το mTORC1 τόσο έμμεσα μέσω της φωσφορυλίωσης και κατά συνέπεια της ενεργοποίησης της TSC2, όσο και άμεσα μέσω της φωσφορυλίωσης του RAPTOR στα κατάλοιπα Ser722/Ser792. Αυτή η φωσφορυλίωση του RAPTOR αναστέλλει το mTORC1 και επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου όταν τα κύτταρα στρεσάρονται για ενέργεια, προτείνοντας ότι το RAPTOR είναι ένας κρίσιμος διακόπτης που συσχετίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου με την ενεργειακή κατάσταση (Gwinn et al., 2008). Παρόμοια, η υποξία αναστέλλει το mTORC1 εν μέρει μέσω της ενεργοποίησης του AMPK, αλλά επίσης και μέσω της επαγωγής του REDD1 (Regulated in DNA damage and repair) που ενεργοποιεί το TSC (Brugarolas et al., 2004). Τέλος, το μονοπάτι που ανταποκρίνεται στην καταστροφή του DNA αναστέλλει το mTORC1 μέσω της επαγωγής των γονιδίων στόχου του p53, συμπεριλαμβανομένων της ρυθμιστικής υπομονάδας του AMPK (AMPKβ), της φωσφατάσης PTEN (Phosphatase and tensin homology) και του ίδιου του TSC2, τα οποία αυξάνουν την δραστηριότητα του TSC (Feng et al., 2007).

Αμινοξέα

Τα αμινοξέα, και κυρίως η λευκίνη και η αργινίνη, ενεργοποιούν επίσης το mTORC1 με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο του TSC συμπλόκου. Στον μηχανισμό εμπλέκονται οι Rag GTPασες (Ras-related GTP binding protein), οι οποίες αποτελούν ετεροδιμεροί των RagA ή RagB με τις RagC ή RagD που συνδέονται στην λυσοσωμική μεμβράνη μέσω της σύνδεση τους με το σύμπλοκο Regulator. Η ενεργοποίηση των Rags ετεροδιμερών από αμινοξέα παρουσία GTP τους επιτρέπει να συνδεθούν με το RAPTOR στρατολογώντας το mTORC1 στην λυσοσωμική επιφάνεια, όπου βρίσκεται και το RHEB (Sancak et al., 2010). Το mTORC1 σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ενεργό όταν τόσο οι Rags όσο και η RHEB είναι

ενεργές, απαιτώντας την συνύπαρξη των αυξητικών παραγόντων και των αμινοξέων για την ενεργοποίηση του mTORC1 (Zoncu et al., 2011)



Εικόνα 3 mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι. Απεικονίζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι ανοδικά του mTORC1 και του mTORC2. Οι κύριοι ρυθμιστές του mTORC1 είναι οι αυξητικοί παράγοντες, τα αμινοξέα, το στρες, η ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου και τα επίπεδα οξυγόνου. Αντίστοιχα, το mTORC2 ρυθμίζεται κυρίως από τους αυξητικούς παράγοντες (Saxon & Sabatini, 2017).

1.3.2 Ρυθμιστές ανοδικά του mTORC2

Αυξητικοί παράγοντες

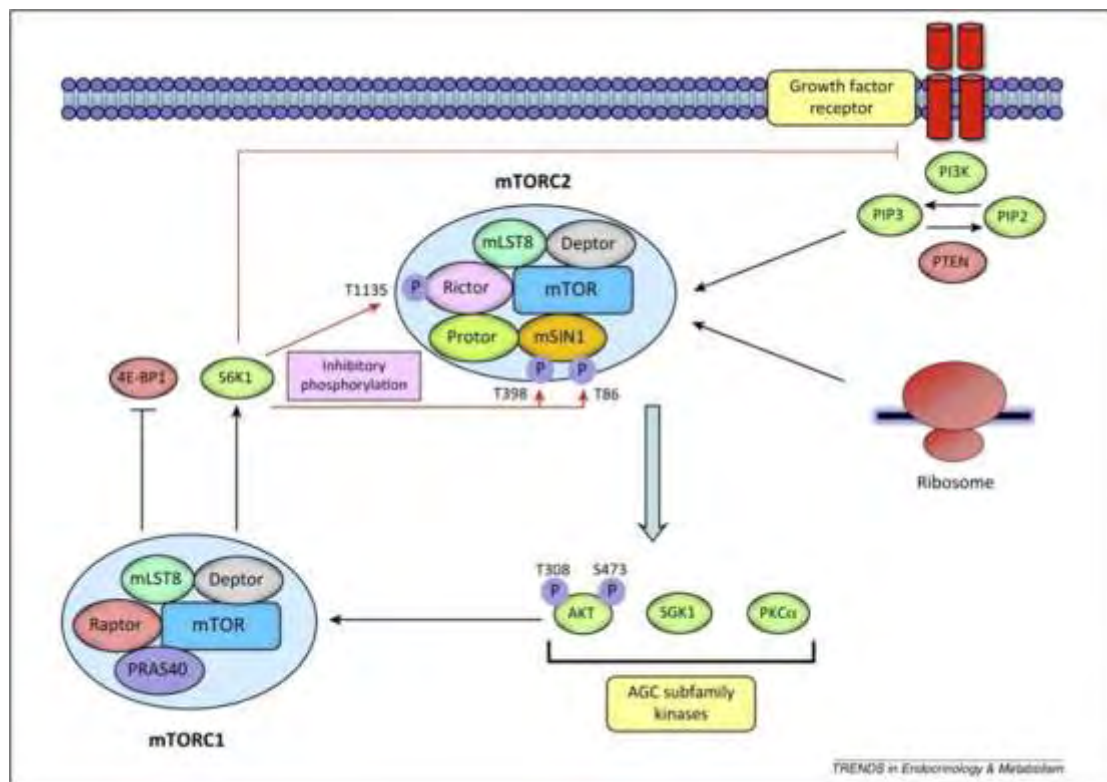
Σε αντίθεση με το mTORC1, είναι πολύ λιγότερο γνωστό το mTORC2 μονοπάτι. Η σηματοδότηση του mTORC2 δεν είναι ευαίσθητη στα θρεπτικά, αλλά ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες, όπως η ινσουλίνη, μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί το PI3K. Η υπομονάδα του mTORC2, mSIN1, περιέχει μια PH (Pleckstrin-homology)- περιοχή, όπως και όλες οι πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από την PI3K, καθιστώντας σημαντική την ινσουλινο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του συμπλόκου. Η PH περιοχή του mSIN1 αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα του mTORC2 απουσία ινσουλίνης, ενώ αυτή η αυτο-αναστολή αποτρέπεται όταν συνδέεται με PIP3 που παράγονται από την PI3K στην πλασματική μεμβράνη (Liu et al., 2015). Το mSIN1 μπορεί, επίσης, να φωσφορυλιωθεί από την AKT στο κατάλοιπο T86, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός βρόχου θετικής ανάδρασης με την οποία η μερική ενεργοποίηση του AKT (από την PDK1) προωθεί την ενεργοποίηση του mTORC2, η οποία με την σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί πλήρως το AKT (Yang et al., 2015).

Μια επιπλέον μελέτη, συσχέτισε την ενεργοποίηση του mTORC2 με τα ριβοσώματα, αλλά όχι με την σύνθεση πρωτεϊνών, μέσω του PI3K μονοπατιού μετά από διέγερση με ινσουλίνη σε φυσιολογικές συνθήκες. Ευρήματα σε κύτταρα μελανώματος και καρκίνο του παχέους εντέρου υποδηλώνουν ότι η συσχέτιση του mTORC2 είναι σημαντική στην σηματοδότηση του ογκογόνου PI3K. Έτσι, η αλληλεπίδραση mTORC2-ριβόσωμα είναι ένας πιθανώς διατηρούμενος μηχανισμός ενεργοποίησης του mTORC2 τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η μηχανιστική βάση αυτής της θεωρίας παραμένει ασαφής (Zinzalla et al., 2011).

Άλλοι ρυθμιστές

Η σηματοδότηση του mTORC2 ρυθμίζεται και από το mTORC1 (Εικόνα 4), λόγω της παρουσίας ενός βρόχου αρνητικής ανάδρασης μεταξύ του mTORC1 και της ινσουλίνης/PI3K σηματοδότησης. Πιο αναλυτικά, το mTORC1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το GRB10, ένα αρνητικό ρυθμιστή της σηματοδότησης του ινσουλινικού/IGF-1 υποδοχέα που βρίσκεται ανοδικά του AKT και του mTORC2 (Yu et al., 2011). Παράλληλα, η φωσφορυλιωμένη S6K1 που βρίσκεται καθοδικά του mTORC1 καταστέλλει έμμεσα το mTORC2 μέσω της εξαρτώμενης από φωσφορυλίωση αποικοδόμηση του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης 1 (IRS-1) (Harrington et al., 2004). Άμεσα, η p70S6K φωσφορυλιώνει το RICTOR στο κατάλοιπο Thr1135, το οποίο ρυθμίζει αρνητικά το mTORC2 αποτελώντας μέρος ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης που ελέγχει την δραστηριότητα του AKT (Treins et al., 2010).

Είναι γνωστό ότι το mTORC1 τόσο του ζυμομύκητα όσο και των θηλαστικών ρυθμίζεται από μικρές GTPάσες συμπεριλαμβανομένων και τις GTPάσες της οικογένειας Rag (Zoncu et al., 2011). Υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν ότι το mTORC2 μπορεί, επίσης, να ρυθμίζεται από GTPάσες. Η πρώτη ένδειξη για μία τέτοια ρύθμιση είναι ότι το RICTOR και το mSIN1 περιέχουν, αντίστοιχα, περιοχές σύνδεσης RagGEFN και Ras. Περαιτέρω μελέτες σε ζύμες, έδειξαν ότι η γλυκόζη ενεργοποιεί το mTORC2 μέσω της Ryh1 που ανήκει στην Rab οικογένεια GTPασών (Hatano et al., 2015). Ακολούθως, έχει προταθεί ότι η Rag GTPάση είναι ρυθμιστής και του mTORC1 και του mTORC2 με άμεση πρόσδεση στο mTOR, διευκολύνοντας, έτσι τον εντοπισμό των δύο συμπλόκων στις κατάλληλες υποκυτταρικές θέσεις (Saci et al., 2011). Τέλος, έχει προταθεί ότι το RIT της Ras οικογένειας GTPασών δεσμεύει και ενεργοποιεί το mTORC2 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Cai & Andres, 2014).



Εικόνα 4 Ρυθμιστές ανοδικά και καθοδικά του mTORC2. Το mTORC2 ενεργοποιείται από το PI3K μονοπάτι μετά την διέγερση του υποδοχέα των αυξητικών παραγόντων και η ενεργοποίησή του αυτή έχει συσχετιστεί με το ριβόσωμα με ένα μηχανισμό που παραμένει ασαφής. Ακόμα ρυθμίζεται και από το mTORC1 μέσω ενός μηχανισμού ανάδρασης. Καθοδικά, το mTORC2 ενεργοποιεί το AKT στη Ser473 και επηρεάζει, ταυτόχρονα, διάφορους ρυθμιστές που ανήκουν στην υποοικογένεια των AGC κινασών, όπως το SGK1 και το PKCα (Τροποποιημένη: Masui et al., 2014).

1.3.3 Ρυθμιστές καθοδικά του mTORC1

Τα κύτταρα προκειμένου να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν, πρέπει να αυξήσουν την παραγωγή των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των αμινοξέων και να καταστείλουν καταβολικά μονοπάτια, όπως η αυτοφαγία. Το mTORC1 παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση αυτών των διεργασιών προκειμένου να ρυθμίσει την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού ως απόκριση των περιβαλλοντικών συνθηκών (Saxton & Sabatini, 2017).

Σύνθεση πρωτεϊνών

Το mTORC1 προάγει σε μεγάλο βαθμό την πρωτεϊνοσύνθεση φωσφορυλιώνοντας δύο κύριους ρυθμιστές, την S6K1 (p70S6 Kinase 1) και την 4EBP (eIF4E Binding Protein). Η S6K1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί αρκετά υποστρώματα τα οποία προάγουν την έναρξη της μετάφρασης του mRNA, όπως είναι eIF4B (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B), ένας θετικός ρυθμιστής της 5' καλύπτρας που δεσμεύεται στο eIF4F σύμπλοκο, το οποίο απαιτείται για την έναρξη της μετάφρασης (Holz et al., 2005). Παράλληλα, φωσφορυλιώνει και προάγει την αποικοδόμηση του PDCD4, ένας αναστολέας του eIF4B (Dorello et al., 2006), ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης των mRNAs μέσω της αλληλεπίδρασης τους με το POLDIP3 (Polymerase delta-interacting protein), ένα στοιχείο του συμπλόκου σύνδεσης-εξονίων (Ma et al., 2008). Το 4EBP αναστέλλει τη μετάφραση, δεσμεύοντας το eIF4E και αποτρέποντας την συναρμολόγηση του eIF4F συμπλόκου. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει το 4EBP σε πολλαπλές θέσεις για να προκαλέσει την αποσύνδεση του από το eIF4E, επιτρέποντας την μετάφραση του mRNA, η έναρξη της οποίας εξαρτάται από την 5' καλύπτρα (Brunn et al., 1997).

Το mTORC1 επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση και με άλλους τρόπους. Ένας τρόπος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ρυθμιστικού στοιχείου TIF-1A (Tripartite motif-containing protein-24) που επάγει την αλληλεπίδραση του με την RNA πολυμεράση I και την έκφραση του ριβοσωμικού RNA (Mayer et al., 2004). Το mTORC1, με έναν δεύτερο τρόπο, φωσφορυλιώνει και αναστέλλει το MAF1, έναν καταστολέα της RNA πολυμεράσης III και έτσι επάγει την μεταγραφή του 5S RNA και του tRNA (transfer RNA) (Kantidakis et al., 2010).

Μεταβολισμός λιπιδίων, νουκλεοτιδίων και γλυκόζης

Το mTORC1 ελέγχει τη σύνθεση των λιπιδίων που απαιτούν τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για την δημιουργία μεμβρανών. Το mTORC1 επάγει την de novo σύνθεση των λιπιδίων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα SREBP (Sterol Responsive Element Binding Protein), ο οποίος ελέγχει την έκφραση των

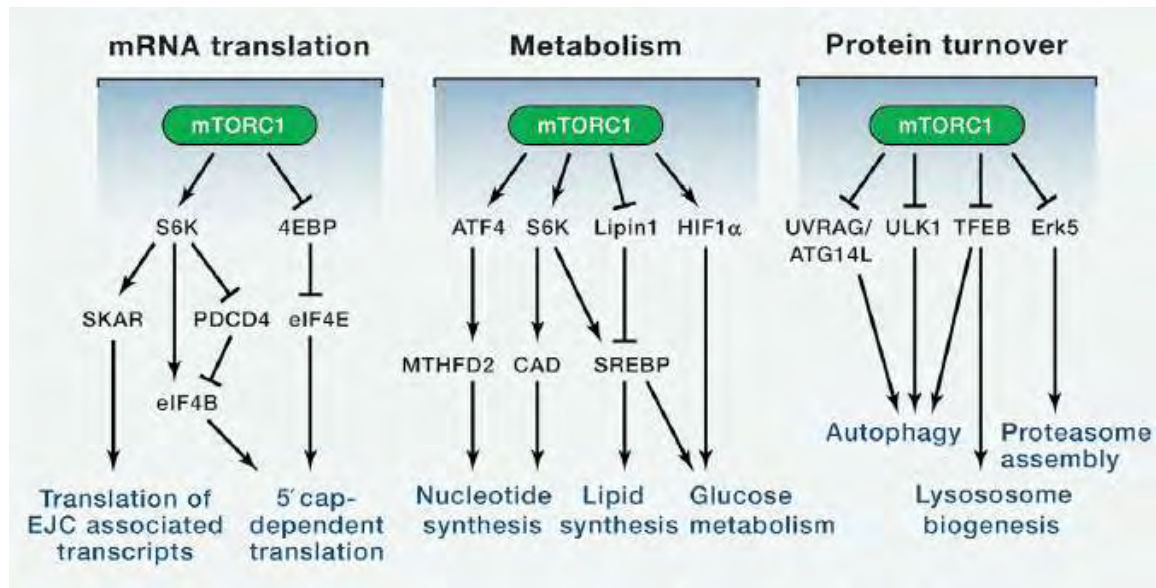
μεταβολικών γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης. Φυσιολογικά, παρόλο που ο SREBP ενεργοποιείται ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα στερόλης, η mTORC1 σηματοδότηση μπορεί ανεξάρτητα να ενεργοποιήσει τους SREBP, τόσο μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το S6K1 (Duvet et al., 2010), όσο και μέσω της ενεργοποίησης του LPN1 (Lipin1), το οποίο αναστέλλει το SREBP απουσία της mTORC1 σηματοδότησης (Peterson et al., 2011).

Επίσης, το mTORC1 προάγει τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων που απαιτείται για την σύνθεση του DNA και την βιογένεση του ριβοσώματος στα αναπτυσσόμενα και πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Αυτό το καταφέρνει αυξάνοντας τον MTHFD2 (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (NADP⁺ Dependent) 2), ένα στοιχείο του μιτοχονδριακού τετραυδροφολλικού κύκλου, το οποίο παρέχει μονάδες άνθρακα για την σύνθεση πουρινών. Επιπρόσθετα, το S6K1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την CAD (Carbamoyl-phosphate synthetase), ένα κύριο στοιχείο της οδού της de novo σύνθεσης της πυριμιδίνης (Ben-Sahra et al., 2016).

Το mTORC1 ρυθμίζει θετικά τον κυτταρικό μεταβολισμό και την παραγωγή ATP. Αυξάνει την γλυκολυτική ροή ενεργοποιώντας την μεταγραφή και την μετάφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α (Hypoxia inducible factor 1α) που αποτελεί ρυθμιστή πολλών γλυκολυτικών γονιδίων. Τέλος, η εξαρτώμενη από το mTORC1 ενεργοποίηση του SREBP, οδηγεί σε αυξημένη ροή της οξειδωτικής οδού φωσφορικών πεντοζών, η οποία χρησιμοποιεί άνθρακες από γλυκόζη για την παραγωγή NADPH και άλλων ενδιάμεσων μεταβολιτών που απαιτούνται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Duvet et al., 2010).

Αυτοφαγία

Το mTORC1 προάγει την κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζοντας αρνητικά τον καταβολισμό των πρωτεϊνών. Η κεντρική διαδικασία αποδόμησης των πρωτεϊνών στα κύτταρα είναι η αυτοφαγία, η οποία καταστέλλεται από το mTORC1. Ένα σημαντικό πρώιμο στάδιο στην αυτοφαγία είναι η ενεργοποίηση του ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1), μία κινάση που δημιουργεί σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες ATG13, FIP200 και ATG101 και οδηγεί στην δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Σε συνθήκες κορεσμένες από θρεπτικά, το mTORC1 φωσφορυλιώνει το ULK1, εμποδίζοντας ως εκ τούτου την ενεργοποίηση του από το AMPK, έναν βασικό ενεργοποιητή της αυτοφαγίας (Kim et al., 2011). Το mTORC1 ρυθμίζει εν μέρει την αυτοφαγία με την φωσφορυλίωση και την αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης του TFEB (Transcription factor EB), ο οποίος οδηγεί την έκφραση των γονιδίων της λυσοσωμικής βιογένεσης και της μηχανής της αυτοφαγίας (Martina et al., 2012).



Εικόνα 5 Τα κύρια μονοπάτια καθοδικά της mTORC1 σηματοδότησης. Το mTORC1 ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση, τον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων, των λιπιδίων και της γλυκόζης, καθώς και την αυτοφαγία (Saxon & Sabatini, 2017).

1.3.4 Ρυθμιστές καθοδικά του mTORC2

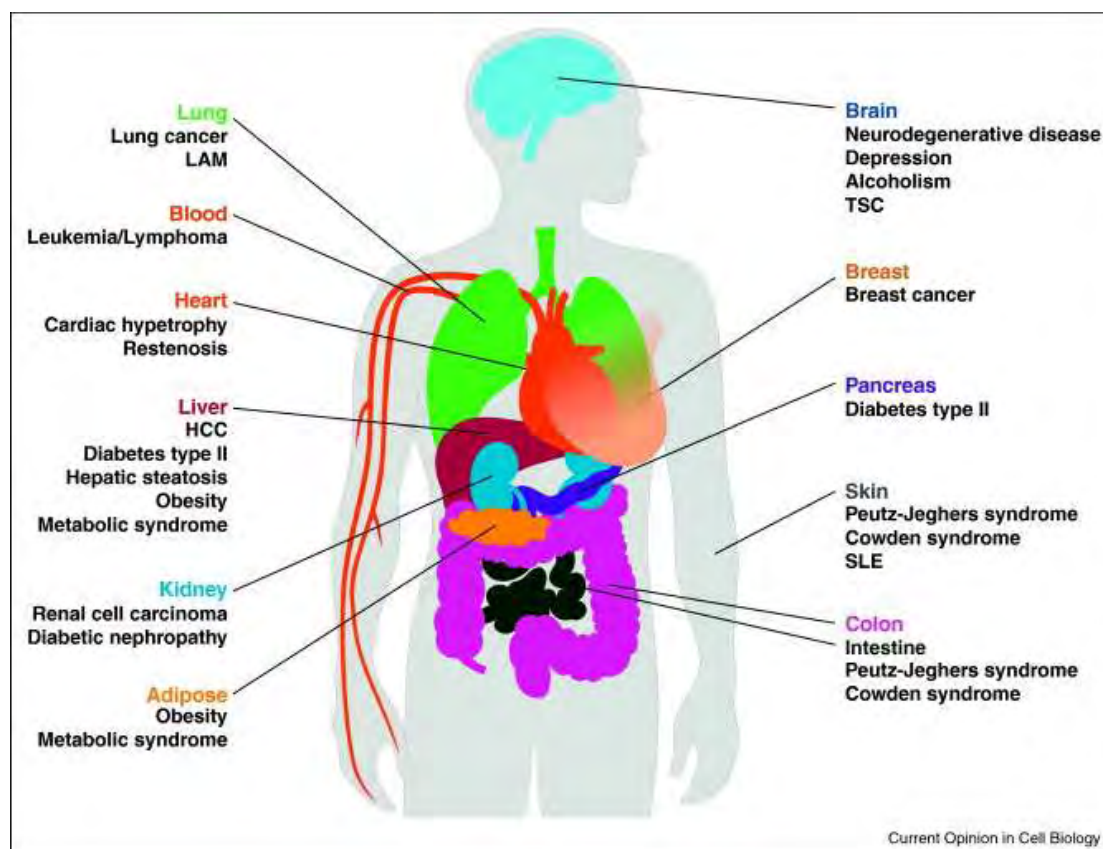
Το mTORC2 ελέγχει αρκετά από τα μέλη της υποοικογένειας των AGC κινάσων στην οποία ανήκουν η AKT/PKB, η SGK1 (serum- and glucocorticoid- induced protein kinase 1) και η PKC α (Protein Kinase C α) (Εικόνα 4). Εκτός από την PKC α , έναν ρυθμιστή της ακτίνης του κυτταροσκελετού που ελέγχει το σχήμα του κυττάρου, έχει βρεθεί ότι το mTORC2 φωσφορυλιώνει και άλλα μέλη της PKC οικογένειας, συμπεριλαμβανομένου της PKC δ , PKC ζ καθώς και τις PKC γ και PKC ϵ , οι οποίες ρυθμίζουν διάφορες πτυχές της κυτταρικής αναδιαμόρφωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης (Saxton & Sabatini, 2017).

Ωστόσο ο κυριότερος στόχος του mTORC2 θεωρείται η φωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση του AKT (Sarbasov et al., 2005). Όπως προαναφέρθηκε, το mTORC2 φωσφορυλιώνει το AKT στα κατάλοιπο Ser473 που βρίσκεται στην καρβόξυ-τελική ουρά προκαλώντας την μέγιστη ενεργοποίηση της κινάσης. Η μείωση της φωσφορυλίωσης του AKT στη Ser473 που σχετίζεται με την ελάττωση της δραστηριότητας του mTORC2 παρεμποδίζει την φωσφορυλίωση μερικών στόχων του Akt, όπως του FOXO1/3a, ενώ άλλοι στόχοι του, όπως το TSC2, αναστολέας του mTORC1, και το GSK3 β , παραμένουν ανεπηρέαστοι. Το γεγονός ότι η δραστηριότητα του Akt δεν καταργείται πλήρως σε κύτταρα που απουσιάζει το mTORC2 πιθανότατα αιτιολογεί αυτό το αποτέλεσμα (Guertin et al., 2006). Επειδή η κατάργηση της φωσφορυλίωσης AKT S473 δεν πραγματοποιείται μετά την έλλειψη του RICTOR, πιθανολογείται ότι οφείλεται σε φωσφορυλίωση του καταλοίπου από άλλες κινάσες. Έχει προταθεί ότι η DNA-PK (DNA dependent protein kinase) φωσφορυλιώνει την AKT S473 στο επονομαζόμενο PDK2 σημείο, ανεξάρτητα από το mTORC2 (Bozulic & Hemmings, 2009).

Το mTORC2 ενεργοποιεί άμεσα την SGK1 (Serum/Glucocorticoid related kinase 1), μία κινάση που ελέγχει την μεταφορά ιόντων και την ανάπτυξη (Garcia-Martinez and Alessi, 2008). Σε αντίθεση με την AKT, η δράση της SGK1 κινάσης μπλοκάρεται πλήρως απουσία του mTORC2. Επειδή η SGK1 φωσφορυλιώνει το FOXO1/3a στο κατάλοιπο που φωσφορυλιώνεται και από την AKT, η έλλειψη της SGK1 πιθανότατα ευθύνεται για την μείωση της φωσφορυλίωσης του FOXO1/3a σε κύτταρα απουσία του mTORC2 (Sarbassov et al., 2004).

1.4 Ασθένειες που σχετίζονται με το mTOR

Το mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι ρυθμίζει πολλές κύριες λειτουργίες του κυττάρου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και η δυσλειτουργία του εμπλέκεται σε έναν μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι ο καρκίνος, η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου 2 και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.



Εικόνα 6 Οι ασθένειες που οφείλονται στη δυσλειτουργία του mTOR μονοπατιού. Η δυσλειτουργία του mTOR μονοπατιού είναι δυνατόν να επηρεάσει την φυσιολογική λειτουργία πολλών οργάνων και να προκαλέσει διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τα αντίστοιχα όργανα, όπως είναι ο διαβήτης τύπου 2 (Dazert & Hall, 2011).

Καρκίνος

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την σημασία της οδού του mTOR στην παθογένεια του καρκίνου. Πολλά στοιχεία του PI3K σηματοδοτικού μονοπατιού, που βρίσκεται ανοδικά του mTORC1, εμφανίζονται μεταλλαγμένα σε καρκίνους. Μία άλλη συσχέτιση του mTOR με τον καρκίνο είναι η απώλεια του p53, ένα πολύ συνηθισμένο γεγονός στον καρκίνο που προάγει την ενεργοποίηση του mTORC1 (Feng et al., 2005). Επίσης, πολλά οικογενή καρκινικά σύνδρομα προκύπτουν από μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ανοδικά του mTORC1, συμπεριλαμβανομένου των TSC1/TSC2, του PTEN (Phosphatase and tensin homology), ενός αναστολέα του PI3K μονοπατιού, και του LKB1 (Serine/Threonine kinase 11), μία κινάση σερίνης-θρεονίνης που ενεργοποιεί το AMPK. Παράδειγμα αποτελεί η νόσος Οζώδης Σκλήρυνση (Tuberous Sclerosis) που προκαλείται από την απώλεια των TSC1/TSC2 και κατά συνέπεια εμφανίζεται υπερδραστηριότητα του mTORC1 με αποτέλεσμα καλοήγη σχηματισμό όγκου. Η περιορισμένη ανάπτυξη αυτών των όγκων μπορεί να οφείλεται στην αρνητική ανατροφοδότηση από το mTORC1 στο IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1), μειώνοντας δραστικά την σηματοδότηση του PI3K καθοδικά των υποδοχέων τυροσίνης (Shah et al., 2004). Πρόσφατα βρέθηκε το RagC, που συμμετέχει στην πρόσδεση του mTORC1 στο λυσόσωμα, να μεταλλάσσεται σε υψηλή συχνότητα (~18%) στο θυλακοειδές καρκίνωμα (Okosun et al., 2016). Τέλος, μεταλλάξεις του ίδιου του mTOR εντοπίζονται σε μία ποικιλία υποτύπων του καρκίνου συσχετίζοντας το mTOR με την ογκογένεση.

Η mTORC2 σηματοδότηση εμπλέκεται και αυτή σε μεγάλο βαθμό στον καρκίνο εξαιτίας του ρόλου του στην ενεργοποίηση του AKT, η οποία οδηγεί σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού, όπως η πρόσληψη γλυκόζης και η γλυκόλυση. Πρόσφατες μελέτες φανερώνουν τον ρόλο του mTORC2 στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, το γλοιοβλάστωμα και την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Πράγματι, οι όγκοι που σχετίζονται με το PI3K/AKT μονοπάτι φαίνεται να βασίζονται στην δραστηριότητα του mTORC2. Για παράδειγμα, το RICTOR είναι απαραίτητο για τον καρκίνο του προστάτη σε μύες, αλλά και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που στερούνται PTEN. Στον HER-2-θετικό καρκίνο του μαστού, η ενισχυμένη έκφραση του RICTOR οδηγεί στην υπερ-ενεργοποίηση του AKT και στην πρόοδο του όγκου. Μεταλλάξεις στην PH περιοχή του mSIN1 που μπλοκάρουν την αναστολή του mTOR, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της mTORC2/AKT σηματοδότησης, έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Συλλογικά, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν έναν ξεχωριστό ρόλο του mTORC2 στον καρκίνο (Kim et al., 2017).

Διαβήτης τύπου 2

Το mTORC1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης που ρυθμίζεται από την λειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων. Ο διαβήτης που προκαλείται από την διατροφή (διαβήτης τύπου 2) συνδέεται με την παχυσαρκία και άρα με την δίαιτα παρατεταμένης πρόσληψης υψηλής ενέργειας. Στον διαβήτη αυτό, τα παγκρεατικά β-κύτταρα αρχικά επεκτείνονται και παράγουν περισσότερη ινσουλίνη για να αντισταθμίσουν ένα αυξημένο γλυκαιμικό φορτίο, αλλά τελικά οδηγούνται σε εξάντληση. Τα παχύσαρκα ή υψηλής διατροφής σε λιπαρά ποντίκια έχουν υψηλή mTORC1 σηματοδότηση σε πολλούς ιστούς, μεταξύ των οποίων είναι το πάγκρεας, λόγω των αυξημένων κυκλοφορούντων αμινοξέων, ινσουλίνης, και των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η αυξημένη σηματοδότηση σε αυτούς του ιστούς συμβάλλει στην περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη, λόγω της αυξημένης ανασταλτικής ανάδρασης του PI3K/AKT μονοπατιού, η οποία εμποδίζεται σε ποντικούς με έλλειψη του S6K (Khamzina et al., 2005).

Εξαιτίας της υπερ-ενεργοποίησης του mTORC1 στον διαβήτη τύπου 2 θα μπορούσε ως θεραπεία να χορηγηθούν αναστολείς του mTORC1 για να βελτιώσουν την ανοχή στη γλυκόζη και να προστατεύσουν από τον διαβήτη. Παρόλα αυτά, η χρόνια φαρμακολογική χορήγηση του mTORC1 αναστολέα, ραπαμυκίνη, οδήγησε στα αντίθετα αποτελέσματα, προκαλώντας αντίσταση στην ινσουλίνη και μειωμένη ομοιόσταση της γλυκόζης (Cunningham et al., 2007). Αυτά τα αποτελέσματα εξηγούνται λόγω της αναστολής του mTORC2 μετά την παρατεταμένη χορήγηση της ραπαμυκίνης. Η απουσία του mTORC2 στα β-κύτταρα συνδέεται με μείωση της ενεργοποίησης του AKT και άρα ενεργοποίηση του FOXO1, προκαλώντας ήπια υπεργλυκαιμία και δυσανεξία στην γλυκόζη, λόγω της μείωσης της μάζας των β κυττάρων, του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής και έκκρισης ινσουλίνης (Shigeyama et al., 2008).

Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Νευροεκφυλιστικές νόσοι, όπως η νόσος του Πάρκινσον, του Αλτσχάιμερ, του Χάντινγκτον και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση συνδέονται με την μόνιμη απώλεια της νευρικής δομής και λειτουργίας (Rubinsztein, 2006). Το mTOR έχει αναδειχθεί ως σημαντικός ρυθμιστής πολλών νευρολογικών διεργασιών, στις οποίες περιλαμβάνεται η ανάπτυξη των νευρώνων, ο σχηματισμός και ο νευρικός έλεγχος της σίτισης (Lipton and Sahin, 2014). Η απαλοιφή είτε του RICTOR είτε του RAPTOR στους νευρώνες προκαλεί μειωμένο μέγεθος νευρώνων και πρόωρο θάνατο, υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση τόσο του mTORC1 όσο και του mTORC2 έχουν σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Αντίθετα, η υπερδραστηριότητα του mTORC1 εντοπίζεται σε ασθενείς με TSC και σχετίζεται με την υψηλή εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων (90% των ασθενών) και αυτιστικών χαρακτηριστικών (50%), υποδεικνύοντας ότι η μη ρυθμισμένη mTORC1 σηματοδότηση μπορεί να εμπλέκεται στην επιληψία και τον αυτισμό (Zeng et al., 2008). Ο ρόλος του mTORC1 στη ρύθμιση της αυτοφαγίας είναι επίσης σημαντικός, καθώς η δυσλειτουργία της

αυτοφαγίας εμπλέκεται έντονα στην παθογένεια της νόσου του Πάρκινσον και του Αλτσχάιμερ (Spilman et al., 2010).

1.5 Σκοπός

Είναι φανερό ότι η ρύθμιση και η λειτουργία του mTORC1 είναι καλά μελετημένη, τόσο στην φυσιολογική ανάπτυξη του κυττάρου όσο και σε δυσλειτουργίες, σε αντίθεση με το mTORC2 που οι γνώσεις για την σηματοδότηση και τον ρόλο του στη κυτταρική λειτουργία είναι περιορισμένη. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αποσαφήνιση του ρόλου του mTORC2 στη ρύθμιση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου εξετάστηκε η αποπτωτική σηματοδότηση και η σηματοδότηση επιβίωσης σε φυσιολογικές συνθήκες παρουσία ή απουσία του mTORC2, αλλά και υπό συνθήκες στρες που προκλήθηκε χημικά. Η αξιολόγηση του αποπτωτικού θανάτου πραγματοποιήθηκε με ανοσοσύστημα κατά Western και με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής στην οποία έγινε χρώση των αποπτωτικών κυττάρων. Επίσης, η επιβεβαίωση του κυτταρικού θανάτου και ταυτόχρονα της κυτταρικής επιβίωσης υπό τις διάφορες συνθήκες έγινε με την δοκιμασία LDH.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Κυτταρικά συστήματα

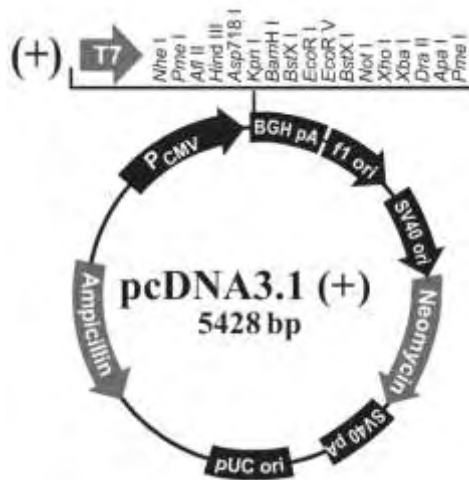
HEK293T - Κύτταρα Ανθρώπινου Νεφρού

Πρόκειται για ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού τα οποία αναπτύσσονται εύκολα σε κυτταροκαλλιέργειες, εκφράζουν Rictor και Raptor ενδογενώς και παρουσιάζουν υψηλή τάση για διαμόλυνση (μέχρι και 100%). Επίσης, περιέχουν το SV40 T-αντιγόνο το οποίο δεσμεύεται στον ενισχυτή SV40 των φορέων κλωνοποίησης προκειμένου να αυξήσει την παραγωγή πρωτεϊνών.

2.2 Φορείς κλωνοποίησης

Πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1

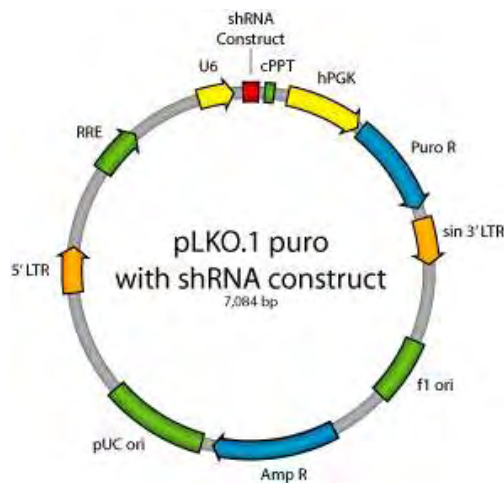
Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1 (ThermoFisher) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου της mSIN1. Ο φορέας pcDNA3.1, μεταξύ των άλλων, διαθέτει (Εικόνα 8): (Α) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E. coli* που φέρουν τον σωστό φορέα, (Β) Τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, Γ) Τον υποκινητή του γονιδίου της πολυμεράσης T7, ανοδικά των θέσεων κλωνοποίησης, που χρησιμοποιείται για την μεταγραφή του από την T7 RNA πολυμεράση, Δ) Την αλληλουχία BGH (Bovine Growth Hormone) καθοδικά των θέσεων κλωνοποίησης, η οποία παρέχει το σήμα για πολυαδενυλίωση των μεταγράφων και ενισχύει την σταθερότητα αυτών και την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής τους.



Εικόνα 8 Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1.

Πλασμιδιακός φορέας pLKO.1

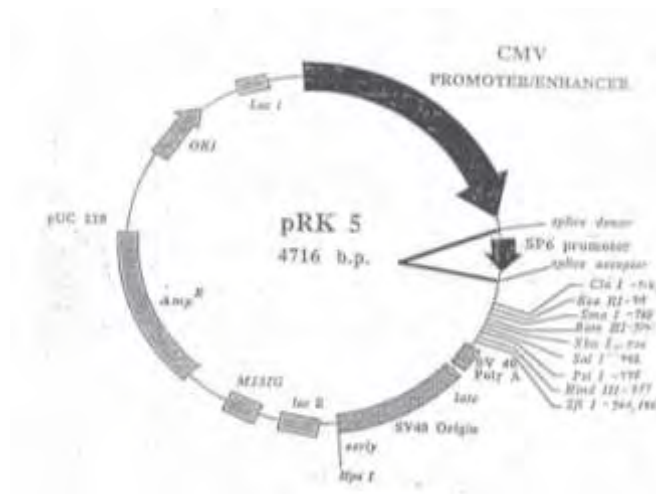
Ο πλασμιδιακός φορέας pLKO.1 (Addgene) χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των shRNA (Short hairpin RNA) του Rictor, του Raptor και του mSIN1 προκειμένου να επιτευχθεί η σίγηση των γονιδίων τους. Ο φορέας pLKO.1, μεταξύ των άλλων, περιέχει (Εικόνα 9): (Α) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, (Β) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη για την επιλογή των ευκαρυωτικών κυτάρων, στην προκειμένη περίπτωση των HEK293T, που έχουν προσλάβει τον φορέα, (Γ) Τον υποκινητή U6 ανοδικά της θέσης ένθεσης των shRNA στον οποίο θα προσδεθεί η RNA pol III.



Εικόνα 9 Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.

Πλασμιδιακός φορέας pRK-5

Ο πλασμιδιακός φορέας pRK-5 (Addgene) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των γονιδίων του Rictor και του Raptor. Ο φορέας pRK-5, μεταξύ των άλλων, περιέχει (Εικόνα 10): (Α) Ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, (Β) Τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης., (Γ) Τον υποκινητή του γονιδίου της SP6 RNA πολυμεράσης ανοδικά των θέσεων κλωνοποίησης που χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή του από την SP6 RNA πολυμεράσης, (Δ) Μια αλληλουχία SV40 poly A που χρησιμεύει ως τερματική αλληλουχία στην οποία θα σταματήσει η μεταγραφή και παίζει ρόλο στην επεξεργασία του RNA και την σταθερότητα του.



Εικόνα 10 Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pRK-5.

2.3 Διαλύματα

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων και τη διαμόλυνση

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Ορός εμβρύου βοός: ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland
- Θρεπτικό υλικό με μειωμένο ορό για τις κυτταρικές διαμολύνσεις: OPTIMEM, ThermoFisher Scientific.
- Τρυψίνη: Sigma-Aldrich.
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνη: Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich.
- DNase: Sigma-Aldrich.
- Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό αντιδραστήριο Lipofectamine™ 2000, ThermoFisher Scientific.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοτύπωμα κατά Western

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων: Παρασκευάστηκε διάλυμα 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100. Χρησιμοποιήθηκε μείγμα αναστολέων πρωτεασών (complete™, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) και, όπου κρίθηκε απαραίτητο, το μείγμα αναστολέων φωσφατασών (PhosSTOP™, Roche).
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671), ThermoFisher Scientific.
- Laemmli Buffer 6X: 375 Mm Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% b-mercaptoethanol, 0.03% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.
- Protran® μεμβράνες νιτροκυταρίνης: Χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, Whatman, Kent, UK.
- Αντιδραστήρια ECL: Χρησιμοποιήθηκαν για την ενισχυμένη χημιοφωταύγεια, PerkinElmer, Waltham, MA, USA.
- SDS-PAGE 5X (Running Buffer): 15,1 g/lit Tris-Base και 72 g/lit γλυκίνης σε ddH₂O. Στο τελικό διάλυμα προστέθηκε SDS έτσι ώστε να έχει περιεκτικότητα 0.1 %.
- Transfer Buffer 1X: 2 lit διαλύματος περιέχουν 12,1g Tris-Base, 58 g γλυκίνης, 2 g SDS και 400 mL μεθανόλης.

2.4 Φαρμακολογικοί παράγοντες

- CCCP (MedChemExpress, Sollentuna)
- Puromycin (Sigma-Aldrich, Canada)
- DMSO: Applichem, Darmstadt, Germany.

2.5 Αντισώματα

Πρωτογενή

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA, και είναι τα εξής:

- **Rictor**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 2114)
- **Raptor**: πολυκλωνικό αντίσωμα (CST # 2280)
- **Cleaved parp**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 5625)
- **Total parp**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 9532)
- **Phospho-AKT S473**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 4060)
- **Phospho-AKT T308**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 13038)
- **Total AKT**: πολυκλωνικό αντίσωμα (CST # 9272)
- **Phospho-FOXO3a**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 8174)
- **Total FOXO3a**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 12829)
- **cleaved caspase 3**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 9664)
- **total caspase 3**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 9665)
- **clAP1**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST # 7065)
- **Phospho-S6RP**: πολυκλωνικό αντίσωμα (CST# 2211)
- **Total S6RP**: μονοκλωνικό αντίσωμα (CST#2217)

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology και είναι τα εξής:

- **SODD**: μονοκλωνικό αντίσωμα (sc-166581)
- **BAX-N20**: μονοκλωνικό αντίσωμα (sc-493)

GAPDH: χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει την GAPDH και ήταν συζευγμένο με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP-60004), Proteintech Europe, Manchester, UK.

Δευτερογενή

- Anti-rabbit IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (CST#7074), από την εταιρεία Cell Signaling Technologies,
- Anti-mouse IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του ποντικίου (CST#7076) από την εταιρεία Cell Signaling Technologies,

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.6.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Οι συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονταν οι κυτταρικές σειρές ήταν στείρες, σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C, ατμόσφαιρας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95%. Η κυτταρική σειρά HEK293T αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υλικό DMEM υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη, στο οποίο είχε προστεθεί 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός και μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε ποσοστό 1% (v/v).

2.6.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Ο όρος διαμόλυνση αναφέρεται στην εισαγωγή ξένων νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) σε κύτταρα θηλαστικών. Στην παρούσα εργασία, η διαμόλυνση των κυττάρων με τα αντίστοιχα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης. Το αντιδραστήριο της λιποφεκταμίνης αποτελείται από κατιοντικά λιπίδια, τα οποία δημιουργούν σύμπλοκο με τα αρνητικά φορτισμένα πλασμίδια προκειμένου αυτά να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, παρέχει υψηλά επίπεδα διαμόλυνσης και ταυτόχρονα μειωμένη τοξικότητα για τα κύτταρα.

Η μέθοδος της διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Τα πειράματα της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών διήρκησαν 48 ώρες, ενώ στα πειράματα για την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών (shRNA) 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση έγινε επιλογή των κυττάρων με πουρομυκίνη και η συλλογή των κυττάρων έγινε τρεις μέρες μετά την εισαγωγή της πουρομυκίνης.

Πριν από κάθε πείραμα πραγματοποιείτο έλεγχος του ποσοστού των κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού LEICA με φίλτρο για το πράσινο χρώμα (τα βαμμένα κύτταρα, GFP-θετικά, έχουν ενσωματώσει τον φορέα

διαμόλυνσης). Όταν το ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων ήταν τουλάχιστον 70%, τότε ακολουθούσε η συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυση.

2.6.3 Ανοσοσύτρωμα κατά Western

Το ανοσοσύτρωμα κατά Western χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της έκφρασης του RICTOR, αλλά και άλλων πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε 48 ώρες και 4 ημέρες μετά την διαμόλυνση για τα πειράματα υπερέκφρασης και τα shRNA πειράματα, αντίστοιχα.

2.6.4 Λύση κυττάρων

Μετά το πέρας της εφαρμογής των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, τα τρυβλία με τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται σε αυτά παγωμένο διάλυμα PBS. Μετά την απομάκρυνση όλης της ποσότητας του PBS, προστίθεται διάλυμα λύσης όγκου ανάλογου με την πυκνότητά τους, συνήθως από 100 έως 120μl.

Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν φυγοκεντρώνονται στις 13,000 rpm, για 30 λεπτά στους 4° C. Τέλος, το υπερκείμενο στο οποίο περιέχονται όλες οι διαλυτές πρωτεΐνες μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, στον οποίο προστίθεται 6x Laemli, θερμαίνεται στους 100°C για 5 λεπτά και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, μία μέθοδος διαχωρισμού ενός δείγματος πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10-15%) και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους βάρος, εξαιτίας της παρουσίας του SDS στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, που φορτίζει αρνητικά όλες τις πρωτεΐνες, έτσι ώστε ο διαχωρισμός τους να βασίζεται μόνο στο μοριακό τους βάρος, και όχι στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μετακινούνται από τον θετικό προς τον αρνητικό πόλο.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης στο ανοσοσύτρωμα κατά Western αποτελείται από δύο πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή running gel), τα οποία διαφέρουν στην πυκνότητά τους και τοποθετήθηκαν το ένα πάνω στο άλλο. Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει μικρότερη πυκνότητα, καθώς περιέχει μικρότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης και pH 6,8, έτσι ώστε όλα τα δείγματα να κινηθούν μαζί έως τα όρια του πηκτώματος διαχωρισμού.

Το πήκτωμα διαχωρισμού, με μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης και pH 8,8, χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση το μοριακό τους βάρος.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 1 ώρα τουλάχιστον στα 130 Volt, παρατηρώντας συνεχώς τις ζώνες του μάρτυρα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Για αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκε κασετίνα όπου τοποθετούνται με σειρά από την λευκή πλευρά προς την μαύρη: ένα σφουγγάρι, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann και ένα σφουγγάρι. Πριν από την τοποθέτηση των επιμέρους στην κασετίνα, αυτά είχαν επωαστεί με διάλυμα μεταφοράς. Η κασετίνα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με διάλυμα μεταφοράς και συνδέεται με το τροφοδοτικό έντασης στα 400 mA. Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είχε διάρκεια περίπου 1 ½ ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα TBS-T με 5% w/v άπαχο γάλα, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις.

2.6.6 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα

Μετά την επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων (60 λεπτά), η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε δοχείο, που περιείχε το αντίστοιχο αντίσωμα. Τα δοχεία επώαστηκαν στους 4°C για τουλάχιστον 16 ώρες υπό ανάδευση. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν διαλύθηκαν σε TBS-T με περιεκτικότητας 3% σε άπαχο γάλα σε 1X.

2.6.7 Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα και εμφάνιση σε φιλμ

Μετά την απόρριψη του πρωτογενούς αντισώματος από κάθε δοχείο, ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών πάνω σε αναδευτήρα με διάλυμα TBS-T. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνη επώαστηκε με δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ½ ώρα, υπό ανάδευση. Τα δευτερογενή αντισώματα είχαν διαλυθεί σε διάλυμα TBS-T που περιείχε 3% γάλα. Τελικά, το δευτερογενές αντίσωμα απορρίφθηκε και μετά από τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T αναμίχτηκαν ίσοι όγκοι από το αντιδραστήριο A και το αντιδραστήριο B, του εμπορικού αντιδραστηρίου ECL και προστέθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Το διάλυμα ECL (Enhanced Chemiluminescence) είναι μίγμα H₂O₂ και λουμινόλης που αντιδρά με το ένζυμο υπεροξειδάση του δεύτερου αντισώματος. Η υπεροξειδάση διασπά το H₂O₂ και παράγονται ρίζες O₂, οι οποίες αντιδρούν με τη λουμινόλη και

απελευθερώνουν φωτόνια που προσβάλλουν το φωτογραφικό φιλμ. Η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιήθηκε σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης (Optimax 2010) σε σκοτεινό θάλαμο. Τα φιλμ πυκνομετρήθηκαν και η ένταση του φωτισμού κάθε πρωτεϊνικής ζώνης αναλύθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

2.6.8 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά προγράμματα:

- Microsoft Office Word 2007, για τη συγγραφή της διατριβής,
- EndNote X5, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών,
- Adobe Photoshop CC, για την επεξεργασία των εικόνων,
- Microsoft Office Excel 2007 για την μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,
- GraphPad Prism 6 (Windows Version 6.01).

2.6.9 Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 6.

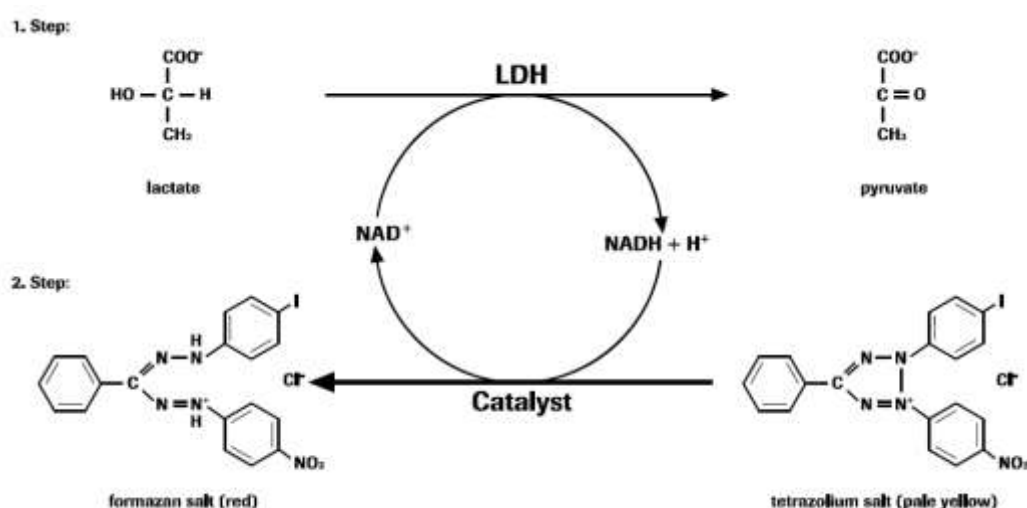
Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα-μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's t-test (όταν συγκρίνονταν 2 ομάδες αποτελεσμάτων). Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $p < 0.05$.

2.6.10 Δοκιμασία LDH

Η μέτρηση της βιωσιμότητας/θνησιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Sigma Aldrich, Cat. No. 04 744 926 001), μία μη ραδιενεργή χρωματομετρική μέθοδος κατάλληλη για την ποσοτικοποίηση υψηλής απόδοσης κυτταρικού θανάτου και λύσης κυττάρων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μέτρηση της δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate dehydrogenase, LDH) που απελευθερώνεται από το κυτταρόπλασμα των κατεστραμμένων κυττάρων, αποτελώντας μια ευαίσθητη,

αξιόπιστη και αυτοματοποιημένη μέθοδος για τον ακριβή προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου.

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είναι ένα σταθερό κυτταροπλασματικό ένζυμο που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα και απελευθερώνεται ταχέως στο υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας όταν η πλασματική μεμβράνη έχει καταστραφεί. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα η δραστικότητα του LDH σε υπερκείμενα καλλιιεργειών (θνησιμότητα) αλλά και στην υπόλοιπη κυτταροκαλλιέργεια (βιωσιμότητα). Η δραστικότητα της LDH προσδιορίζεται με ένα ενζυμικό τεστ που διακρίνεται σε δύο στάδια (Εικόνα 11): στο 1^ο στάδιο μετατρέπεται το NAD⁺ σε NADH/H⁺ κατά την οξειδωση του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό που καταλύεται από το LDH. Στο 2^ο στάδιο ο καταλύτης μεταφέρει H/H⁺ από το NADH/H⁺ στο άλας τετραζολίου προκειμένου να παράγει φορμαζάνη (κόκκινο χρώμα). Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται με ELISA reader σε μήκος κύματος 492nm και ως κοντρόλ χρησιμοποιείται η μέτρηση στα 630nm για την αφαίρεση του background από την μέτρηση.



Εικόνα 11 Το ενζυμικό στάδιο της δοκιμασίας LDH. Στο πρώτο στάδιο η LDH που έχει απελευθερωθεί από τα κύτταρα παράγει NADH/H⁺ κατά την οξειδωση του γαλακτικού σε πυροσταφυλικό. Στην δεύτερη ενζυμική αντίδραση δύο υδρογόνα μεταφέρονται από το NADH/H⁺ στο άλας τετραζολίου (κίτρινο) από τον καταλύτη προς σχηματισμό άλας φορμαζάνης (κόκκινο).

Η δοκιμασία LDH περιλαμβάνει 4 αντιδραστήρια: τον καταλύτη (catalyst), το διάλυμα βαφής (dye solution), το διάλυμα λύσης (lysis solution) και το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution). Πριν από κάθε δοκιμασία LDH παρασκευάζεται φρέσκο το μίγμα αντίδρασης (reaction mixture) που αποτελείται από την ανάμιξη του καταλύτη στον οποίο έχει προστεθεί ένα 1ml διπλά απεσταγμένο H₂O και του διαλύματος βαφής.

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού θνησιμότητας των κυττάρων σε μία καλλιέργεια πραγματοποιείται μέτρηση της δραστικότητας του LDH που έχει απελευθερωθεί στο υπερκείμενο από τα νεκρά κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό,

αφαιρείται ένα μέρος από το υπερκείμενο το οποίο θα αντιδράσει με μια ποσότητα του μίγματος αντίδρασης για 10 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου, η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού και η απορρόφηση μετρίεται στο Elisa reader στα 492nm. Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιείται μέτρηση της δραστικότητας του LDH στα ζώντα κύτταρα. Αυτή η μέτρηση προϋποθέτει την αντικατάσταση του υπερκειμένου των καλλιεργειών με φρέσκο θρεπτικό μέσο και την προσθήκη σε αυτό διάλυμα λύσης για 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό καταστρέφονται τα ζωντανά κύτταρα και απελευθερώνουν το LDH στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια, ένα μέρος από το υπερκείμενο αποσπάται προκειμένου να αντιδράσει με το μίγμα αντίδρασης και το διάλυμα τερματισμού, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται σε ELISA reader. Ως συνθήκες κοντρόλ χρησιμοποιούνται καλλιέργειες μη διαμολυσμένες με πλασμίδιο, ενώ από τις μετρήσεις της απορρόφησης αφαιρείται η μέτρηση που λαμβάνεται από συνθήκες που περιέχουν μόνο θρεπτικό μέσο, καθώς απορροφά στο ίδιο μήκος κύματος με το LDH παρερμηνεύοντας τα αποτελέσματα.

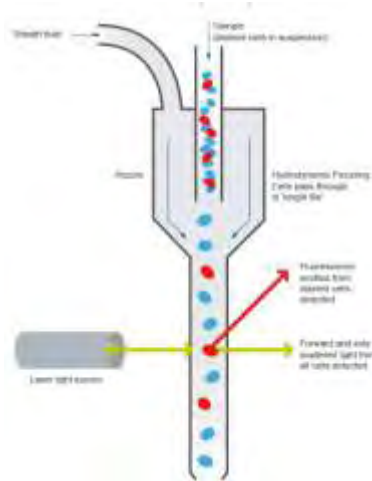
2.6.11 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών ενός πληθυσμού κυττάρων. Ένα δείγμα κυττάρων που αιωρείται σε ένα υγρό μέσο εισάγεται στο μηχανήμα της κυτταρομετρίας ροής. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το κυτταρόμετρο Cytomics FC500, Beckman Coulter. Τα κύτταρα ευθυγραμμίζονται και διαπερνούν από την κυψελίδα ροής με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να περνά ένα μόνο κύτταρο την φορά από την δέσμη φωτός που είναι συνήθως λέιζερ συγκεκριμένου μήκους κύματος. Κάθε κύτταρο που περνά από τη δέσμη διασκορπίζει (σκεδάζει) την ακτίνα του Laser. Ένας αριθμός ανιχνευτών τοποθετούνται στα σημεία όπου η ροή περνάει μέσα από τη δίοδο της δέσμης φωτός, ένας στην ίδια ευθεία με τη δέσμη φωτός (Forward scatter channel, FSC), αρκετοί κάθετοι σε αυτόν (Side scatter channel, SSC) και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Η διασπορά FSC σχετίζεται με τον όγκο των κυττάρων και η ένταση του σήματος αντικατοπτρίζει το μέγεθος των κυττάρων και το δείκτη διάθλασης (διαπερατότητα μεμβράνης). Η διασπορά SSC εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα, κοκκίωση του κυττάρου και η ένταση αυτού του σήματος είναι ανάλογη με το ποσοστό των κυτταροπλασματικών δομών του κυττάρου πχ κυτταρικά εγκλείσματα, συσσωματώματα. Επιπλέον, ουσίες που φθορίζουν στο κύτταρο μπορεί να διεγερθούν, εκπέμποντας φως μεγαλύτερου μήκους κύματος από την πηγή φωτός (Εικόνα 12) (Mandy et al., 1995).

Η μέτρηση του αποπτωτικού θανάτου που συμβαίνει υπό τις διάφορες συνθήκες του πειράματος πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της Annexin V που είναι συνδεδεμένη με τη φθορίζουσα FITC (Fluorescein isothiocyanate)

(ThermoFisher Scientific, Catalog No. 31490013). Η φθορίζουσα FITC διεγείρεται από την ακτίνα laser σε μήκος κύματος 495nm και εκπέμπει σε μήκος κύματος 519nm με αποτέλεσμα την διάκριση των κυττάρων που εμφανίζουν αποπτωτικό θάνατο. Η απόπτωση είναι μία ρυθμισμένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη του κυττάρου. Η απόπτωση διακρίνεται από την νέκρωση ή τον τυχαίο κυτταρικό θάνατο μέσω μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένων της συμπύκνωσης και του κατακερματισμού της πυρηνικής χρωματίνης, της συρρίκνωσης του κυτταροπλάσματος και της απώλειας της ασυμμετρίας της μεμβράνης. Στα φυσιολογικά ζώντα κύτταρα, η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Ωστόσο, στα αποπτωτικά κύτταρα η PS μετατοπίζεται από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να εκτίθεται στον εξωκυττάριο περιβάλλον. Το ανθρώπινο αγγειακό αντιπηκτικό (Annexin V) είναι μία άσβεστο-εξαρτώμενη πρωτεΐνη που δεσμεύεται στα φωσφολιπίδια 35-36 kDa, και έχει υψηλή συγγένεια για την PS.

Πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό της απόπτωσης παρασκευάστηκε το διάλυμα δέσμευσης της Annexin V που αποτελείται από 10mM HEPES, 140mM NaCl και 2,5mM CaCl με pH 7,4. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με τα κατάλληλα πλασμίδια, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και ένα 24ωρο πριν το πέρας της πειραματικής διαδικασία προκλήθηκε απόπτωση των κυττάρων με το χημικό CCCP. Το CCCP είναι ένας φορέας ιόντων που διαταράσσει την σύνθεση του ATP, καθώς μεταφέρει ιόντα υδρογόνου μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης προτού αυτά μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για την παροχή ενέργειας κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με την βοήθεια θρυψίνης, έγινε πλύση με το διάλυμα δέσμευσης και επαναιώρηση των κυττάρων στο διάλυμα δέσμευσης που περιέχει την φθορίζουσα Annexin V- FITC. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά με την συνδεδεμένη με FITC Annexin V. Η συνδεδεμένη με FITC Annexin V βρίσκεται σε διάλυμα που περιέχει 25mM HEPES, 140mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4 και 0,1% BSA (Bovine serum albumin). Τέλος, μετά την περίοδο επώασης, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν στο διάλυμα δέσμευσης της Annexin V και κρατήθηκαν στον πάγο ως ότου αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής. Ως κοντρόλ συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μη διαμολυσμένα με πλασμίδιο που είχαν βαφεί με τον φθορίζον διάλυμα και κύτταρα μη διαμολυσμένα που δεν είχαν βαφεί.



Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνονται οι δέσμες φωτός FSC και SSC (Abcam).

3. Αποτελέσματα

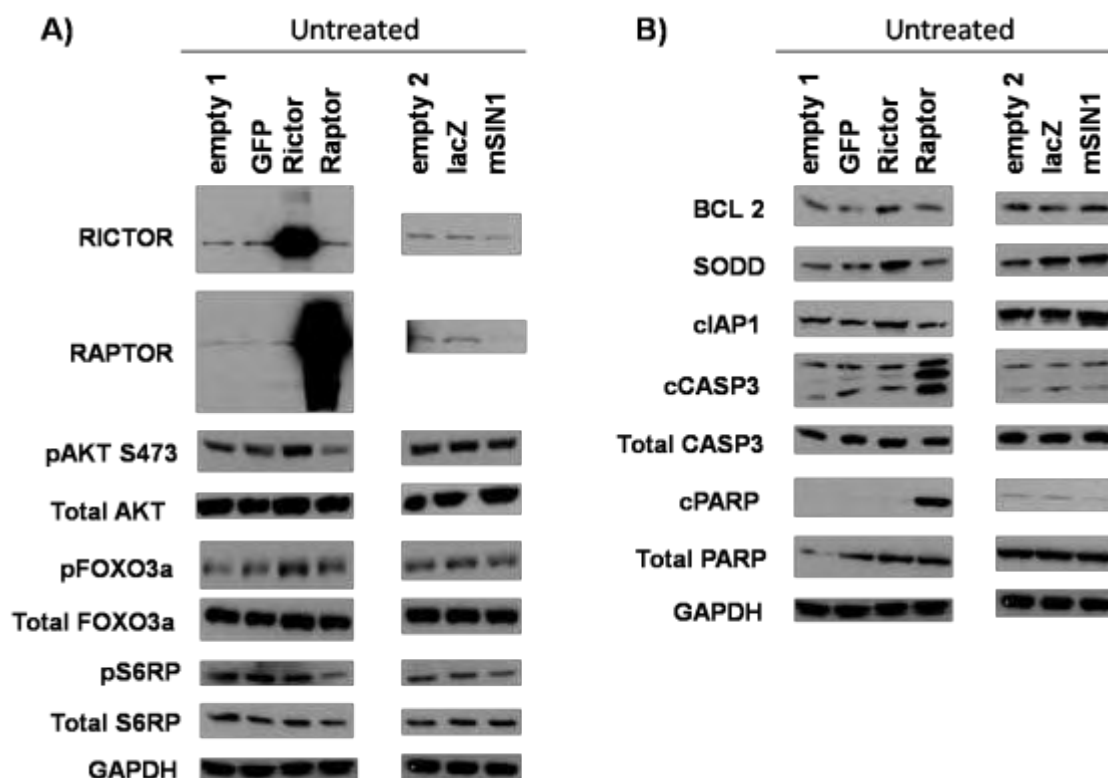
3.1 Διερεύνηση του ρόλου του mTORC2 στην απόπτωση

Για την αξιολόγηση του ρόλου του mTORC2 σε φυσιολογικές συνθήκες σε σχέση με το mTORC1, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης στην κυτταρική σειρά HEK293T που διήρκεσαν 48 ώρες. Συγκεκριμένα, υπερεκφράστηκαν οι πρωτεΐνες RICTOR και mSIN1 που αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες για το σχηματισμό του mTORC2, και η πρωτεΐνη RAPTOR, κύρια πρωτεΐνη του mTORC1. Με ανοσοσύτρωμα κατά Western εξετάστηκε η αλλαγή στα σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο καθοδικά των συμπλόκων όσο και της απόπτωσης (Εικόνα 13A). Η υπερέκφραση του RICTOR οδήγησε σε αύξηση της φωσφορυλίωσης του AKT στο κατάλοιπο Ser473 και του υποστρώματος του, pFOXO3a, υποδηλώνοντας την ενδογενή αύξηση του mTORC2. Η υπερέκφραση του mSIN1 δεν προκάλεσε αντίστοιχες αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι του mTORC2, αφού ο ρόλος του σχετίζεται με την σταθερότητα του συμπλόκου.

Σχετικά με την επιβίωση των κυττάρων (Εικόνα 13B), η υπερέκφραση του RICTOR οδήγησε σε αύξηση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Ένδειξη αποτελεί η αύξηση των πρωτεϊνών BCL2, SODD και cIAP1 σε σχέση με τα control, αλλά και με την υπερέκφραση του RAPTOR. Η υπερέκφραση του mSIN1 φάνηκε να αυξάνει εντονότερα την cIAP1 σε σχέση με τις άλλες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που εξετάστηκαν. Η δράση της BCL2 βασίζεται με την αναστολή προ-αποπτωτικών

πρωτεϊνών, όπως είναι η BAX η οποία κάνει διαπερατή την μιτοχονδριακή μεμβράνη απελευθερώνοντας κυτόχρωμα C, απαραίτητο για την σηματοδότηση της απόπτωσης (Hardwick & Soane, 2013). Η SODD (silencer of death domain) αναστέλλει την απόπτωση καθώς προσδένεται στην κυτταροπλασματική περιοχή DD του TNF (Tumor necrosis factor) υποδοχέα, εμποδίζοντας τον τριμερισμό του υποδοχέα και άρα την στρατολόγηση σε αυτόν πρωτεϊνών που επάγουν την απόπτωση (Jiang et al., 1999). Τέλος, η cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis 1) εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι ανοδικά των μιτοχονδρίων αλληλεπιδρώντας με τις TRAF1 και TRAF2 (TNF receptor-associated protein) για να αναστείλει την απόπτωση. Επιπλέον, η cIAP1 αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης 8 την οποία διασπά για να ξεκινήσει την απόπτωση (Guicciardi et al., 2010).

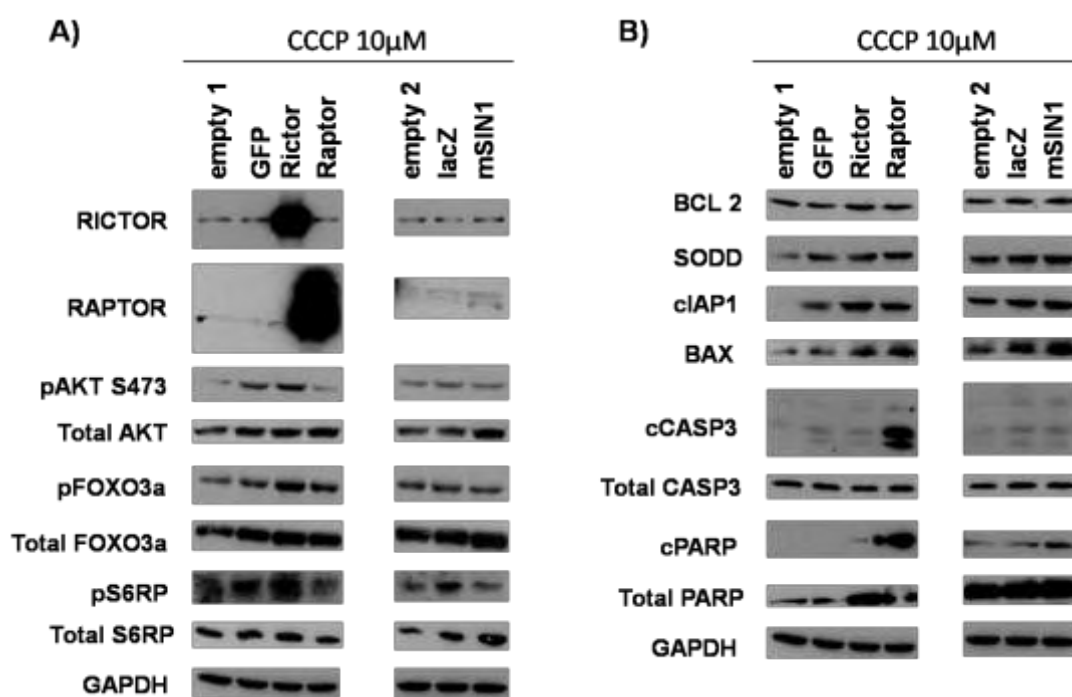
Από την άλλη, η υπερέκφραση του RAPTOR ενεργοποίησε την αποπτωτική σηματοδότηση καθώς αύξησε τα επίπεδα cCASP3 (cleaved-CASP3) και του υποστρώματος της cPARP (cleaved-PARP) (Εικόνα 13B).



Εικόνα 13 Ανοσοσύτρωμα κατά Western των HEK293T κυτάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1. (A) Έλεγχος των σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά των mTOR συμπλόκων μετά τις υπερέκφρασεις, (B) Η υπερέκφραση του RICTOR οδήγησε σε επαγωγή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2, SODD και cIAP1, ενώ του RAPTOR σε απόπτωση, όπως φαίνεται από την αύξηση των cCASP3 και cPARP. Η cIAP1 έδειξε, επίσης, έντονη αύξηση στην υπερέκφραση του mSIN1.

Αφού εξετάστηκε ο ρόλος των mTORC1 και mTORC2 σε φυσιολογικές συνθήκες, έγινε διερεύνηση του ρόλου τους υπό οξειδωτικές συνθήκες (Εικόνα 14). Γι αυτό το σκοπό, στα πειράματα υπερέκφρασης που πραγματοποιήθηκαν εισήχθη το χημικό CCCP σε συγκέντρωση 10μM ένα 24ώρο πριν την συλλογή των κυττάρων. Ακολούθησε ανοσοσύτρωμα κατά Western και χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι αντι-αποπτωτικών και αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Υπό οξειδωτικές συνθήκες, το RAPTOR αύξησε τις αποπτωτικές πρωτεΐνες cCASP3, cPARP και BAX, ενώ το RICTOR διατήρησε την αντι-αποπτωτική του δράση διατηρώντας αυξημένο κυρίως το cIAP1. Το mSIN1, ωστόσο, έδειξε να επάγει το αποπτωτικό μονοπάτι αυξάνοντας το BAX και την cPARP (Εικόνα 14B).

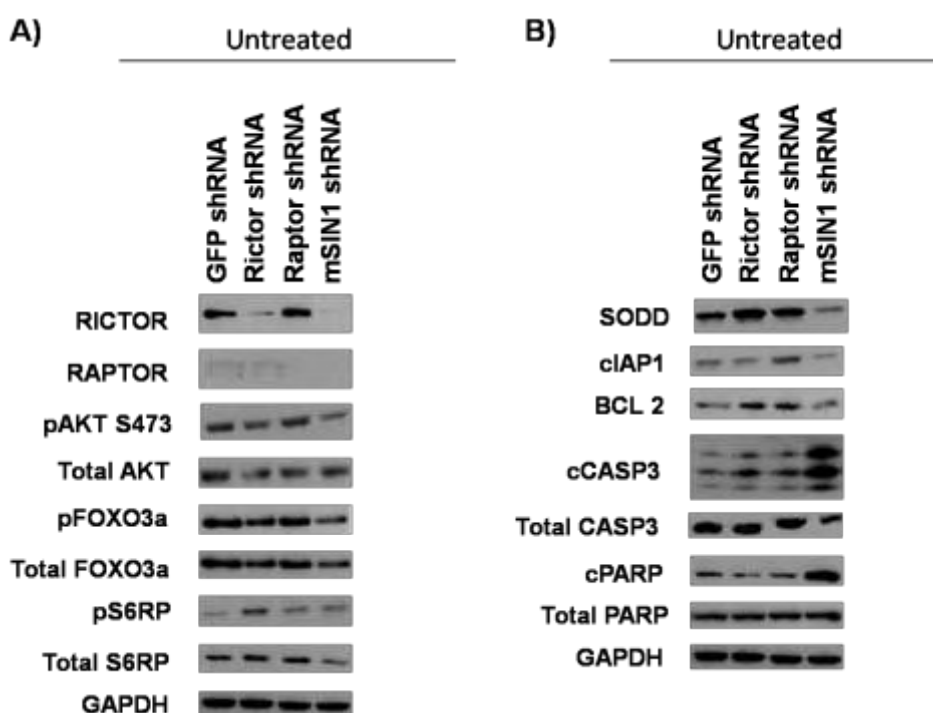


Εικόνα 14 Ανοσοσύτρωμα κατά Western των HEK293T κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε με CCCP 10μM. (Α) Έλεγχος των σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά των mTOR συμπλόκων μετά τις υπερεκφράσεις υπό οξειδωτικό στρες, (Β) Η υπερέκφραση του RICTOR διατήρησε αυξημένες τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, με την cIAP1 να εμφανίζει την μεγαλύτερη αύξηση. Αντίθετα, το RAPTOR και σε μικρότερο βαθμό το mSIN1 έδειξαν επαγωγή της απόπτωσης.

Ακολούθησαν πειράματα στα οποία έγινε μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1 με την βοήθεια shRNA που στοχεύουν στα mRNA των γονιδίων εμποδίζοντας τη μετάφραση τους. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν σε φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από προσθήκη CCCP 10μM και τα αποτελέσματα εξετάστηκαν με ανοσοσύτρωμα κατά Western.

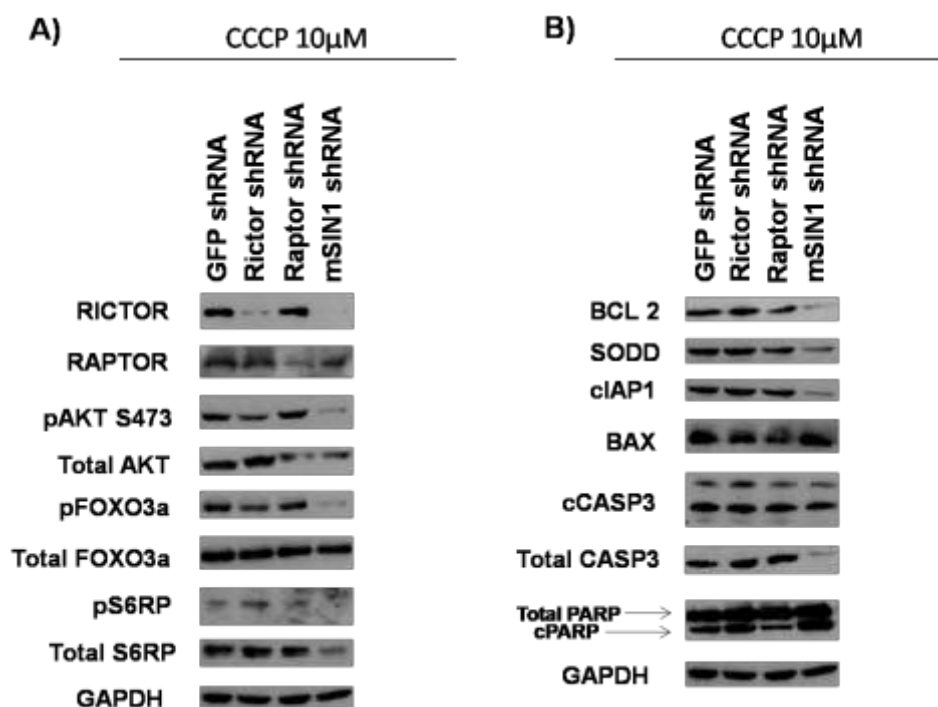
Στις φυσιολογικές συνθήκες, η μείωση των επιπέδων του RICTOR είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων των pAKT Ser473 και pFOXO3a, υποδηλώνοντας την μείωση των ενδογενών επιπέδων του mTORC2. Η μείωση των πρωτεϊνών αυτών έγινε εντονότερη με την μείωση των επιπέδων του mSIN1, ενώ η μείωση του RAPTOR είχε τα αντίθετα αποτελέσματα (Εικόνα 15A).

Όσον αφορά το αποπτωτικό μονοπάτι, η μείωση του RICTOR επιφέρει αύξηση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών SODD και BCL2, το οποίο παρατηρήθηκε και στις συνθήκες υπερέκφρασης του RICTOR. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και στη μείωση του RAPTOR, ενώ η μείωση του mSIN1 οδήγησε τα κύτταρα στην απόπτωση (Εικόνα 15B).



Εικόνα 15 Ανοσοσύστημα κατά Western των HEK293T κυτάρων στα οποία έχει γίνει μείωση των επιπέδων των RICTOR, RAPTOR και mSIN1. (A) Έλεγχος του σηματοδοτικού μονοπατιού καθοδικά των mTOR συμπλόκων μετά την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών. (B) Η μείωση των πρωτεϊνών RICTOR και RAPTOR οδήγησαν σε αύξηση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών που εξετάστηκαν, ενώ το mSIN1 προκάλεσε την αύξηση της cCASP3 και κατά συνέπεια της cPARP.

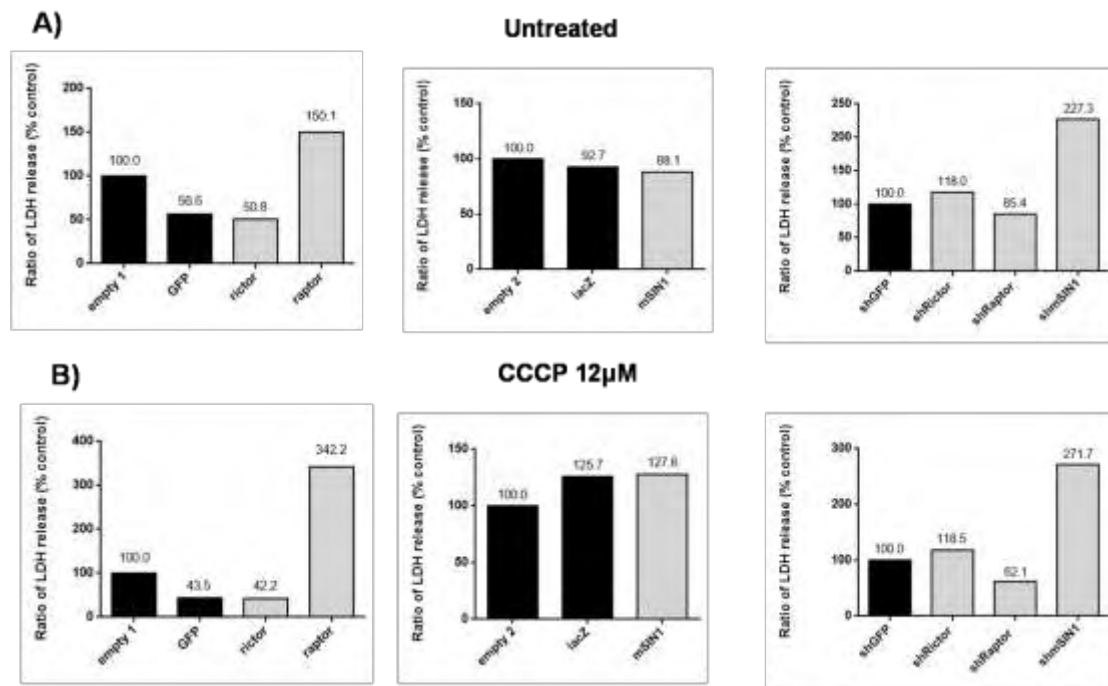
Οι παραπάνω συνθήκες εξετάστηκαν υπό οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε μετά την χορήγηση CCCP 10μM. Το shRNA για το RICTOR οδήγησε σε επαγωγή της απόπτωσης, αφού προκάλεσε την αύξηση της cPARP, ενώ το shRNA για το RAPTOR μείωσε την cPARP σε σχέση με το control. Την μεγαλύτερη αύξηση της cPARP προκάλεσε το shRNA για το mSIN1, ενώ έγινε εμφανής η μείωση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Εικόνα 16B).



Εικόνα 16 Ανοσοσύτπωμα κατά Western των HEK293T κυττάρων στα οποία έχει γίνει μείωση των επιπέδων των RICTOR, RAPTOR και mSIN1, υπό CCCP 10µM. (A) Έλεγχος του σηματοδοτικού μονοπατιού καθοδικά των mTOR συμπλόκων μετά την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών σε συνθήκες CCCP. (B) Τα shRNA για το RICTOR και το mSIN1 επάγουν την απόπτωση, όπως φαίνεται από την αύξηση της cPARP, ενώ το shRNA για το RAPTOR την μειώνει.

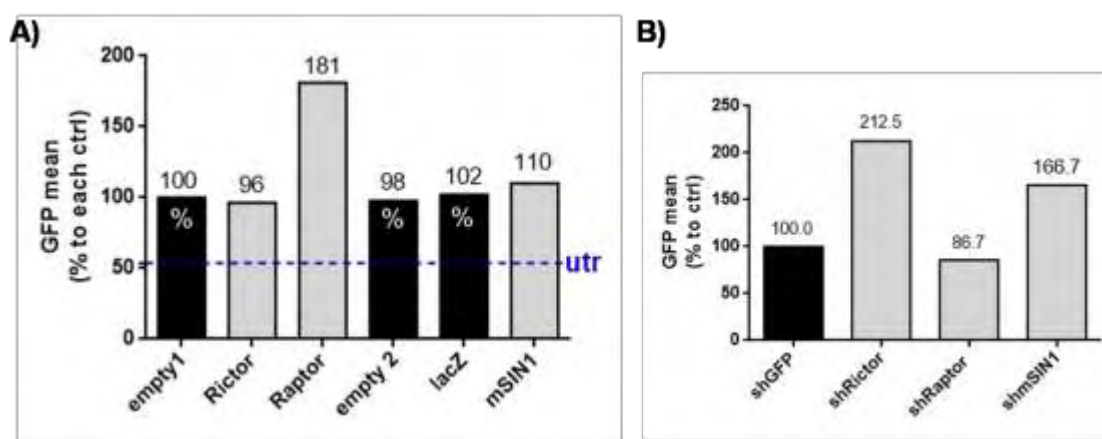
3.2 Μέτρηση της κυτταρικής θνησιμότητας

Η κυτταρική θνησιμότητα, επίσης, αξιολογήθηκε με την δοκιμασία LDH, στην οποία μετρήθηκε το ποσοστό θνησιμότητας στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών και έπειτα η βιωσιμότητα των κυττάρων σε κάθε συνθήκη. Έτσι, προέκυψε ο λόγος τους που φανερώνει το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 17). Η διαδικασία αυτή διεξήχθη στις συνθήκες με ή χωρίς την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία LDH επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα από το ανοσοσύτπωμα κατά Western.



Εικόνα 17 Δοκιμασία LDH για τις συνθήκες υπερέκφρασης και shRNA σε φυσιολογικές συνθήκες και κατά την χορήγηση CCCP 12μM. Παρουσιάζεται σε φυσιολογικές συνθήκες (A) και συνθήκες παρουσία του CCCP 12μM (B) τα ποσοστά του λόγου της κυτταρικής βιωσιμότητας προς τον κυτταρικό θάνατο των πρωτεϊνών σε υπερέκφραση και των shRNA των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Χρησιμοποιήθηκε μια επιπλέον τεχνική για την ποσοτικοποίηση του αποπτωτικού θανάτου, η Annexin V συνδεδεμένη με FITC που χρωματίζει τα αποπτωτικά κύτταρα. Η ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων έγινε με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε μόνο για τις φυσιολογικές συνθήκες και όχι κατά την επαγωγή του οξειδωτικού στρες με τη χρήση κάποιου χημικού (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Χρώση των αποπτωτικών κυττάρων με τη Annexin V συνδεδεμένη με FITC στις φυσιολογικές συνθήκες. (A) Φαίνεται ο αποπτωτικός θάνατος κατά την υπερέκφραση των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1 με τα αντίστοιχα control τους, (B) Φαίνεται ο αποπτωτικός θάνατος κατά την μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών RICTOR, RAPTOR και mSIN1.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι η υπερέκφραση του RICTOR οδήγησε σε αύξηση των ενδογενών επιπέδων και σηματοδότησης του mTORC2 συμπλόκου, σε αντίθεση με το mSIN1 που δεν επηρέασε το σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά του mTORC2, ενδεχομένως διότι ο ρόλος της περιορίζεται στην σταθερότητα του συμπλόκου. Εξετάζοντας την υπερέκφραση των πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες φάνηκε το RICTOR και άρα το mTORC2 να επάγει αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως το BCL2, το SODD και το cIAP1 που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Στις ίδιες συνθήκες το RAPTOR και άρα το mTORC1 ενεργοποίησε την αποπτωτική σηματοδότηση, καθώς αύξησε τις αποπτωτική πρωτεΐνη cCASP3 και του υποστρώματος της cPARP. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε συνθήκες οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε χημικά με τη χορήγηση CCCP 10μM, με το RAPTOR να επάγει ακόμα περισσότερο την αποπτωτική σηματοδότηση.

Η χρήση των shRNA για το RICTOR οδήγησε σε μείωση της mTORC2 σηματοδότησης και η μείωση αυτή ήταν ακόμα πιο έντονη με την χρήση του shRNA για το mSIN1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρόλο που το shRNA για το RICTOR σε φυσιολογικές συνθήκες δεν επηρέασε τα κύτταρα αρνητικά, κατά το οξειδωτικό στρες τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε αποπτωτικό θάνατο. Το shRNA για το mSIN1 εμφάνισε δραματική μείωση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε σχέση με τα control και έντονη αύξηση της απόπτωσης τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε οξειδωτικές. Αντίθετα, η απουσία του RAPTOR από τα κύτταρα βελτίωσε την επιβίωση κατά το οξειδωτικό στρες.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι το mTORC2 δρα ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας, βοηθώντας στην επιβίωση των κυττάρων κατά το οξειδωτικό στρες, ενώ η απουσία του επάγει την αποπτωτική σηματοδότηση. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν με την δοκιμασία LDH και την κυτταρομετρία ροής στις οποίες υπήρξε αύξηση της βιωσιμότητας κατά το οξειδωτικό στρες μετά από υπερέκφραση του RICTOR.

Ο ρόλος της σηματοδότησης του mTORC2 στην κυτταρική λειτουργία δεν είναι καλά μελετημένος σε σχέση με το mTORC1. Με την παρούσα διπλωματική εργασία φάνηκε ένα ξεχωριστός ρόλος του mTORC2 που δεν σχετίζεται με τις ήδη γνωστές λειτουργίες του, όπως είναι η ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού. Αυτά τα αποτελέσματα δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του ρόλου του mTORC2 και την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του κατά το οξειδωτικό στρες. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες RICTOR και mSIN1 του συμπλόκου που η δράση τους επηρεάζει τη σηματοδότηση του mTORC2 με διαφορετικό τρόπο κατά το οξειδωτικό στρες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* 351, 728–733.
2. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., and Kaelin, W. G. (2004). Regulations of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes and Development*, 18(23), 2893–2904
3. Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99–101.
4. Bozulic, L., & Hemmings, B. A. (2009). PI3K on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 256–261.
5. Cai, W., Andres, D. A., & Reiner, D. J. (2014). mTORC2 is required for rit-mediated oxidative stress resistance. *PLoS ONE*, 9, 1–15.
6. Chen, X., Liu, M., Tian, Y., Li, J., Qi, Y., Zhao, D., Wu, Z., Huang, M., Wong, C. C. L., et al. (2018). Cryo-EM structure of human mTOR complex 2. *Cell Research*, (February), 1–11
7. Chung, J., Kuo, C.J., Crabtree, G.R., & Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70kd S6 protein kinases. *Cell*, 69, 1227–1236.
8. Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740.
9. Dibble, C.C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P.M., Kwiatkowski, D.J., Murphy, L. O., and Manning, B. D. (2012). TBC1D7 is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, 47, 535–546
10. Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467–471.
11. Drummond, M. (2013). Principles of Flow Cytometry. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*, 16(4), 3–19.
12. Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* 39, 171–183.
13. Eng, C.P., Sehgal, S.N., & Vezina, C. (1984). Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of Antibiotics*, 37, 1231–1237.
14. Feng, Z., Hu, W., De Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., Lowe, S., & Levine, A. J. (2007). The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research*, 67, 3043–3053.
15. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8204–8209.
16. Gaubitz, C., Oliveira, T.M., Prouteau, M., Leitner, A., Karuppasamy, M., Konstantinidou, G., Rispoli, D., Eltschinger, S., Robinson, G.C., Thore, S., et al.

- (2015). Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Molecular Cell*, 58, 977–988.
17. Garcia-Martínez, J.M., and Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416, 375–385.
 18. Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., & Loewith, R. (2016). TORC2 Structure and Function. - PubMed - NCBI. *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 532–545.
 19. Guertin, D.A., Stevens, D.M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., Sheen, J.H., Mullholland, D.J., Magnuson, M.A., Wu, H., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15, 148–159.
 20. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk B. E., and Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30, 214–226.
 21. Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213–223.
 22. Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., & Shiozaki, K. (2015). Fission yeast ryh1 gtpase activates tor complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle*, 14, 848–856.
 23. Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569–580.
 24. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nature Cell Biology*, 4, 648–657.
 25. Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, 126, 955–968.
 26. Zeng, L.H., Xu, L., Gutmann, D.H., and Wong, M. (2008). Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Ann. Neurol.* 63, 444–453.
 27. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144(5), 757–768.
 28. Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science*, 334, 678–683.
 29. Kantidakis, T., Ramsbottom, B.A., Birch, J.L., Dowding, S.N., and White, R.J. (2010). mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11823–11828.
 30. Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146, 1473–1481.
 31. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
 32. Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., et al. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*, 335, 1638–1643.

33. Laplante, M., & Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274–293.
34. Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. Te, Hsu, J. M., Chou, C K., Wei, Y., Sun, Y W., Li, L Y., et al. (2007). IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*, 130, 440–455.
35. Lipton, J.O., and Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron* 84, 275–291.
36. Liu, P., Gan, W., Chin, Y. R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., Wang, B., Blenis, J., Cantley, L. C., Toker, A., Su, B., and Wei, W. (2015). Ptdins(3,4,5) P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer Discovery*, 5, 1194–11209.
37. Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960–976.
38. Ma, X.M., Yoon, S.O., Richardson, C.J., Ju" lich, K., and Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* 133, 303–313.
39. Martel, R.R., Klicius, J., & Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 55, 48–51.
40. Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M., and Puertollano, R. (2012). mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8, 903–914
41. Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 18, 423–434.
42. Perluigi, M., Di Domenico, F., & Butterfield, D. A. (2015). mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiology of Disease*, 84, 39–49.
43. Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–886.
44. Perluigi, M., Di Domenico, F., & Butterfield, D.A. (2015). mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiology of Disease*, 84, 39–49.
45. Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780–786.
46. Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-independent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35–43.
47. Saci, A., Cantley, L. C., & Carpenter, C. L. (2011). Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size. *Molecular Cell*, 42(1), 50–61.
48. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141, 290–303.
49. Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, 25, 903–915.
50. Sarbassov, D.D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L, and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22, 159–168.
51. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14, 1296–1302.

52. Shah, O.J., Wang, Z., and Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* 14, 1650–1656.
53. Shigeyama, Y., Kobayashi, T., Kido, Y., Hashimoto, N., Asahara, S., Matsuda, T., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., Koyanagi, M., et al. (2008). Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2971–2979.
54. Spilman, P., Podlitskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5, e9979.
55. Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* 13, 1259–1268.
56. Treins, C., Warne, P. H., Magnuson, M. A., Pende, M., & Downward, J. (2010). Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene*, 29, 1003–1016.
57. Wu, J.J., Liu, J., Chen, E.B., Wang, J.J., Cao, L., Narayan, N., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Allen, M., Springer, D.A., et al. (2013). Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Rep.* 4, 913–920.
58. Yang, G., Murashige, D. S., Humphrey, S. J., & James, D. E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Reports*, 12, 937–943.
59. Yang, H., Chen, X., Liu, M., & Xu, Y. (2018). The structure of mTOR complexes at a glance. *Precision Cancer Medicine*, 1(9), 7–7.
60. Yang, H., Wang, J., Liu, M., Chen, X., Huang, M., Tan, D., Dong, M Q., Wong, C. C. L., et al. (2016). 4.4 Å Resolution Cryo-EM structure of human mTOR Complex 1. *Protein and Cell*, 7(12), 878–887.
61. Yu, Y., Yoon, S.O., Poulgiannis, G., Yang, Q., Ma, X.M., Ville' n, J., Kubica, N., Hoffman, G.R., Cantley, L.C., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2011). Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* 332, 1322–1326.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Επαμεινώνδα Δοξάκη, Ερευνητής Γ' στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και την έμπρακτη υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητική ομάδας του κ. Δοξάκη για την βοήθεια που μου προσέφεραν, την υπομονή και την ανοχή σε όλο αυτό το διάστημα.

Συγχρόνως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, και τον κ. Γκάγκο Σαράντη, Ερευνητής Β' στο ΙΙΒΕΑΑ.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου που με τη συνεχή στήριξη τους κατάφερα να ολοκληρώσω αυτό το σημαντικό κομμάτι της ζωής μου.